

01672



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

2

PAPEL DE LA CITOTOXICIDAD DE LINFOCITOS T
ESPLENICOS DE AVES CONTRA CELULAS BLANCO
INFECTADAS CON *Eimeria tenella*.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS: AVES
PRESENTADA POR:
MVZ JOSE JESUS CABRIALES JIMENEZ

274852

ASESORES: MVZ MC GARY GARCIA ESPINOSA.
MVZ PhD GUILLERMO TELLEZ ISAIAS.
MVZ EPA: A MCV MARIA ELENA RUBIO GARCIA.
MVZ MC REYNALDO MORENO DIAZ.



MEXICO, D. F.

FEBRERO 2000



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

Doy mi 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 esta tesis sea disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MVZ José Jesús Cabriaes Jiménez

DEDICATORIA

A mi hijo Raziel y a mi esposa Yuritzi, porque son lo mejor que me ha dado la vida y son mi mayor motivación para hacer bien las cosas.

A mis padres José Cabriales y Sara Jiménez porque me guiaron y apoyaron para ser lo que soy.

A mi hermano César y a mis hermanas Rocio y Sandra, porque simplemente los quiero.

A mis amigos de siempre: Raúl Rico, Rubén Benitez, Roberto Beltran, Osbaldo Cruz y Edgar Ocampo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A todas y cada una de las personas que hacen del Departamento de Producción Animal: Aves el mejor equipo de trabajo.

Al Dr. Gary García y al Dr. Guillermo Téllez por brindarme la oportunidad de ser mejor y enseñarme lo que puedo llegar a ser. La confianza que me transmitieron fue vital para mí, muchas gracias.

A la Dra. María Elena Rubio y al Dr. Reynaldo Moreno por los comentarios que guiaron la elaboración de este trabajo.

Al Dr. José Antonio Quintana por los consejos tan acertados que me ha dado.

A los Doctores: Rubén Merino, Marco Juárez, Xóchitl Hernández, Pilar Castañeda, Krimilda Valle, Donají García, Blanca Bautista, Daniel Marrufo, Edgar Peña, Daniel Ortega; porque con todos ellos aprecié y disfruté el valor de la amistad.

A la Dra Cecilia Rosario, porque le reconozco que cuando se le necesita es taaan linda... Muchas gracias Cecy.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Ciclo de vida de las coccidias.....	3
Control de la coccidiosis.....	5
Inmunoprofilaxis.....	7
Mecanismos de inmunidad en la coccidiosis.....	7
Sistemas de defensa del hospedero.....	8
Tejido linfoide asociado al intestino.....	8
Respuesta inmune en la coccidiosis.....	10
Respuesta humoral al parásito.....	10
Respuesta celular al parásito.....	11
La respuesta inmune en el intestino vs infección por coccidias.....	12
Evaluación de la respuesta inmune en la coccidiosis.....	14
OBJETIVO.....	16
HIPÓTESIS.....	16
MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
Preparación de la cepa de <i>Eimeria tenella</i>	17
Obtención de esporozoitos.....	17
Inmunización de las aves.....	18
Aislamientos de linfocitos T.....	18
Preparación del cultivo primario de células de riñón.....	19
Infección de células renales.....	19
Determinación de la citotoxicidad.....	20
Obtención de los sobrenadantes.....	21
Porcentaje de citotoxicidad.....	22
Análisis estadístico.....	22
RESULTADOS.....	23

Determinación de la citotoxicidad.....	23
Liberación de LDH en los grupos de aves inmunes.....	23
Liberación de LDH en los grupos de aves no inmunes.....	25
Porcentaje de citotoxicidad.....	26
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES.....	33
LITERATURA CITADA.....	34

RESUMEN

Cabriales Jiménez José Jesús: Papel de la citotoxicidad de linfocitos T esplénicos de aves contra células blanco infectadas con *Eimeria tenella* (Bajo la asesoría de: MVZ MC Gary García Espinosa, PhD Guillermo Téllez Isaías, MVZ MC María Elena Rubio y MVZ MC Reynaldo Moreno). Con el propósito de obtener evidencia de que los linfocitos T reconocen péptidos en células infectadas, se evaluó el efecto citotóxico de linfocitos esplénicos sobre células infectadas con *Eimeria tenella*. Se hicieron cultivos primarios de células de riñón de pollo y se infectaron con esporozoitos de *E. tenella*. Se adicionaron linfocitos que se obtuvieron de aves inmunes y no inmunes al parásito; asimismo se adicionaron linfocitos a cultivos celulares no infectados. Para detectar y evaluar el daño celular en las células blanco, se utilizó un kit comercial de detección de la enzima lactato deshidrogenasa. La presencia de esta enzima en el medio de cultivo es proporcional al daño celular y para su medición se utilizó un lector de ELISA. Se determinó la absorbancia en cada una de las muestras y los resultados obtenidos de las lecturas se les realizó una transformación Log. Se realizó un análisis de varianza para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre grupos. De acuerdo con la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las medias de los diferentes grupos. Se encontró que existe un nivel de citotoxicidad mayor en aquellos grupos donde se infectaron las células renales y se les adicionó linfocitos que provenían de aves inmunes. Se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los cultivos infectados y no infectados. Esto pone en evidencia que las células infectadas son destruidas en mayor cantidad por las células esplénicas de aves inmunes al parásito. Ciertas poblaciones celulares intervienen en la respuesta inmune mediada por células, como son los linfocitos T citotóxicos y las células NK. Se reportan mecanismos de citotoxicidad en una respuesta antígeno-específica que resulta como una consecuencia de la infección natural o vacunación. Para evaluar la citotoxicidad es evidente y más sencillo cuando se utiliza una prueba colorimétrica como la empleada en este trabajo.

Palabras clave: Citotoxicidad, *Eimeria tenella*, inmunidad celular, coccidiosis aviar, linfocitos T, Células NK, lactato deshidrogenasa.

SUMMARY

Cabriales Jiménez José Jesús: Role of cytotoxicity of avian splenic T Lymphocytes against target cells infected with *Eimeria tenella* (Directed by: MVZ MC Gary García Espinosa, PhD Guillermo Téllez Isaias, MVZ MC María Elena Rubio y MVZ MC Reynaldo Moreno). In order to prove that T Lymphocytes recognize infected cells, the cytotoxic effect of splenic lymphocytes against *E. tenella* was evaluated. Chicken kidney primary culture cells were prepared and infected with *E. Tenella* sporozoites. Splenic cells obtained from *E. tenella* immune chickens and naïve splenic cells were added to infected culture cells, and in the same manner they were added to non infected culture cells. In order to detect and evaluate the cellular damage a lactate deshydrogenase enzyme detection kit was used. The presence of this enzyme in the culture medium indicates cellular damage. In order to be measure it, an ELISA lector was used. The absorbance of each sample was determined and the reaching results were transformed in Log_e and varianza analysis (ANOVA) was carried out in order to determine statistically significant differences among the groups. According to Tukey's Test, there were significant differences ($p < 0.05$) among each group means. A greater citotoxicity level was found in those groups in which kidney cells were infected and then added splenic cells from immune chickens. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were found between infected culture cells and non infected. This fact means that infected cells are destroyed in larger amounts by splenic cells of *E. tenella* immune chickens. Some cell population participate in the cell immune response, such as cytotoxic T Lymphocytes and NK cells. Cytotoxic mechanisms in an antigen-specific response are discussed in this paper. It is evident and easier to evaluate the cytotoxicity when a colorimetric test is used.

Key Words: Cytotoxicity, *Eimeria tenella*, cellular immunity, avian coccidiosis, T Lymphocytes, NK cells, lactate deshydrogenase.

INTRODUCCIÓN

La coccidiosis es una enfermedad producida por un grupo diverso de parásitos protozoarios intracelulares obligados, que infecta a los vertebrados y a pocas especies de invertebrados. La mayoría de las especies de coccidia de importancia veterinaria están dentro de la familia *Eimeriidae*, que comprende dos importantes géneros: *Eimeria* e *Isospora* (Levine, 1982; Current, 1990).

En la coccidiosis aviar los parásitos protozoarios del género *Eimeria* se multiplican en el tracto intestinal donde ocasionan daño tisular y alteran los procesos digestivos y de absorción de nutrientes, lo que origina retardo en el desarrollo, que se refleja en pérdida de peso y mortalidad variable que depende del grado de parasitosis de la parvada (McDougald y Reid, 1991; Lillehoj, 1993).

Las especies de eimeria que se identifican más frecuentemente en México son: *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. brunetti* (Moreno 1992). De estas especies, las que se localizan e invaden la parte anterior y media del intestino (*E. acervulina*, *E. maxima* y *E. necatrix*) producen una alteración en las funciones de absorción de nutrientes y carotenos por el tracto intestinal, lo que ocasiona una baja de peso y despigmentación. Dentro de las especies que afectan al último tercio del intestino están *E. tenella* y *E. brunetti*. De éstas, la coccidiosis por *E. tenella* es la más grave debido a la pérdida en la ganancia de peso, la evidente melena provocada por los esquizontes de 2a. generación al invadir las células subepiteliales de las criptas y la alta mortalidad que ocasiona (McDougald y Reid, 1991; Moreno, 1992).

CICLO DE VIDA DE LAS COCCIDIAS.

La coccidiosis difiere de las enfermedades virales y bacterianas por su naturaleza autolimitante en su desarrollo (McDougald y Reid, 1991). En el ciclo de vida de las coccidias se distinguen tres fases:

- 1.- Esporogonia
- 2.- Esquizogonia
- 3.- Gametogonia

1.- ESPOROGONIA: Se lleva a cabo en el suelo donde se encuentran los ooquistes no esporulados que fueron excretados por aves infectadas, donde bajo condiciones apropiadas de humedad y temperatura éstos esporulan (sufren una subdivisión interior surgiendo dos y luego cuatro esporoblastos o esporoquistes en cuyo interior, a su vez, se producen dos esporozoítos). La esporogonia transcurre en aproximadamente 24 horas. El ooquiste esporulado con sus ocho esporozoítos es infectante y según la cantidad ingerida, patogenicidad de la cepa, especie de *Eimeria*, factores ambientales, etc. podrá o no originarse un brote de coccidiosis (Current, 1990; McDougald y Reid, 1991; Shirley, 1992).

2.- ESQUIZOGONIA: Dentro del ave y por acción de las enzimas digestivas y de los movimientos de la molleja, las paredes del ooquiste y de sus esporoquistes son destruidas, liberándose los esporozoítos. Cada uno de éstos invade una célula del epitelio, ya sea de los ciegos (en el caso de *Eimeria tenella*) o del intestino delgado, donde crece rápidamente, y luego se multiplica asexualmente por fusión múltiple para formar un esquizonte de primera generación. Las células resultantes de tal multiplicación se denominan merozoitos, y su cantidad varía de acuerdo con la especie de *Eimeria*; esto sucede alrededor del 2o. día de infección.

Al tercer día, el esquizonte libera a los merozoitos, los que a su vez invadirán células epiteliales en igual número que ellos, dando lugar a un proceso de crecimiento y multiplicación semejantes a su etapa anterior y se forma así la 2a. generación de esquizontes. Algunos de estos merozoitos pueden proseguir hacia una 3a. generación, pero la mayoría penetrarán a nuevas células epiteliales para diferenciarse sexualmente. En el caso de *E. mitis* y *E. praecox* se han identificado 4 generaciones asexuales (Current, 1990; McDougald y Reid, 1991; Shirley, 1992).

3.- GAMETOGONIA: Los merozoitos una vez que han invadido las células se convierten en macrogametocitos (células femeninas) y microgametocitos (células masculinas). En esta etapa se producen múltiples microgametos o macrogametos en la célula huésped. El microgameto fecunda al macrogameto, el cual entonces desarrolla una gruesa pared protectora y se transforma en lo que conocemos con el nombre de ooquiste (no esporulado) que al romperse la célula es liberado y excretado con las heces. El ciclo evolutivo se

completa en aproximadamente 7 días. De los millones de ooquistes producidos por el ave, sólo algunos sobreviven y se vuelven infecciosos (Current, 1990; McDougald y Reid, 1991; Shirley, 1992).

CONTROL DE LA COCCIDIOSIS

La coccidiosis aviar es la enfermedad parasitaria más importante a nivel mundial debido a las pérdidas económicas que ocasiona a la industria avícola. Estas pérdidas son atribuibles a los altos costos de medicación, al pobre desarrollo de las aves y a la mortalidad resultante de la enfermedad (Arakawa, 1993; McDougald y Reid, 1991; Shirley, 1992).

Para el control de la coccidiosis se han utilizado múltiples fármacos en la quimioterapia y en los últimos años se han utilizado vacunas a partir de ooquistes vivos (Arakawa, 1993; McDougald y Reid, 1991; Shirley, 1992).

Los fármacos anticoccidianos son la principal arma para controlar los brotes de coccidiosis (Arakawa, 1993) y el uso de estos fármacos se remonta al principio de la década de los 40's con el uso de las sulfonamidas. A partir de esta fecha se han creado una gran variedad de anticoccidianos de origen químico, así como anticoccidianos ionóforos originados por fermentación biológica (McDougald y Roberson, 1988).

USO DE ANTICOCIDIANOS.

El administrar anticoccidianos en el alimento es un método conveniente y económico el cual ha permitido que las aves puedan ser criadas en las condiciones intensivas de la industria avícola comercial. Generalmente los anticoccidianos se incluyen durante toda la vida del pollo de engorda, con el objetivo de que pocos parásitos escapen a los efectos de la medicación; sin embargo esto conduce al desarrollo de resistencia (Chapman, 1984, 1997).

La definición de resistencia farmacológica más apropiada para el caso de *Eimeria* fue descrita por Chapman en 1997: "Es la habilidad de una cepa de parásito para replicarse

o sobrevivir en presencia de concentraciones de un fármaco que normalmente destruye a parásitos de la misma especie o previene su multiplicación.”

Averiguar cómo es el modo de acción de los fármacos anticoccidianos es un requisito para el entendimiento de los mecanismos de resistencia a éstos, ya que cada clase de compuesto químico tiene acción única sobre el parásito. Actualmente se conoce en detalle la acción de algunos fármacos, mientras que la de otros permanece como misterio (McDougald y Reid, 1991; Chapman, 1997).

La acción de los fármacos anticoccidianos es diversa e incluye efectos sobre la función de las membranas (ionóforos), metabolismo energético (quinolonas), síntesis de cofactores (Amprolio, sulfonamidas) y síntesis de ADN (Arprinocid).

El mecanismo de acción de los ionóforos consiste en alterar la permeabilidad de la membrana celular al sodio y potasio, lo que requiere de mucha energía por parte de la célula para mantener el equilibrio. Se considera que estos fármacos tienen una acción no específica en el transporte de cationes a través de la membrana y que el desarrollo de resistencia podría requerir de cambios fundamentales en las propiedades físicas de la pared del parásito. Estos cambios no ocurren de manera rápida y la literatura reporta que se han tenido problemas para inducir resistencia a los ionóforos en condiciones de laboratorio; sin embargo, la baja sensibilidad a estos fármacos es extensa en los aislamientos de *Eimeria* obtenidos del campo. Es evidente que los parásitos se valen de mecanismos para evadir los efectos de estos anticoccidianos (Chapman, 1997).

Uno de los modos de acción mejor conocidos es el de las quinolonas, estos fármacos se unen de manera reversible a secciones del sistema de transporte de electrones en las mitocondrias del esporozoito y de este modo bloquea las reacciones que requieren de energía. En el caso del amprolio, este es químicamente similar a la tiamina y se asume que actúa por bloqueo en la utilización de la tiamina por el parásito. (Chapman, 1997).

La investigación y creación de nuevos fármacos anticoccidianos puede facilitarse si existe un mejor conocimiento de las bases bioquímicas involucradas en el metabolismo de los parásitos *Eimeria* (Chapman, 1997).

INMUNOPROFILAXIS.

A través de los años ha surgido un gran interés sobre la respuesta inmune de las aves hacia las coccidias y con base en esto se ha desarrollado el uso de vacunas con ooquistes vivos. El objetivo de estas vacunas es inducir inmunidad protectora durante la vida productiva del ave; el principio de la vacunación se basa en la administración de pequeñas cantidades de ooquistes a las aves, con el objeto de estimular al sistema inmune. (Long *et al* 1986; Danforth y Augustine, 1989; Nakai, Uchida y Kanazawa, 1992; Bafundo, 1994; Lee, 1994).

Bafundo (1994) menciona que los productos actuales utilizados en pollo de engorda sólo contienen algunas de las especies de coccidia, y que deberían estar presentes aquéllas de importancia en la producción de pollo. Las especies contenidas en la vacuna se replicarán en el pollo y serán aparentes aproximadamente 28 días después de su administración; frecuentemente, las infecciones por *E. tenella* se vuelven más severas durante este intervalo y es posible que la mortalidad alcance niveles no aceptables.

El éxito de la vacuna depende de que se desarrolle un sistema inmune competente, por lo que cualquier factor que ejerza un efecto negativo sobre él, afectará adversamente la respuesta inducida por la vacuna. Cuando se considera el uso de vacunas con ooquistes vivos, debe evaluarse cuidadosamente el impacto económico, ya que incluso las ligeras infecciones con algunas especies de coccidia afectan la ganancia de peso, conversión alimenticia y pigmentación de la piel (Bafundo, 1994; McDougald y Reid, 1991).

MECANISMOS DE INMUNIDAD EN LA COCCIDIOSIS.

La interacción del sistema inmune con los microorganismos infecciosos es un proceso dinámico entre los mecanismos del huésped orientados a la eliminación del agente infectante y las estrategias de los microorganismos para sobrevivir en presencia de estos mecanismos efectores (Abbas, 1994). En las infecciones parasitarias provocadas por protozoarios la resistencia es poco eficaz; los parásitos han desarrollado además múltiples mecanismos de evasión y resistencia a la inmunidad, ya que la diversidad estructural y

antigénica de los parásitos se refleja en la heterogeneidad de las respuestas inmunitarias que provocan. (Abbas, 1994; Roitt, 1993; Tizard, 1995).

SISTEMAS DE DEFENSA DEL HOSPEDERO.

El organismo se vale de múltiples estrategias para combatir las infecciones causadas por parásitos animales como los protozoarios. Dentro de estas estrategias entran en juego tanto la resistencia como la inmunidad. Así tenemos que para combatir a los parásitos que se desarrollan en el torrente sanguíneo (por ejemplo: *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Leishmania*) el organismo se vale de mecanismos inespecíficos de defensa tales como el sistema del complemento y la fagocitosis por parte de monocitos y polimorfonucleares (Abbas, 1995).

En el caso de la coccidiosis, debido a que es un parásito específico de huésped y de sitio de infección, los principales mecanismos responsables de la inmunidad contra este parásito se encuentran localizados en el tracto intestinal (Kogut, 1990). Es por esta circunstancia que los mecanismos de inmunidad se enfocarán a aquéllos presentes en la mucosa del intestino.

TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO AL INTESTINO.

El aparato digestivo tiene como característica el estar en contacto con una gran cantidad de antígenos, por lo que es necesaria una gran cantidad de tejido linfoide para mantener la homeostasis. Desde el punto de vista inmunológico, el intestino constituye una gran proporción del sistema inmune de los animales. En las aves como en los mamíferos el tejido linfoide asociado al intestino (GALT por sus siglas en inglés) representa a un componente del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT por sus siglas en inglés), en el cual también se incluyen al tejido linfoide nasofaríngeo, bronquial, salivar y genito urinario. Este tejido linfoide asociado a mucosas es la primera línea de defensa en las superficies mucosas; en él se encuentran células de tipo presentadoras de antígeno (macrófagos), inmunorreguladoras (linfocitos T CD4⁺) y efectoras (linfocitos T CD8⁺) (Befus *et al*, 1980; Lillehoj, 1996; Ventura y Campos, 1992).

En las aves el GALT incluye a estructuras linfoides organizadas tales como la bolsa de Fabricio, tonsilas cecales, placas de Peyer, divertículo de Meckel y agregados linfocitarios diseminados a lo largo del espacio intraepitelial y la lámina *propria* del tracto gastroentérico (Lillehoj y Chung, 1992; Lillehoj, 1996).

Dentro de la mucosa intestinal, hay dos regiones anatómicas que contienen células inmunes: el epitelio y la lámina *propria*, los cuales están morfológicamente separados por una membrana basal. Se ha observado que la población de linfocitos presente en el intestino de los pollos contiene 80% de linfocitos, 10-15% de monocitos, aproximadamente 5% de otras células mononucleares y menos del 1% de leucocitos polimorfonucleares y células plasmáticas (Lillehoj, 1996).

El papel de los componentes del GALT en la defensa del huésped contra las infecciones comprende complejas interacciones entre los linfocitos, células epiteliales, células dendríticas y macrófagos residentes; éstos están involucrados en el proceso de defensa del huésped para generar un microambiente incompatible con la supervivencia de patógenos. Factores específicos y no específicos tales como inmunoglobulinas, péptidos antimicrobiales intestinales y mucina, influyen en la colonización de patógenos (Lillehoj, 1996).

En la respuesta antígeno-específica contra los patógenos se encuentran involucradas las dos poblaciones de linfocitos: linfocitos T y linfocitos B. Los linfocitos B expresan sobre su superficie moléculas de inmunoglobulinas IgA e IgM con una alta especificidad para los antígenos. Los linfocitos T reconocen a los antígenos procesados que se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígenos (Rothwell *et al*, 1995; Lillehoj, 1996).

La respuesta inmune mediada por células incluye tanto la activación antígeno-específica y no específica de linfocitos T, NK y macrófagos. Los linfocitos T comprenden dos subpoblaciones funcionalmente distintas que se distinguen entre sí por los marcadores de superficie expresados en ellas. Estas dos subpoblaciones de linfocitos T son: linfocitos T citotóxicos CD8⁺ que reconocen antígenos extraños unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I por sus siglas en inglés) y los linfocitos T

cooperadores CD4⁺ que reconocen a antígenos en asociación con MHC clase II (Lillehoj, 1996).

En el pollo las inmunoglobulinas predominantes en las secreciones intestinales son la IgM e IgA. La IgM es un pentámero muy efectivo en la eliminación de patógenos. La principal función de la IgA secretoria es la neutralización de virus y toxinas en el lumen intestinal y evita la adherencia y colonización de la superficie de la mucosa por patógenos entéricos (Rothwell *et al*, 1995; Lillehoj, 1996).

RESPUESTA INMUNE EN LA COCCIDIOSIS.

La respuesta del hospedero a la infección por coccidias es compleja e involucra tanto a la respuesta inmune celular como a la humoral.

Después de la unión del antígeno a los linfocitos B que expresan las inmunoglobulinas IgD e IgM en su superficie, ocurre la división celular y la expansión clonal; los linfocitos B diferenciados secretan inmunoglobulinas específicas al antígeno. En contraste los linfocitos T reconocen antígenos que han sido procesados por las células presentadoras de antígeno (CPA) y la unión ocurre únicamente en conjunción con las moléculas de histocompatibilidad expresados en la superficie de estas CPA (Rothwell *et al*, 1995; Lillehoj, 1996).

RESPUESTA HUMORAL AL PARÁSITO.

Como se mencionó anteriormente, en el pollo se encuentran IgA e IgM en las secreciones del intestino. Estudios *in vitro* con anticuerpos monoclonales han demostrado que éstos tienen actividad inhibitoria sobre los esporozoitos de *E. acervulina* en la invasión del parásito a los linfocitos T CD8⁺ (Sasai, *et al* 1996).

Se asume que las inmunoglobulinas ayudan al control del parásito, ya que pueden atacar la superficie del patógeno y prevenir su unión al epitelio por bloqueo directo o reducción de la motilidad del parásito. De esta manera el parásito puede ser susceptible a la limpieza natural de las mucosas. Los animales infectados con la coccidia producen anticuerpos contra el parásito de 2 a 4 semanas postinfección. Esta respuesta de anticuerpos

a las coccidias, tanto en suero como en la mucosa del intestino, puede ser detectada una semana después de la inoculación de ooquistes; sin embargo, algunas investigaciones muestran que no hay una correlación entre los niveles de anticuerpos y el grado de protección. Con base en estas observaciones, se especula que la respuesta mediada por anticuerpos juega un papel menor en la protección contra la coccidiosis (Lillehoj y Trout, 1993; Lillehoj, 1996; Talebi y Mulcahy, 1995).

RESPUESTA CELULAR AL PARÁSITO.

En la coccidiosis se consideran dos aspectos:

1).- La resistencia, que se refiere tanto a la constitución genética, estado fisiológico y barreras físico químicas del hospedero, como respuesta no específica seguida a una infección, donde principalmente participan linfocitos NK y macrófagos (Lillehoj y Trout, 1994; Lillehoj, 1996).

2).- La inmunidad, que se refiere a la respuesta específica que resulta de una infección secundaria, donde intervienen principalmente los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ (Lillehoj y Trout, 1994; Trout y Lillehoj, 1993, 1995).

Talebi y Mulcahy (1995) reportan que la respuesta celular de los pollos infectados con *E. maxima* incrementa gradualmente hasta alcanzar un pico en la proliferación de linfocitos de sangre periférica en dos semanas. Se sabe que en una infección por *E. tenella* hay un incremento de linfocitos CD8⁺ y CD4⁺ en sangre periférica a los 8 días postinoculación. En lo que se refiere a la población de linfocitos T CD4⁺, se ha observado una disminución a los 9 - 10 días después de la infección primaria (Breed, Dorrestein y Vermeulen; 1996).

Bumstead *et al* (1995) reportan un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ en sangre periférica durante 2 a 3 semanas después de una infección primaria. Se especula que estas células representan una población que fue activada desde el intestino y que en respuesta a una infección secundaria es rápidamente expandida y dirigida al sitio de infección para desempeñar su papel en el combate a la reinfección.

Se han realizado investigaciones *in vivo*, donde se ha tratado de dilucidar la importancia que tiene cada una de las diferentes poblaciones celulares que intervienen en la respuesta inmune. Trout y Lillehoj (1996), reportan que los linfocitos T CD4⁺ juegan un papel importante en la respuesta inmune primaria en una infección por *E. tenella*. Los autores observaron que al inocular anticuerpos monoclonales contra los marcadores de superficie CD4 de estas células, los pollos produjeron de manera significativa más ooquistes en comparación con aquéllos que no tuvieron deplesión de linfocitos T CD4⁺. Se piensa que el control de la respuesta inmune puede estar dado por la producción de interferón gamma (INF γ).

Lo mismo se observó en aves inoculadas con anticuerpos monoclonales anti CD8, lo que hace pensar que existe la posibilidad de que estas células CD8⁺ ataquen y eliminen las células epiteliales parasitadas por la coccidia (Trout y Lillehoj, 1996).

LA RESPUESTA INMUNE EN EL INTESTINO vs INFECCIÓN POR COCCIDIAS

La respuesta inmune del intestino a los patógenos involucra complejas interacciones de factores solubles, leucocitos, células epiteliales, células endoteliales y otros factores fisiológicos del tejido linfoide asociado al intestino (Lillehoj, 1996). En la infección causada por coccidias en pollos, se ha observado el proceso dinámico de los leucocitos presentes en la lámina *propria* del intestino. Los linfocitos B, así como las células plasmáticas IgA⁺ e IgM⁺ sufren incremento en número durante la infección. Esto se ha observado tanto en pollos inmunizados como sin inmunizar, ante el desafío con coccidias (Rothwell *et al*, 1995; Vervelde *et al*, 1996). Sin embargo, investigaciones realizadas anteriormente no han encontrado una correlación entre el incremento de estas células y el nivel de anticuerpos, con el grado de protección ante un desafío (Lillehoj y Trout, 1993).

Se han encontrado diferencias en la cantidad de macrófagos presentes en el intestino entre pollos inmunizados y no inmunes. El papel de estas células consiste en la fagocitosis y el procesamiento del antígeno para su presentación a los linfocitos T CD4⁺ e inducir la respuesta inmune (Vervelde *et al*, 1996). Otra función que tienen los macrófagos es la producción de citocinas reguladoras como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α por sus

siglas en inglés), que puede activar tanto a linfocitos B como linfocitos T, atraer células fagocíticas al sitio de infección y estimular a otras células para que secreten citocinas (Vervelde *et al*, 1996). Sin embargo se ha reportado que los macrófagos pueden estar involucrados en el transporte de esporozoitos a la submucosa (Trout y Lillehoj, 1993; 1995).

Se ha mostrado que las citocinas influyen en el curso de la infección por coccidias (Kogut, 1992). Recientemente se han identificado de manera parcial las linfocinas IL-2 e INF γ (García, 1995) en las infecciones por coccidia en pollos. El papel específico con el que actúan estas linfocinas en la coccidiosis aún no ha sido esclarecido, ya que no se han logrado obtener linfocinas recombinantes; así como tampoco se han realizado ensayos para determinar su acción en el ave viva (Lillehoj y Trout, 1993).

Después de una infección primaria el número de linfocitos CD4⁺ se incrementa y excede en cantidad a los linfocitos CD8⁺ (Rothwell *et al*, 1995; Vervelde *et al*, 1996). Los linfocitos CD4⁺ raramente se encuentran junto a los esporozoitos, lo que hace pensar que no actúan directamente como efectores. Sin embargo, su presencia en la lámina *propria* sugiere que juegan un papel importante en la inducción de la respuesta inmune a través de la producción de citocinas, las cuales estimulan una gran variedad de células (Vervelde *et al*, 1996).

En estudios realizados con aves inmunes a *Eimeria spp*, los cambios observados en las poblaciones de linfocitos muestran un incremento de los linfocitos CD8⁺ después de un desafío; este incremento sugiere una infiltración de estas células o la expansión de clonas reactivas que entran en contacto con células infectadas por el parásito (Bumstead *et al*, 1995; Vervelde *et al* 1996; Trout y Lillehoj, 1995). Las células epiteliales al ser infectadas por el parásito expresan partículas de éste unidas a las moléculas clase I del MHC sobre su superficie, que es reconocido por los linfocitos T CD8⁺ provocando una respuesta citotóxica. Los linfocitos T CD8⁺ parecen inhibir la transferencia de esporozoitos a los enterocitos y pueden atacar a la células epiteliales infectadas (Lillehoj y Trout, 1994; Trout y Lillehoj, 1995). Se han observado linfocitos T CD8⁺ en contacto con las células

epiteliales infectadas con el parásito, lo que sugiere que estas células epiteliales son el blanco de los linfocitos T citotóxicos (Lillehoj y Trout, 1994).

Con base en esta información se puede afirmar que una de las principales células responsable del control de la infección por coccidias es el linfocito T CD8⁺. Como lo mencionan Trout y Lillehoj (1993,1995), la importancia de este linfocito radica en la eliminación de las células intestinales infectadas por el parásito. Por esta razón es importante contar con pruebas de laboratorio que evalúen la respuesta inmune de las aves contra las coccidias.

Hasta ahora únicamente se han llevado a cabo algunos métodos con fines de investigación para evaluar esta respuesta inmune celular contra la coccidiosis.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA COCCIDIOSIS.

En la coccidiosis aviar se reporta la evaluación de la respuesta inmune tanto humoral como celular de las aves infectadas experimentalmente. Esta evaluación es a través de un inmunoensayo de captura de anticuerpos (ELISA) (Taleby y Mulcahy, 1995) y pruebas de inmunotransferencia (Bumstead *et al*, 1995). Para la evaluación de la respuesta inmune celular se han utilizado los métodos de citometría de flujo y pruebas de linfoproliferación antígeno-específica (Bumstead *et al*, 1995; Martin, Awadalla y Lillehoj, 1995; Breed, Dorrestein y Vermeulen, 1996; Taleby y Mulcahy, 1995).

Estas dos últimas pruebas presentan el inconveniente de necesitar equipo especializado para su lectura e interpretación. Así mismo en la citometría de flujo es necesario contar con anticuerpos monoclonales que detecten los marcadores de superficie de la célula para hacer la diferenciación de las poblaciones celulares. En la prueba de linfoproliferación antígeno-específica es necesario la incorporación de isótopos radioactivos (como timidina exógena radiomarcada) a las células, en este caso el inconveniente es que se debe usar una cantidad mínima necesaria para prevenir el daño por radiación a las células pero a la vez que sea suficiente para poder leer con un contador de centelleo (Lillehoj, 1991).

Hasta ahora no han sido reportados ensayos de citotoxicidad para corroborar la acción de las células citotóxicas sobre sus células blanco en la infección por coccidias en aves. Actualmente existe un kit comercial que evalúa la citotoxicidad por medio de la detección de una enzima presente en todas las células (Lakeside® Boehringer). Dicha prueba detecta la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa que ha sido identificada en células de ratas y otros vertebrados incluyendo a las aves (Lehninger, 1985; Bell, 1971). El principio de esta prueba consiste en la detección de la enzima liberada al sobrenadante del cultivo celular cuando la célula es lisada por la acción de los linfocitos citotóxicos. Esta prueba tiene las ventajas de no utilizar isótopos radiactivos, además de mostrar una correlación entre el nivel de enzima detectada y el grado de destrucción celular.

OBJETIVO

Tener evidencia de que los linfocitos T esplénicos reconocen péptidos en células blanco infectadas por *Eimeria tenella* y evaluar su efecto citotóxico.

HIPÓTESIS

Los linfocitos T esplénicos reconocen péptidos presentados por células blanco infectadas con *Eimeria tenella*, lo que induce un efecto citotóxico para controlar la infección.

OBJETIVO

Tener evidencia de que los linfocitos T esplénicos reconocen péptidos en células blanco infectadas por *Eimeria tenella* y evaluar su efecto citotóxico.

HIPÓTESIS

Los linfocitos T esplénicos reconocen péptidos presentados por células blanco infectadas con *Eimeria tenella*, lo que induce un efecto citotóxico para controlar la infección.

MATERIAL Y MÉTODOS.

PREPARACIÓN DE LA CEPA DE *Eimeria tenella*.

Se utilizó la cepa MOR-80 de *E. tenella*, del Departamento de Producción Animal: Aves (DPA: A), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Es una cepa de mediana patogenicidad que se aisló en una granja de pollos de engorda que se ubica en el estado de Querétaro, México. El parásito se replicó en 40 pollos de engorda de 4 semanas de edad y los ooquistes fueron cosechados, esporulados y almacenados en dicromato de potasio al 2.5% como lo describen Long *et al* (1976).

Los ooquistes fueron lavados por centrifugación con agua destilada para retirar el dicromato de potasio. Se concentraron y fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 4% durante 30 minutos, posteriormente se lavaron por centrifugación con agua destilada estéril (Zhang *et al* 1997).

OBTENCIÓN DE ESPOROZOITOS.

Para la obtención de los esporozoitos fue preparada una suspensión de $5-6 \times 10^6$ ooquistes en 5 ml de solución salina amortiguada de Hank's (HBSS por sus siglas en inglés). Esta suspensión se colocó en un tubo de centrifuga de 50 ml que contenía un volumen de 5 ml de perlas de vidrio. Se agitó en un vortex durante 60 segundos y posteriormente se lavó con 50 ml de HBSS y se concentró por centrifugación. El botón de esporoquistes fue suspendido en 50 ml de HBSS con sales de taurodeoxicolato de sodio al 4% y tripsina al 0.25%. Esta suspensión se incubó a baño María a 40.5°C durante 40 minutos. Los esporozoitos se lavaron por centrifugación a 1800 g durante 10 minutos y se suspendieron en medio RPMI-1640 del que se utilizó para el cultivo primario de las células de riñón de pollo. Los esporozoitos fueron contados con una cámara de Neubauer y se ajustaron a la concentración adecuada para tener una relación de 5:1 esporozoitos por célula renal (Patton y Brigman, 1979; Zhang *et al* 1997).

INMUNIZACION DE LAS AVES.

Se utilizaron 20 pollos de engorda comerciales (Hubbard x Hubbard) de un día de edad, que se dividieron en 5 grupos de 4 aves cada uno. A dos grupos se les administró el parásito *E. tenella* a una dosis de 1,000 ooquistes/día/ave durante 14 días para inducir una inmunidad sólida en los pollos (Joyner y Norton, 1979); al día 15 se les administró una dosis de desafío de 50,000 ooquistes esporulados. Dos grupos se utilizaron como aves testigo sin inmunizar y uno más se utilizó para la obtención de células renales.

Estas aves se alojaron en baterías de las unidades de aislamiento del DPA: A. Se les proporcionó alimento sin anticoccidiano y agua *ad libitum*. Después de 10 días de la última dosis del parásito, las aves se sacrificaron para la obtención de los bazos según la técnica descrita por Kogut (1992).

AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T.

Se colectaron asépticamente los bazos de las aves diez días después del proceso de inmunización. Los bazos se colocaron en bolsas de tela de organza (4 x 4 cm) que a su vez estaban en cajas de Petri y se les adicionó 10 ml de HBSS. Los bazos se maceraron con émbolos de jeringas estériles y las células esplénicas se colocaron en tubos de 15 ml, posteriormente se centrifugaron a 250 g durante 10 minutos a 4°C. El paquete centrifugado, se suspendió en 4 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. La suspensión celular fue agregada lentamente a través de la pared de un tubo que contenía 4 ml de ficoll hypaque 1077 (Ficoll hypaque, densidad 1.070 ± 0.001 g/ml Sigma Chemicals St. Louis MO). Se centrifugó a 500 g durante 20 minutos a 20°C y se recuperaron las células de la interfase con una pipeta Pasteur; las células fueron lavadas tres veces con HBSS y se realizó una suspensión de estas células separadas en medio RPMI 1640, libre de suero y suplementado con L-glutamina (2mM), piruvato de sodio (1mM), 100 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin (P-E) y 7.5 µg/ml de concanavalina A (Con-A). La viabilidad de las células obtenidas fue determinada con la tinción de Tripan-

azul al 0.1% y la densidad celular se ajustó a 1×10^7 células/ml (Martin, Lillehoj, Kasper and Bacon 1993; Miller, Bowma and Schat 1994).

Esta metodología se realizó por cada grupo de aves, para después enfrentar los linfocitos T en los cultivos de células de riñón infectadas y no infectadas.

PREPARACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE RIÑÓN.

Para la obtención del cultivo primario de células de riñón se utilizaron aves del grupo destinado para dicho fin. Se utilizó la metodología originalmente descrita por Doran (1971) con las modificaciones hechas por Zhang *et al* (1996). De cada una de las aves se hicieron cultivos por separado que se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con L-glutamina (2mM), piruvato de sodio (1mM), P-E y suero fetal bovino al 10%. Se ajustó a una concentración de 1×10^6 células/ml y se adicionaron 100 μ l de esta suspensión en cada pozo de una placa de cultivo celular (Nunc F96) que contenía 100 μ l de medio de cultivo. Se incubó la placa en una estufa de cultivo celular a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas, para después lavar cada uno de los pozos con HBSS y remover las células que no se adherieron a la placa; después de lavar los pozos se les adicionó 200 μ l de medio de cultivo nuevo. A las 48 horas se observó un 80 % de confluencia en la monocapa celular.

INFECCIÓN DE CÉLULAS RENALES.

Para calcular la cantidad de esporozoitos que se utilizó en la infección del cultivo celular, a 9 pozos testigo se les adicionó 200 μ l de HBSS sin calcio ni magnesio con 0.05% de tripsina a cada uno. Se dejó incubar la placa a 37°C con 5% de CO₂ durante 3 a 5 minutos. Se observó la placa en un microscopio invertido para corroborar que las células se desprendieran del fondo de la placa, se colectaron y fueron contadas en una cámara de Neubauer; la cantidad que se contó fue de 30,000 células aproximadamente en cada pozo.

Con base en la cantidad de células presentes en cada pozo se ajustó la concentración a una relación de 5:1 (esporozoitos: células de riñón) para la infección. Los esporozoitos se ajustaron a una concentración de 1,500,000/ml y se adicionaron en un volumen de 100 μ l a

cada pozo. Se dejaron incubar durante 12 horas en estufa de cultivo celular a 37°C con 5% de CO₂.

Después del periodo de incubación se lavaron las placas con HBSS para remover los esporozoitos que no penetraron en las células; luego, a cada pozo se le adicionó 200 µl de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con L-glutamina (2mM), piruvato de sodio (1mM), P-E y suero fetal bovino al 10%.

DETERMINACION DE LA CITOTOXICIDAD.

Para evidenciar el efecto citotóxico de los linfocitos sobre las células renales se utilizó un kit comercial de detección de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Lakeside® Boehringer). Es una prueba colorimétrica para evaluar la muerte y lisis celular, que se basa en la medición de la actividad de esta enzima liberada por las células dañadas y que se encuentra presente en el sobrenadante del cultivo celular.

Se hicieron cuatro grupos, donde cada uno correspondió a los grupos de aves inmunizadas así como los grupos testigos. Para determinar el efecto citotóxico de los linfocitos sobre las células de riñón infectadas, así como la existencia de la respuesta alogénica por la diferencia del MHC, se enfrentaron células infectadas y no infectadas a linfocitos obtenidos de aves inmunes y de aves no inmunes con el siguiente modelo:

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
C. C. R. P.*	C. C. R. P.	C. C. R. P.	C. C. R. P.
+	+	+	+
Esporozoitos	Linfocitos T de aves inmunes	Esporozoitos	Linfocitos T de aves no inmunes
+		+	
Linfocitos T de aves inmunes		Linfocitos T de aves no inmunes	

* Cultivo celular de riñón de pollo.

Los linfocitos se adicionaron en una relación de 20:1 (células efectoras: célula blanco) y por cada grupo fueron ocupados 9 pozos. Se realizaron cuatro repeticiones por grupo y en cada una de las repeticiones se incluyeron igual número de pozos como testigos de las diferentes poblaciones celulares que se utilizaron. Estos pozos testigo incluían linfocitos, células renales infectadas y no infectadas. Asimismo, se incluyeron testigos de liberación alta de LDH de los linfocitos y células renales. A estos testigos se les adicionó Triton® X-100 en 100 µl de medio de cultivo a una concentración del 2% (Lakeside® Boehringer).

OBTENCION DE LOS SOBRENADANTES.

Las placas se dejaron incubar durante 4 horas en una estufa de cultivo celular a 37°C con 5% de CO₂. Después de se centrifugaron a 250 g durante 5 minutos y se tomaron 100 µl de los sobrenadantes y se pasaron a una placa estéril para realizar la detección de la presencia de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en cada uno de los pozos. La técnica de detección de LDH se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Lakeside® Boehringer).

Después de haber agregado las soluciones correspondientes a cada pozo y de haber incubado durante media hora a temperatura del laboratorio, se le adicionó 50 µl de ácido clorhídrico (HCl) a una concentración 1 normal, para detener la reacción de color.

Se realizaron dos lecturas de los sobrenadantes en un lector de ELISA, la primera con un filtro de 480 nm y una segunda de referencia con un filtro de 650 nm. Se obtuvo la diferencia de la lectura a 480 nm menos la lectura a 650 nm para determinar la cantidad de LDH presente en los sobrenadantes de cada uno de los pozos.

PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD.

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad, se realizó una transformación Log_e de la diferencia de las lecturas de los resultados obtenidos en la detección de la cantidad de LDH detectada (Bennett y Riley, 1992). Se calculó el valor promedio de cada 3 pozos en cada uno de los grupos y estos valores se utilizaron en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = \frac{(\text{LDH de esplenocitos y células renales} - \text{LDH esplenocitos}) - \text{control basal}}{\text{control alto de LDH} - \text{control basal}} \times 100$$

Donde el control basal está dado por el valor obtenido de los controles de células renales y el control alto esta dado por aquellos pozos del mismo tipo de células a los que se les adicionó Triton® X-100.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizó la transformación Log_e (480 nm – 650 nm) de los resultados obtenidos en la detección de la cantidad de LDH detectada (Bennett y Riley, 1992). Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y se determinaron las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre grupos. Para evaluar el efecto de la infección así como el efecto de la inmunización, se analizaron los datos obtenidos bajo un modelo factorial de 2x2, donde el factor A correspondió a los grupos inmune y no inmune y el factor B correspondió a los grupos infectado y no infectado.

Se realizó la prueba de Tukey para determinar las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre las medias de los diferentes grupos, para lo cual se utilizó el paquete estadístico SAS (Zar, 1984).

RESULTADOS.

DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD.

Como lo muestra el cuadro N° 1, se detectó mayor cantidad de LDH en aquellos sobrenadantes donde se incubaron tanto las células renales infectadas y no infectadas junto con los linfocitos que provenían de aves inmunes al parásito (grupos A y B). Estos grupos no fueron estadísticamente diferentes entre ellos ($p > 0.05$), sin embargo si se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.001$) en comparación con los grupos de aves no inmunes (grupos C y D). Entre los grupos donde las células esplénicas provenían de aves no inmunes, hubo diferencia estadística entre el grupo infectado (grupo C) con respecto al no infectado (grupo D).

CUADRO 1: CANTIDAD DETECTADA DE LDH PRESENTE EN LOS SOBRENADANTES DE LOS CULTIVOS CELULARES.

LDH EXPRESADA EN Log_e (480 nm – 650 nm) \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR [^]		
Aves inmunes	GRUPO A	0.179 (\pm 0.06) ^a
	GRUPO B	0.167 (\pm 0.08) ^a
Aves no inmunes	GRUPO C	0.110 (\pm 0.07) ^b
	GRUPO D	0.046 (\pm 0.05) ^c

[^] Los valores dentro de la columna seguidos por diferente literal son estadísticamente diferentes, $p < 0.001$ (Tukey).

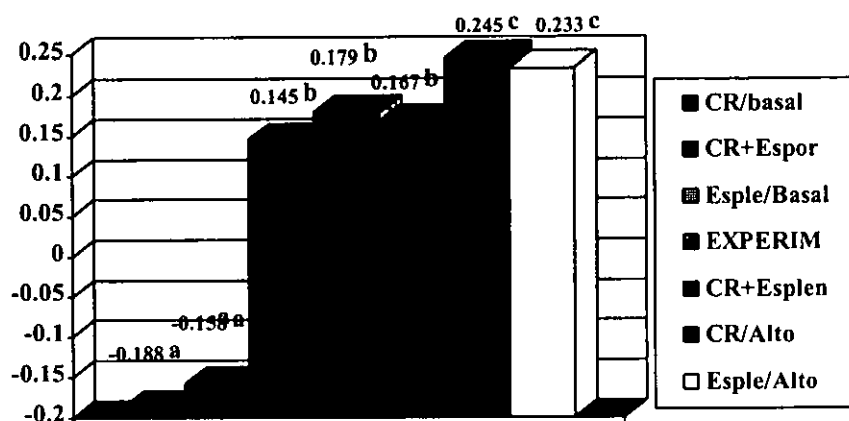
LIBERACION DE LDH EN LOS GRUPOS DE AVES INMUNES.

En la figura 1 se muestra la cantidad de LDH obtenida por la transformación de Log_e de las diferencias de las lecturas (480 nm – 650 nm) de los sobrenadantes. Como se esperaba, la cantidad de LDH detectada fue mayor en aquellos grupos testigo a los que se les adicionó Triton® X-100. Se observó también una cantidad mayor en el grupo experimental (sin llegar a los niveles del grupo testigo alto) donde se presentaron los esplenocitos a células renales infectadas; sin embargo, la cantidad de LDH no fue

estadísticamente diferente ($p>0.05$) con respecto a la del grupo donde se adicionaron los linfocitos esplénicos a los pozos.

Los niveles más bajos de LDH se detectaron en los grupos testigo de liberación basal de las células renales tanto infectadas como no infectadas.

FIGURA 1: CANTIDAD DE LDH Log_e (480 nm – 650 nm) EN LOS SOBRENADANTES DE CELULAS PROVENIENTES DE AVES INMUNES[^].



[^] Valores seguidos de literales diferentes presentan diferencia estadística $p<0.001$ (Tukey).

Donde:

CR/basal = Grupo testigo de liberación basal de LDH de las células de riñón de pollo.

CR+Espor = Liberación de LDH de las células de riñón de pollo infectadas con esporozoitos de *E. tenella*.

Esple/basal = Grupo testigo de liberación basal de LDH de los linfocitos esplénicos.

EXPERIM = Liberación de LDH de las células de riñón de pollo infectadas y presentadas a los linfocitos esplénicos de aves inmunes.

CR+Esplen = Liberación de LDH de las células de riñón de pollo y linfocitos esplénicos.

CR/Alto = Grupo testigo de liberación alta de LDH de las células de riñón de pollo con Triton® X-100

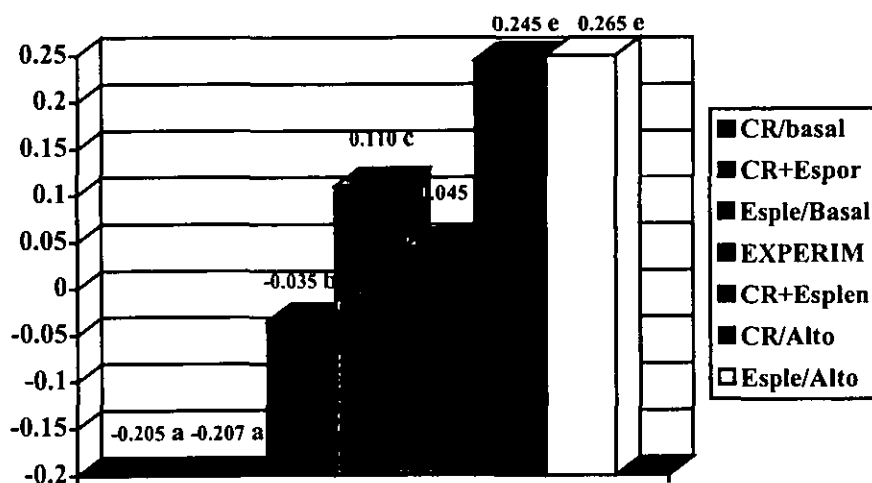
Esple/alto = Grupo testigo de liberación alta de LDH de los linfocitos esplénicos con Triton® X-100

LIBERACION DE LDH EN LOS GRUPOS DE AVES NO INMUNES.

Al igual que en los grupos de aves inmunes, los niveles más altos de LDH fueron detectados en aquellos grupos testigos de células de riñón y esplenocitos a los que se les adicionó Triton® X-100. No se encontró diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre estos grupos, así como tampoco en aquéllos donde se evaluó la cantidad de LDH basal en las células de riñón infectadas y sin infectar.

En este caso sí existió diferencia estadística ($p < 0.001$) entre el grupo experimental y los grupos testigos donde se utilizaron esplenocitos (Figura 2).

FIGURA 2: CANTIDAD DE LDH Log_e (480 nm – 650 nm) EN LOS SOBRENADANTES DE CELULAS PROVENIENTES DE AVES NO INMUNES^A.



^A Valores seguidos de literales diferentes presentan diferencia estadística $p < 0.001$ (Tukey).

Donde:

CR/basal = Grupo testigo de liberación basal de LDH de las células de riñón de pollo.

CR+Espor = Liberación de LDH de las células de riñón de pollo infectadas con esporozoitos de *E. tenella*.

Esple/basal = Grupo testigo de liberación basal de LDH de los linfocitos esplénicos.

EXPERIM = Liberación de LDH de las células de riñón de pollo infectadas y presentadas a los linfocitos esplénicos de aves no inmunes

CR+Esplen = Liberación de LDH de las células de riñón de pollo y linfocitos esplénicos.

CR/Alto = Grupo testigo de liberación alta de LDH de las células de riñón de pollo con Triton® X-100

Esple/alto = Grupo testigo de liberación alta de LDH de los linfocitos esplénicos con Triton® X-100.

PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD

Este fue evaluado tomando en consideración un modelo factorial 2 x 2, donde el factor A correspondió a aves inmunes y no inmunes y el factor B correspondió a células renales infectadas y no infectadas. Como se muestra en el cuadro N° 2, el porcentaje de citotoxicidad siempre fue mayor ($p < 0.001$) en aquellos grupos donde se adicionaron las células esplénicas a las células renales infectadas con los esporozoitos de *E. tenella*.

Esto se observó tanto en el grupo de aves inmunes como en el de no inmunes; por otro lado, se detectó un mayor porcentaje de citotoxicidad en los grupos de aves no inmunes en comparación con los grupos de aves inmunes; encontrándose tanto en los cultivos infectados como en aquéllos sin infectar.

CUADRO N° 2: DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LINFOCITOS T ESPLÉNICOS EN CÉLULAS DE RIÑÓN DE POLLO.

ORIGEN DE LOS LINFOCITOS ESPLÉNICOS	CULTIVOS DE CELULAS DE RIÑÓN ^A	
	INFECTADOS ^B	NO INFECTADOS ^B
AVES INMUNES ^C	51.1 (\pm 12.2) ^a	48.78 (\pm 9.0) ^c
AVES NO INMUNES ^C	78.6 (\pm 15.8) ^b	63.99 (\pm 12.8) ^d

^A Datos expresados en porcentaje \pm desviación estándar.

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

^C Los valores dentro de la misma fila seguidos por diferente literal son estadísticamente diferentes, $p < 0.001$ (Tukey).

DISCUSIÓN

A pesar del uso de anticoccidianos, la coccidiosis continúa siendo el principal problema parasitario en la industria avícola por lo que las investigaciones se han orientado a la búsqueda de nuevas estrategias para su control. En el campo de la inmunología, encontrar el o los puntos clave que desencadenen la respuesta inmune y controle la infección antes que el parásito cause daño, ha sido el objetivo de múltiples investigaciones. Estas se han dirigido a conocer los mecanismos de la respuesta inmune celular, ya que juega uno de los papeles más importantes en la protección de un individuo contra patógenos intracelulares (Schat, 1994).

En el presente trabajo se encontró evidencia de la destrucción de células infectadas con esporozoitos por la acción de células esplénicas. Esta acción citotóxica por parte de los esplenocitos contra células infectadas, ha sido documentada en investigaciones realizadas con *Toxoplasma gondii* en modelos con ratones. En estas investigaciones se reporta que la actividad citotóxica se realiza por linfocitos T CD8⁺ y linfocitos NK principalmente (Hauser y Tsai, 1986; Hakim *et al* 1991; Subuaste, Koniaris y Remington, 1991).

Con el modelo de evaluación de citotoxicidad que se utilizó en la presente investigación, se encontró que tanto en las aves inmunes como en las no inmunes hubo una cantidad mayor de la enzima lactato deshidrogenasa presente en los sobrenadantes donde estaban los esplenocitos con las células infectadas. En el caso de las aves inmunes, esto puede sugerir que existe un efecto citotóxico ejercido posiblemente por linfocitos T citotóxicos específicos, mientras que en los grupos de aves no inmunes es probable que la acción citotóxica fuera provocada por linfocitos NK o alguna otra población celular que tenga la capacidad de lisis de las células infectadas.

Los mecanismos involucrados en la citotoxicidad mediada por células han sido revisados por Kägi *et al* (1995), quien menciona que hay dos clases de células que son capaces de ejercer un efecto citotóxico que depende del contacto entre células. Estas células son los linfocitos T citotóxicos y NK; en el caso de los primeros, actúan específicamente

sobre células blanco que presentan péptidos antigénicos que han sido procesados y que se expresan en la superficie celular con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I por sus siglas en inglés). En cuanto a los linfocitos NK, éstos ejercen su efecto citotóxico sobre una variedad de células blanco sin tener la restricción de reconocer las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

En el caso de las aves todavía no están bien comprendidos con detalle los mecanismos involucrados en la resistencia y protección contra muchos agentes que causan enfermedad. Se sabe que la inmunidad mediada por células juega un papel importante en el control de las principales enfermedades de las aves como la salmonelosis, enfermedad de Marek, coccidiosis y leucocitoozoonosis (Lillehoj, 1991).

Se asume que ciertas poblaciones celulares que intervienen en la respuesta inmune mediada por células, como son los linfocitos T citotóxicos y NK tienen el mismo comportamiento en las aves y en los mamíferos. En las infecciones virales, la respuesta inmune mediada por células es importante ya que se han observado diferentes mecanismos celulares en una respuesta antígeno-específica que resulta como consecuencia de la infección natural o vacunación. Una de las poblaciones involucradas son linfocitos T citotóxicos y aquellas células que participan en la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC por sus siglas en inglés) (Schat, 1991, 1994).

Los linfocitos NK, así como los macrófagos, forman una parte importante de la defensa natural o resistencia contra infecciones y células tumorales en individuos no inmunes. El papel de los linfocitos NK en la resistencia es importante porque juegan una parte activa en la primera línea de defensa del huésped. Estos se han observado en la proximidad del intestino donde su actividad y número se incrementan después de una infección primaria y/o secundaria por *Eimeria* sp (Lillehoj 1991).

En lo que se refiere a este trabajo, los resultados obtenidos sugieren que las poblaciones celulares antes mencionadas están involucradas de una manera conjunta, ya que se pudo observar un efecto citotóxico tanto en el grupo de aves inmunes así como en el de aves no inmunes. Por esta razón se revisaron algunos aspectos de las diferentes

poblaciones que ejercieron un posible efecto sobre aquellas células infectadas con el parásito.

Considerando que con la metodología empleada en este trabajo no se puede purificar al 100% una población celular, los resultados obtenidos se deben al efecto en conjunto de las diferentes células obtenidas por centrifugación con ficoll-hipaque. Sin embargo, fue evidente el efecto citotóxico por parte de estas células sobre aquellas que estaban infectadas y los posibles mecanismos a través de los cuales pudieron ser lisadas estas células se explican a continuación:

Los linfocitos T son células linfoides que se diferencian en el timo y durante su maduración dentro de éste, inician la expresión del receptor de adherencia a antígenos sobre su membrana llamado receptor de célula T (TCR por sus siglas en inglés). Después salen del timo y migran hacia varios tejidos linfoides que incluyen el bazo, tonsilas cecales, tejido linfoide asociado a mucosas en el intestino y tracto respiratorio (Lillehoj 1991; Kuby, 1997).

Muchos aspectos en el desarrollo de los linfocitos T en las aves son similares a los que suceden en mamíferos y los receptores de estas células así como algunas moléculas accesorias que se han descrito están presentes en las células inmunes de las aves (Chen *et al*, 1994; Vainio e Imhof, 1995).

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales (AcM) específicos para los antígenos de superficie celular de los linfocitos de las aves, ha permitido incrementar el conocimiento de la expresión y función de estos antígenos en estados normales y de enfermedad en el ave (Lillehoj, 1991). Se han identificado en los linfocitos T de las aves las siguientes moléculas de superficie: CD3, CD4 y CD8. La mayoría de los linfocitos T expresan el complejo molecular CD3 que se sabe está asociado de manera no covalente con los receptores del linfocito T. Estos receptores al igual que en los mamíferos se expresan en las aves como receptores gamma-delta (TCR 1) y alfa-beta (TCR2) (Bucy *et al*, 1998; Lillehoj, 1991; Arstila, Vainio y Lassila 1994; Schat, 1994; Vainio e Imhof, 1995).

Aproximadamente el 85 % de los linfocitos T que se encuentran en la sangre en un ave adulta, expresan el marcador CD3, de los cuales el 16% son positivos al marcador

TCR1 (gamma-delta). La mayoría de estas células TCR1 se encuentran en los vasos sinusoides del bazo, así como en el epitelio del intestino de las aves y son CD8⁺. Por otro lado las células TCR2 (alfa-beta), expresan los marcadores CD4⁺ y se encuentran en la cubierta periarterioleolar del bazo y en la lámina *propria* del intestino (Bucy *et al*, 1998; Lillehoj, 1991)

Estos linfocitos T tienen la capacidad de destruir células infectadas por patógenos intracelulares a través de su actividad citotóxica sobre células que han sido invadidas por un virus, bacteria o parásito intracelular. Las funciones efectoras por las cuales los linfocitos T CD8⁺ intervienen en la respuesta inmune se pueden clasificar en tres partes, la primera de ellas es la secreción de IFN γ , ya que se sabe es el principal activador de los mecanismos de defensa de las células huésped en los ratones (Kägi *et al* 1995; Kuby 1997; Stenger y Modlin, 1998).

La segunda función es la lisis de las células blanco que resulta en la liberación del patógeno en el ambiente extracelular. Ahí es susceptible a ser destruido por la acción de macrófagos activados, o bien se reporta que los linfocitos T CD8⁺ podrían directamente reconocer y matar los microorganismos presentes en el ambiente extracelular (Stenger y Modlin, 1998).

Una tercera función efectora es la lisis de la célula blanco por estos linfocitos T que como consecuencia mataría al patógeno intracelular o afectaría su viabilidad (Stenger y Modlin, 1998). Yamashita *et al* (1998) reportan que en el caso de *Toxoplasma gondii* se observó que la lisis de las células infectadas por los linfocitos T citotóxicos no mata al parásito. Sin embargo, las células al ser lisadas liberan al taquizoito en el espacio extracelular donde posiblemente es susceptible a ser destruido por moléculas o células efectoras como anticuerpos, complemento, linfocitos NK y macrófagos.

Los mecanismos a través de los cuales los linfocitos T citotóxicos ejercen su efecto sobre las células blanco son los siguientes: La vía de secreción de proteínas líticas que se polimerizan en la membrana de la célula blanco y forman un poro, por el cual pasará el contenido que se secreta de los granulos del linfocito (granzimas) y ocasiona apoptosis celular (Kägi *et al* 1995; Kuby 1997; Stenger y Modlin, 1998).

En la segunda vía no intervienen proteínas de secreción ya que ésta involucra receptores de membrana conocidos como Fas (Fas ligand) que están presentes en algunos linfocitos T citotóxicos activados por antígenos y receptores conocidos como “receptores de muerte celular” (Fas) sobre la célula blanco. Al hacer contacto las membranas celulares y reconocer los receptores, se inicia una cascada de eventos dentro de la célula blanco que resultan en apoptosis (Kägi *et al* 1995; Kuby 1997; Stenger y Modlin, 1998).

Los linfocitos NK son células parecidas a linfocitos que no expresan receptores de unión a antígenos en su membrana celular, pero presentan gránulos en su citoplasma y tienen la capacidad de lisar células tumorales o infectadas. Se sabe que este tipo de células tiene un papel integral en el control de los parásitos protozoarios ya que promueve la inmunidad mediada por células (Kuby, 1997; Scharon-Kersten y Sher, 1997).

Actualmente los linfocitos NK son reconocidos como una de las principales células efectoras en la resistencia a los parásitos protozoarios. Los mecanismos por los cuales estas células controlan el desarrollo de estos patógenos involucran la producción de citocinas así como una actividad citolítica similar a la que utilizan los linfocitos T citotóxicos (Scharon-Kersten y Sher, 1997).

Los linfocitos NK producen una importante cantidad de IFN γ y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α), dos citocinas importantes para la activación de otras células como los macrófagos, que tienen la capacidad de eliminar microorganismos tanto intracelulares como extracelulares (Kuby, 1997; Scharon-Kersten y Sher, 1997).

Los resultados que se observaron en los grupos de aves inmunes sugieren que hubo un efecto de adición en la citotoxicidad por parte de las diferentes poblaciones de células. Posiblemente al provenir de aves que estuvieron en contacto con el parásito, y al ser estimuladas *in vitro* con el mismo antígeno, la producción de citocinas u otros factores solubles haya estimulado células que ejercieron su efecto citotóxico sobre aquéllas que fueran diferentes en su MHC.

En cuanto al grupo de aves no inmunes, posiblemente el efecto citotóxico se debió a aquellas células encargadas de la resistencia contra aquellos microorganismos intracelulares como lo es la coccidia. Es importante que para futuros trabajos donde se evalúe la

citotoxicidad mediada por células se cuente con la herramienta necesaria para poder purificar cada una de las poblaciones celulares y medir su efecto individual en la respuesta a la infección.

Conocer el papel exacto con el que interviene cada una de las partes involucradas en la respuesta inmune mediada por células puede dar la pauta para el desarrollo de nuevas estrategias, ya que la estimulación de los linfocitos T CD8+ puede tener un papel determinante en el control de *Eimeria*. Asimismo la identificación de antígenos presentes en la coccidia ayudará a encontrar la clave para estimular las poblaciones celulares que se encargan del control del parásito en el ave.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados que se obtuvieron en la presente investigación se puede concluir que:

Las células infectadas por los esporozoitos de *E. tenella* son destruidas en mayor cantidad por células del sistema inmune.

El papel que tiene la resistencia innata a la infección por coccidia en aves puede estar dada por linfocitos NK y debe ser considerada para futuras investigaciones.

La evaluación de la citotoxicidad es evidente y más sencilla utilizando una prueba colorimétrica como la empleada en este trabajo.

LITERATURA CITADA

Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS. Celular and Molecular Immunology. 2nd, *The Saunders Press*. Philadelphia, U.S.A. 1994.

Arakawa A and Xie MQ. Control of coccidiosis in chickens. *J. Protozool. Res.* 3 : 31 - 39 (1993).

Arstila PT, Vainio O and Lassila O. Central role of CD4⁺ T cells in avian immune response. *Poul. Sci.* 1994; 73: 1019-1026.

Bafundo KW. Aplicación practica de las vacunas con ooquistes vivos en la avicultura comercial. VIII Seminario Internacional. *Universidad Georgia y AMEVEA*, Athens Georgia. 1994.

Befus AD, Johnston GA, Leslie and Bienenstock J. Gut associated lymphoid tissue in the chicken. I Morphology, ontogeny and some functional characteristics of Peyer's patches. *J. Immunol.* 125: 2626 - 2632. (1980).

Bell.D.J.: Plasma Enzymes. In: *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. Edited by Bell D.J. and Freeman. 963 - 971. *Academic Press*. London. 1971.

Bennett, S. and Riley, E.M.: The statistical analysis of data from immunoepidemiological studies. *J. Immun. Meth.* 146: 229 - 239 (1992).

Bessay, M.; Vern, Y. L.; Kerbuef, D.; Yvoré, P. And Quéré, P: Changes in intestinal intra-epithelial and systemic T-cell subpopulation after an *Eimeria* infection in chickens: comparative study between *E. acervulina* and *E. tenella*. *Vet. Res.* 27: 503-514 (1996).

Breed, D.G.J.; Dorrestein, J. and Vermeulen, A.: Immunity to *Eimeria tenella* in chickens: Phenotypical and functional changes in peripheral Blood T-cells subsets. *Avian Dis.* 40: 37 - 48. (1996).

Bucy RP, Chen CH, Cihak J, Lösch U and Cooper MD. Avian T cell expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J. Immunol.* 1988; 141: 2200-2205.

Bumstead, M.; Bumstead, N.; Rothwell, L. and Tomley, F.M.: Comparision of immune response in inbred lines of chickens to *Eimeria maxina* and *Eimeria tenella*. *Parasitol.* 111: 143 - 151. (1995)

Chapman, H.D.: Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Path.* 26: 221 – 244 (1997).

Chapman, H.D.: Drug resistance in avian coccidia (a review). *Veterin. Paras.* 15: 11 – 27 (1984).

Chen CH, Göbel TWF, Kubota T and Cooper MD. T cell development in the Chicken. *Poul. Sci.* 1994; 73: 1012-1018.

Current, N.L.; Upton, S.J. and Long: Taxonomy and life cycles. In: Coccidiosis of men and domestic animals. Edited by Long, P. 1-16. *CRC Press*. E.U. 1990.

Danforth H.D. and Augustine, P.C.: Coccidia Vaccines. In Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines. Edited by Wright I.G., 165 - 175. *CRC Press*, Boca Raton, Florida, 1989.

Doran, D.J.: Increasing the yield of *Eimeria tenella* oocysts in cell culture. *J. Parasitol.* 57: 891 - 900 (1971)

García, E.G.: Inmunoprofilaxis y caracterización parcial de linfocinas en la protección de la coccidiosis aviar. Tesis de Maestría. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1995).

Hakim, F.T.; Gazzinelli, R.T.; Denkers, E.; Hieny, S.; Shearer, G.M. and Sher, A.: CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite- infected or antigen-pulsed host cells. *J. Immun.* 147: 2310-2316 (1991).

Hauser, W.E. and Tsai, V.: Acute *Toxoplasma* infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. Gondii* in vitro. *J. Immunol.* 136: 313-319 (1986)

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

Kägi, D.; Lederman, B.; Bürki, K.; Zinkernaged, R.M. and Hengartner, H.: Lymphocyte-mediated cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*: Mechanisms and significance. *Immunol. Rev.* 146: 95-115 (1995).

Kogut MH and Slajchert T. T-Lymphocytes confer protection in chicken against *Eimeria tenella* by production of limphokines. *Immun. and infect. Dis.* 2: 69 - 79 (1992).

Kogut MH. Host specificity of the coccidia. In: Coccidiosis of men and domestic animals. Edited by Long, P. 43 - 63. *CRC Press*. E.U. 1990.

Kuby J. Immunology. 3rd. ed. United States of America. Library of congress cataloging-in-publication data.1997.

Lee EH. La inmunidad contra la coccidiosis: porqué funcionan las vacunas vivas. Curso de actualización sobre coccidiosis aviar. ANECA. México D.F. 1994.

Lehninger AL: Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2^a Ed. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1985.

Levine ND. Taxonomy and life cycles of coccidia. In: The biology of the coccidia. Edited by: Long, P.L. 1 - 34 *University Park Press*. E.U. 1982.

Lillehoj H.S. and Chung K.S.: Postnatal development of T-lymphocyte subpopulations in the intestinal intraepithelium and lamina propria in chickens. *Vet. Immun. and Immunopath.* 31: 347 - 360. (1992)

Lillehoj, H.S. and Trout, .M.: CD8+ T cell - coccidia interactions. *Paras. Tod.* 10: 10 - 14 (1994).

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

Lillehoj, H.S.: Lymphocytes involved in cell-mediated immune response and methods to asses cell-mediated immunity. *Poul. Sci.* 70: 1154 - 1164. (1991).

Lillehoj, H.S.: Role of gut-associated lymphoid tissues in local immunity to enteric pathogens in chickens. Proc. 39th Annual Meeting of Enteric Diseases Control. American Association of Avian Pathologists. Luosville, KY. 1996. 22 - 27. U.S.A (1996)

Long, P.L.; Johnson, J.; McKenzie, M.E.; Perry, E.; Crane, M. ST. J. y Murray, P.K.: Immunization of young broiler chickens with low level infections of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* or *E. maxima*. *Avian Path.* 15: 271 - 278. (1986).

Long, P.L.; Millard, B.J.; Joyner, L.P. and Norton C.C.: A guide to laboratory techniques used in study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet. Lat.* VI: 201 - 207 (1976).

Martin, A.; Awadalla, S. and Lillehoj, H.S.: Characterization of cell-mediated response to *Eimeria acervulina* antigens. *Avian Dis.* 39: 538 - 547 (1995).

Martin, A.; Lillehoj, H.S.; Kaspers, B. and Bacon, L.D.: Antigen-specific T cell proliferation following coccidia infection. *Poult. Sci.* 72: 2084 - 2094 (1993).

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

McDougald L.R. and Roberson, E.L.: Antiprotozoan drug. In: Veterinary pharmacology and therapeutics. Edited by Booth and McDonald. *Iowa State university press*. 950 988. U.S.A. 1988.

Miller, T.K; Bowma, D.D. and Schat, K.A.: Inhibition of the *in vitro* development of *Eimeria tenella* in chick kidney cells by immune hicken splenocytes. *Avian Dis.* 38: 418-427 (1994).

Moreno, D.R.: Endoparásitos más frecuentes en las gallinas. Memorias de la III Jornada Médico avícola. 146 - 148. *Fac. Med. Vet. y Zoot. de la UNAM*, México, D.F. (1992).

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

Patton, W.H. and Brigman, G.P.: The use of sodium taurodeoxycholate for excystation of *Eimeria tenella* sporozoites. *J. Parasitol.* 65: 526 - 530 (1979).

Roitt, Y.; Brustoff, J. And Male, D.: Immunology. Third Ed. *Mosby press. Hong-Kong*. 1993.

Rothwell, L.; Gramzinski, R.; Rose, M. y Kaiser, P.: Avian coccidiosis: changes in intestinal lymphocyte populations associated with the development of immunity to *Eimeria maxima*. *Paras. Immun.* 17: 525 - 533. (1995).

Sasai, K.; Lillehoj, H.S.; Matsuda, H. and Wergin, W.P.: Characterization of a chicken monoclonal antibody that recognizes the apical complex of *Eimeria acervulina* sporozoites and partially inhibits sporozoite invasion of CD8+ lymphocytes *in vitro*. *J.Parasitol.* 82: 82 - 87 (1996).

Scharton-Kersten TM and Sher A. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. *Current Opin. in Immunol.* 1997; 9: 44-51.

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

Schat KA. T cell immunity: mechanism and soluble mediators. In:Sharma JM editor. Avian cellular immunology. CRC Press Boca Raton FL, 1991: 36-50.

Shirley, M.W.: Research of avian coccidia: an update. *Brit. Vet. J.*: 148: 479 - 499. (1992).

Stenger S and Modlin RL. Cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens. *Current Opin. In Immunol.* 10: 471-477 (1998).

Subuaste, C.S.; Koniaris A.H. and Remington: Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii* infected cells. *J. Immun.* 147: 3955-3959. (1991).

Talebi, A. and Mulcahy, G.: Correlation between immune response and oocyst production in chickens monospecifically infected with *Eimeria maxima*. *Avian Path.* 24: 485 - 495 (1995).

Tizard, I.: *Inmunología Veterinaria*. 4ª. Ed. *Nueva Editorial Interamericana*, México, D.F. 1995.

Trout, J.M. and Lillehoj H.S.: T lymphocyte roles during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet. Imm. and Immunop.* 53: 163-172. (1996).

Trout, J.M. and Lillehoj: *Eimeria acervulina*: Evidence for the involvement of CD8+ T lymphocytes in sporozoites transport and host protection. *Poul. Sci.* 74: 1117-1125. (1995).

Trout, J.M. and Lillehoj: Evidence of a role for intestinal CD8+ Lymphocytes and macrophages in transport of *Eimeria acervulina* sporozoites. *J. Parasitol.* 79: 790-792. (1993).

Vainio O and Imhof A. The immunology and developmental biology of the chicken. *Immunol.Today* 1995; 16: 365-370.

Ventura, J.J. y Campos, R.R.: Estudio morfológico del tejido linfoide asociado al intestino. En: *Inmunología de las mucosas*. Editado por Acosta y Cruz. 1a. Ed. *Distribuidora y Editora Mexicana, S.A. de C.V.* México 1992.

Vervelde, L.; Vermeulen, A. y Jeurissen, S.: In situ characterization of leucocyte subpopulations after infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasite Immun.* 18: 247 - 256. (1996).

Yamashita K, Katsuyuki Y, Masakutsu U and Yano A. Cytotoxic T-Lymphocyte-Mediated Lysis of *Toxoplasma gondii*-infected Target cells does not lead to death of intracellular parasites. *Infec. and Immun.* 1998; 66:4651-4655.

Zar, J.: *Bioestadistical analisis*. 2th. *Prentice-Hall Inc.* 348 - 351. Englewood Clifts. New Jersey. 1984.

Zhang, J.; Wilson, E.; Yang, S. and Healey: Adapting *Eimeria tenella* to grow in primary chicken kidney cells following repeated passages between cell culture and chickens. *Avian Dis.* 41: 111 - 116 (1997).

Zhang, J.; Wilson, E.; Yang, S. and Healey: Increasing the yield of *Eimeria tenella* oocyst in primary chicken kidney cells. *Avian Dis.* 40: 63 - 67 (1996).