



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

CUANTIFICACION DE GRANULOCITOS Y LINFOCITOS EN
EMBRIONES DE POLLO LIBRES DE PATOGENOS
ESPECIFICOS INOCULADOS CON UNA VACUNA BIVALENTE
DE HERPESVIRUS AVIAR Y UN EXTRACTO DE
LINFOCINAS AVIARES

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

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

MIREYA ORTIZ NICOLI

ASESORES: MVZ., PhD. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS
MVZ., M.C. VICTOR MANUEL PETRONE GARCIA
DMV. TAMAS FEHERVARI



MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE, 1999.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

277416



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A Dios que me dio la vida y que me ha permitido realizar ésta TESIS, estando siempre conmigo a cada momento brindándome su amor y su apoyo incondicional.

A mi mamá que me trajo a éste mundo, que ha trabajado tanto y tan duro para poder darme una carrera. Este trabajo es para ti mamá más que para nadie, a ti que siempre estas cuando más te necesito, que aún en mis fracasos me apoyas y en mis triunfos que son los tuyos te enorgulleces de mí. Por que yo soy el resultado de tu esfuerzo y tu trabajo, que después de muchos años finalmente ha dado fruto.

A mi hermano por su apoyo siempre incondicional, amistad, amor y compañía.

A Ma. Del Carmen Embriz amiga incondicional que quizá hoy no está presente en cuerpo pero que siempre estará presente en mi corazón y que siempre estuvo junto a mí apoyándome en todo momento y levantándome el ánimo cuando yo la necesite.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Michel Kogut, por haber donado las linfocinas que se utilizaron para la realización de la presente investigación.

A mis asesores:

Tamás Fehérvári por su apoyo, amistad, paciencia, conocimientos y sobre todo por su confianza en mi para poder realizar esta investigación.

Víctor M. Petrone por su amistad, conocimientos y paciencia.

Guillermo Téllez por sus conocimientos, apoyo brindado y por haberme brindado la oportunidad de trabajar con él.

A todos mis amigos con los que me he desarrollado no solo como Médico Veterinario sino como ser humano. Por haberme brindado la oportunidad de conocerlos y aprender con ellos y de ellos: David de la Fuente, Angélica Camacho, Humberto Miguel, Rocío Pachuca, Víctor Morales, Lila Castellanos, Gabriela Zarco, Mónica Andrade, Marta Espinosa, Sergio López, Patricia Maya, Rocío Camacho, Blanca Cora, Libia Gutierrez, Marco, Falipa Galindo, Rafael Rocha, América Zaldivar, Libia Gutierrez y de muchos más de los cuales quizá no recuerde su nombre pero bien que he de recordar su cara, amistad y enseñanzas, las cuales les llevare siempre conmigo.

A Francisco por su apoyo incondicional, alegrías y tú compañía.

A todo el personal académico y administrativo del departamento de aves que me brindo la oportunidad de desarrollarme para mi futuro pero en especial a: Sr. Juan Merino, Dra. Odette Urquiza por todos los conocimientos que me brindaron y por su amistad.

LISTA DE CONTENIDOS

	Página
LISTAS DE CONTENIDOS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS	6
MATERIAL Y MÉTODOS	6
RESULTADOS	11
DISCUSIÓN	14
LITERATURA CITADA	18

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: A) Aumento en la cantidad de granulocitos en saco vitelino de embrión de pollo libre de patógenos específicos (ELPE) de 13 días, inoculados con SE-SLT. B) Desarrollo de granulocitos en saco vitelino de ELPE de 13 días de desarrollo, no inoculados. Tinción de hematoxilina y eosina (400x).

Pág. 22.

FIGURA 2: Media (desviación estándar) del porcentaje de granulocitos cuantificados del total de células hematopoyéticas de saco vitelino de embriones de pollo libres de patógenos específicos inoculados con HVT+SB1, SE-SLT+(HVT+SB1), SE-SLT, diluyente de la vacuna y no inoculados.

Pág. 23.

FIGURA 3: A) Aumento en la cantidad de granulocitos en los espacios perivasculares del hígado de embrión de pollo libre de patógenos específicos (ELPE) de 13 días, inoculados con SE-SLT. B) Desarrollo de granulocitos en los espacios perivasculares del hígado de (ELPE) de 13 días de desarrollo, no inoculados. Tinción de hematoxilina y eosina (400x).

Pág. 24.

FIGURA 4: Media (mediana) del porcentaje de granulocitos cuantificados en los espacios perivasculares del hígado de embriones de pollo libres de patógenos específicos inoculados con HVT+SB1, SE-SLT+(HVT+SB1), SE-SLT, diluyente de la vacuna y no inoculados.

Pág. 25.

FIGURA 5: A) Aumento en la cantidad de folículos linfoides en bolsa de Fabricio de embrión de pollo libre de patógenos específicos (ELPE) de 13 días, inoculados con SE-SLT. B) Desarrollo de folículos linfoides en bolsa de Fabricio de (ELPE) de 13 días de desarrollo, no inoculados. Tinción de hematoxilina y eosina (400x).

Pág. 26.

FIGURA 6: Media (mediana) del número de folículos linfoides de la Bolsa de Fabricio cuantificados de embriones de pollo libres de patógenos específicos inoculados con HVT+SB1, SE-SLT+(HVT+SB1), SE-SLT, diluyente de la vacuna y no inoculados.

Pág. 27.

FIGURA 7: Media (mediana) del porcentaje de la médula del timo de embriones libres de patógenos específicos inoculados con HVT+SB1, SE-SLT+(HVT+SB1), SE-SLT, diluyente de la vacuna y no inoculados.

Pág. 28.

FIGURA 8: A) Aumento en la cantidad de granulocitos en médula ósea de pollito de un día de edad libre de patógenos específicos inoculados con SE-SLT. B) Desarrollo de granulocitos en médula ósea de pollito de un día de edad libre de patógenos específicos, no inoculados. Tinción de hematoxilina y eosina (400x).

Pág. 29.

FIGURA 9: Media (desviación estándar) del porcentaje de granulocitos cuantificados en médula ósea de embriones libres de patógenos específicos inoculados con HVT+SB1, SE-SLT+(HVT+SB1), SE-SLT, diluyente de la vacuna y no inoculados.

Pág. 30.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **BI:** Bronquitis infecciosa.
- **BF:** Bolsa de Fabricio.
- **CSF-GM:** Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos.
- **ELPE:** Embriones libres de patógenos específicos.
- **EM:** Enfermedad de Marek.
- **HVT:** Cepa de Herpesvirus de pavo.
- **HVT+SB1:** Cepas de Herpesvirus de pavo más la cepa vacunal contra la enfermedad de Marek de Herpesvirus Aviar del grupo 2.
- **Ig:** Inmunoglobulina.
- **SB1:** Cepa vacunal contra la enfermedad de Marek de Herpesvirus Aviar del grupo 2.
- **SE-SLT:** Sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13.
- **UFP:** Unidades formadoras de placa.
- **USA USDA-ARS:** United States of America, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Food Animal Protection Research Laboratory, College Station, Texas.
- **VB-EM:** Vacuna bivalente de la enfermedad de Marek.

RESUMEN

ORTIZ NICOLI MIREYA. Cuantificación de granulocitos y linfocitos en embriones de pollo libres de patógenos específicos inoculados con una vacuna bivalente de herpesvirus aviar y un extracto de linfocinas aviares. (bajo la dirección de MVZ, PhD Guillermo Téllez Isaias, MVZ, MC Víctor Manuel Petrone García y DMV Tamás Febérvári).

Los linfocitos liberan sustancias solubles o linfocinas, las cuales estimulan el sistema inmune y son responsables de la proliferación, diferenciación y activación de la inmunidad mediada por células. Si bien es conocido que las linfocinas estimulan el sistema inmune, dicho efecto no se ha estudiado al aplicarlas simultáneamente con vacunas de la enfermedad de Marek aplicadas *in ovo*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar células que contribuyen a la respuesta inmune celular utilizando el análisis histológico de muestras de saco vitelino, bolsa de Fabricio, timo, hígado y médula ósea provenientes de 100 embriones de pollos libres de patógenos específicos divididos en 5 grupos de 20 embriones cada uno inoculados vía saco vitelino al día 10 de desarrollo embrionario con: Grupo I) Vacuna bivalente de la enfermedad de Marek (HVT+SB1), Grupo II) Vacuna bivalente de la enfermedad de Marek junto con linfocinas, Grupo III) Linfocinas, Grupo IV) Diluyente de la vacuna y Grupo V) No inoculados. Las muestras fueron tomadas a los 14, 17 y 20 días de desarrollo embrionario y a 1 día de edad. En los resultados se observó un mayor ($p<0.05$) desarrollo de folículos linfoides en la bolsa de Fabricio de los embriones inoculados con linfocinas que en los embriones inoculados con la vacuna bivalente aplicada con linfocinas y que los inoculados con la vacuna bivalente sola. Se encontró un mayor ($p<0.05$) número de granulocitos en el saco vitelino, hígado y médula ósea de los embriones inoculados con linfocinas que en los inoculados con la vacuna bivalente aplicada con linfocinas y que en los inoculados con la vacuna bivalente sola. Los resultados obtenidos sugieren que la aplicación de las linfocinas estimuló tanto la resistencia del embrión de pollo mediante la maduración y proliferación de granulocitos en el saco vitelino, hígado y médula ósea, como al sistema inmune mediante la maduración y proliferación de linfocitos B en la bolsa de Fabricio. La aplicación de la vacuna bivalente de la enfermedad de Marek únicamente estimuló la resistencia del embrión de pollo. También se observó que la aplicación de las linfocinas junto con la vacuna bivalente de la enfermedad de Marek puede llegar a modular la posible inmunodepresión causada por la vacuna, con lo cual se puede llegar a disminuir la incidencia de enfermedades como la bronquitis infecciosa, al encontrarse el sistema inmune en alta capacidad de respuesta debido a la aplicación de las linfocinas.

Palabras claves: linfocinas; enfermedad de Marek; vacuna *in ovo*; granulocitos; linfocitos; embriones de pollo; HVT; SB1; histopatología; inmunodepresión.

INTRODUCCIÓN

Debido a que posee un sistema inmune inmaduro que no interfiere de manera importante con el crecimiento viral, el embrión de pollo se ha utilizado para el aislamiento de virus y producción de vacunas entre otros usos. La inmadurez del sistema inmune es uno de los factores por los que en la actualidad se ha comenzado a utilizar la vacunación *in ovo* de embriones de pollo de 18 días con el fin de aumentar el intervalo de tiempo entre la vacunación y la exposición al virus de campo y que el pollito desarrolle un mecanismo precoz de resistencia hacia un desafío temprano^{1,2}.

Si bien el sistema inmune del embrión está inmaduro, tiene un mecanismo de resistencia que le permite la supervivencia; entre los componentes de este mecanismo se encuentran células dendríticas, macrófagos y granulocitos³ que tienen la capacidad de fagocitar bacterias y otras partículas; el interferón del embrión actúa entre otras cosas como antiviral³ y el complemento actúa por su vía alterna para causar citolisis. El saco vitelino, la aorta, el bazo, el intestino y el hígado son sitios de actividad fagocitaria³.

Los órganos linfoides principales del embrión de pollo son el saco vitelino, timo y bolsa de Fabricio (BF) que producen células precursoras de linfocitos³. El timo de las aves es un órgano linfoide par, que consta de 14 lóbulos formados por corteza y médula. La corteza de los lóbulos contiene linfocitos y está cubierta de una cápsula de tejido conjuntivo. La médula está compuesta por células epiteliales, dendríticas y escasos linfocitos⁴. La BF es un saco en cuyo interior existen de 11 a 14 pliegues⁴, los cuales se orientan hacia la luz. Estos pliegues contienen folículos linfoides. Cada folículo consta de una corteza y una médula. En la médula de la BF se encuentran células epiteliales que son reemplazadas por células dendríticas y linfocitos⁴. La corteza se desarrolla después del nacimiento³, contiene linfocitos, células dendríticas y macrófagos⁴. En el bazo y BF la granulocitopoyesis se inicia a los 7 días de incubación y la eritropoyesis entre los 11 y 15 días de incubación⁶. En el timo se encuentran linfocitos desde los 10 días de incubación, tiempo durante el cual el timo es activo en linfopoyesis y granulopoyesis³.

Existe evidencia de que la maduración inmunológica empieza antes del nacimiento. De acuerdo a Moore y Owens⁵, las células germinales hematopoyéticas provienen del saco vitelino de donde migran a la médula ósea donde maduran. La superficie del saco vitelino es mayor entre los 6 y 12 días de incubación, etapa en la cual inicia la proliferación de células hematopoyéticas precursoras. En la BF se inicia la diferenciación de linfocitos B entre los 7 y 14 días de incubación. Los granulocitos son leucocitos polimorfonucleares; forman parte del mecanismo de resistencia y en las aves y reptiles⁷ se dividen en heterófilos, basófilos y eosinófilos; mientras que en los mamíferos se dividen en neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Los granulocitos han sido encontrados en órganos hematopoyéticos desde los 12 días de incubación⁸.

Los heterófilos maduros poseen un núcleo lobulado basofílico y gránulos eosinofílicos⁹; estos granulocitos son los más numerosos de la sangre periférica de las aves y los primeros en llegar al sitio de inflamación; poseen gran movilidad y capacidad fagocítica contra cuerpos extraños o antígenos^{9,10,11}. Estos leucocitos son los que en mayor proporción se encuentran en infecciones bacterianas⁸.

Los basófilos tienen un núcleo basofílico redondo, simple y excéntrico, aunque éste frecuentemente se encuentra dividido en dos lóbulos, sus gránulos citoplásmicos son basofílicos, éstos no contienen peroxidasa, ni fosfatasa ácida como en el caso de los mamíferos^{4,12,13} y actúan como mediadores químicos en la hipersensibilidad mediada por Ig E en el caso de los mamíferos⁴; y en el caso de las aves actúan como mediadores químicos en la hipersensibilidad mediada por Ig Y^{12,13}.

Los eosinófilos tienen un núcleo lobulado basofílico y gránulos eosinofílicos, son células redondas cuya función primaria es fagocitar y destruir material extraño, así como actuar como moduladores de la respuesta inflamatoria. Sus gránulos citoplásmicos son eosinofílicos; se encuentran comúnmente en hipersensibilidad e infecciones de nemátodos contra los que tienen acción citotóxica^{7,10,12}.

Los linfocitos forman parte del sistema inmune. Son células redondas que varían de 7-15 µm de diámetro, contienen un núcleo redondo y grande que se tiñe basofílico de manera intensa y uniforme⁴. En la BF toma lugar la diferenciación de linfocitos B y se pueden detectar células precursoras capaces de producir IgM, IgY e IgA, a los 10, 14 y 16 días de incubación respectivamente; mientras que en el timo se lleva a cabo la diferenciación de linfocitos T, pudiendo detectarse linfocitos CD3 a los 9 días de incubación¹.

Los linfocitos T activados liberan sustancias solubles o linfocinas¹⁴. Las linfocinas no se unen a los antígenos ni son específicas para ellos. Estas sustancias actúan sobre muchos tipos celulares diferentes e inducen cambios funcionales en ellos como la interleucina 2 que participa en el crecimiento y síntesis de anticuerpos de los linfocitos B, o el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (CSF-GM) que participa en la diferenciación de granulocitos, entre otras células¹⁵. Dependiendo de su actividad biológica las linfocinas se dividen en: a) citocinas mediadoras de la inmunidad, b) citocinas mediadoras de la activación, proliferación y desarrollo de linfocitos, c) citocinas mediadoras de la inflamación y d) citocinas mediadoras del crecimiento y diferenciación de leucocitos inmaduros (granulocitos, macrófagos y células dendríticas)¹⁴. Hallazgos recientes han demostrado que la administración profiláctica de linfocinas provenientes de pollos inmunizados contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13 (SE-SLT), confiere protección significativa a la infección de *Salmonella sp.*, en embriones de 18 días, pollos y pavos de un día de edad¹⁶. Es posible que la protección profiláctica conferida por las linfocinas no se limite a la reducción en la infectividad de algún microorganismo específico, sino de otros antigénicamente distintos. En la actualidad ha quedado demostrada la protección de linfocinas para un determinado microorganismo, observándose gran participación de heterófilos en la resolución de la infección al potencializar las actividades funcionales de la fase heterofílica¹⁶. Esto se puede deber a que la administración de linfocinas estimula la eficiencia de heterófilos para fagocitar. Además la naturaleza inespecífica de la fagocitosis y la eliminación del antígeno o agresor por los granulocitos, sugieren que las linfocinas estimulan ambas funciones y pueden ofrecer protección contra los patógenos que comúnmente afectan a las aves neonatas¹⁶.

La enfermedad de Marek (EM) es ocasionada por un Herpesvirus asociado a células. Esta enfermedad es altamente contagiosa, la más común de las enfermedades linfoproliferativas de los pollos. Inicialmente causa una infección lítica de linfocitos B y posteriormente infecta a los linfocitos T, causando inmunodepresión^{11,18}. Desde la década de los 70's comenzó a inmunizarse con vacunas bivalentes de la EM (VB-EM) compuestas por las cepas del serogrupo 3 del Herpesvirus (HVT) y del serogrupo 2 cepa SB1 (SB1), a pollitos en su primer día de edad para contrarrestar las grandes pérdidas económicas producidas por esta enfermedad y en la actualidad se están comenzando a utilizar vacunas *in ovo*². La utilización *in ovo* de vacunas de la EM ha demostrado tener eficacia contra dicha enfermedad, ya que se incrementa el tiempo entre la vacunación y un desafío temprano del virus de la EM, tiempo durante el cual se desarrolla una replicación de la cepa vacunal e inmunidad contra dicha enfermedad^{19,20}. Sin embargo, se ha demostrado que los pollos resultantes de los embriones vacunados *in ovo* presentan mayor incidencia de bronquitis infecciosa (BI), esto se puede deber a que el virus vacunal de la EM interfiere con la proliferación de linfocitos en el embrión de pollo^{21,22}.

Si bien es conocido que las linfocinas estimulan el sistema inmune por medio de la proliferación, diferenciación y activación de células¹³ entre otros mecanismos, el efecto de las linfocinas no se ha estudiado al aplicarlas simultáneamente con vacunas en embrión de pollo. Este efecto pudiera dar evidencias histológicas de inmunomodulación, con lo que pudiera disminuir la inmunodepresión producida por la vacuna de la EM y por lo tanto la incidencia de enfermedades como BI.

HIPÓTESIS

- La VB-EM favorece mayor cantidad de granulocitos en el hígado, saco vitelino y médula ósea de embriones de pollo libres de patógenos específicos (ELPE), inoculados a los 10 días de incubación, comparado con los embriones no inoculados.

- La VB-EM causa menor cantidad de folículos linfoides bursales e hipoplasia de la corteza tímica en ELPE, inoculados a los 10 días de incubación, comparado con los embriones no inoculados.
- Un sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13 evita que varíe la cantidad de folículos linfoides bursales y la relación corteza y médula tímica, por aplicación de la VB-EM, en ELPE, inoculados a los 10 días de incubación, comparado con los embriones no inoculados.

OBJETIVOS

- Cuantificar los granulocitos en hígado y saco vitelino de ELPE inoculados con SE-SLT y la VB-EM a los 10 días de incubación y sacrificados a los 14, 17 y 20 días de desarrollo embrionario y en la médula ósea de pollitos de 1 día de edad.
- Cuantificar los folículos linfoides bursales de ELPE inoculados con SE-SLT y la VB-EM a los 10 días de incubación y sacrificados a los 14, 17 y 20 días de desarrollo embrionario y 1 día de edad.
- Obtener la proporción de corteza y médula tímica de ELPE inoculados con SE-SLT y la VB-EM a los 10 días de incubación y sacrificados a los 14, 17 y 20 días de desarrollo embrionario y 1 día de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Embriones para experimentación

Se utilizaron 100 ELPE de 10 días de edad (ALPES® Tehuacán, Puebla, México).

- La VB-EM causa menor cantidad de folículos linfoides bursales e hipoplasia de la corteza tímica en ELPE, inoculados a los 10 días de incubación, comparado con los embriones no inoculados.
- Un sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13 evita que varíe la cantidad de folículos linfoides bursales y la relación corteza y médula tímica, por aplicación de la VB-EM, en ELPE, inoculados a los 10 días de incubación, comparado con los embriones no inoculados.

OBJETIVOS

- Cuantificar los granulocitos en hígado y saco vitelino de ELPE inoculados con SE-SLT y la VB-EM a los 10 días de incubación y sacrificados a los 14, 17 y 20 días de desarrollo embrionario y en la médula ósea de pollitos de 1 día de edad.
- Cuantificar los folículos linfoides bursales de ELPE inoculados con SE-SLT y la VB-EM a los 10 días de incubación y sacrificados a los 14, 17 y 20 días de desarrollo embrionario y 1 día de edad.
- Obtener la proporción de corteza y médula tímica de ELPE inoculados con SE-SLT y la VB-EM a los 10 días de incubación y sacrificados a los 14, 17 y 20 días de desarrollo embrionario y 1 día de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Embriones para experimentación

Se utilizaron 100 ELPE de 10 días de edad (ALPES® Tehuacán, Puebla, México).

- La VB-EM causa menor cantidad de folículos linfoides bursales e hipoplasia de la corteza tímica en ELPE, inoculados a los 10 días de incubación, comparado con los embriones no inoculados.
- Un sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13 evita que varíe la cantidad de folículos linfoides bursales y la relación corteza y médula tímica, por aplicación de la VB-EM, en ELPE, inoculados a los 10 días de incubación, comparado con los embriones no inoculados.

OBJETIVOS

- Cuantificar los granulocitos en hígado y saco vitelino de ELPE inoculados con SE-SLT y la VB-EM a los 10 días de incubación y sacrificados a los 14, 17 y 20 días de desarrollo embrionario y en la médula ósea de pollitos de 1 día de edad.
- Cuantificar los folículos linfoides bursales de ELPE inoculados con SE-SLT y la VB-EM a los 10 días de incubación y sacrificados a los 14, 17 y 20 días de desarrollo embrionario y 1 día de edad.
- Obtener la proporción de corteza y médula tímica de ELPE inoculados con SE-SLT y la VB-EM a los 10 días de incubación y sacrificados a los 14, 17 y 20 días de desarrollo embrionario y 1 día de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Embriones para experimentación

Se utilizaron 100 ELPE de 10 días de edad (ALPES® Tehuacán, Puebla, México).

Vacuna bivalente

La VB estuvo formada por la cepa HVT y SB1 con títulos de 10^3 unidades formadoras de placa (UFP) /dosis respectivamente de 200 μ l cada una (INTERVET® Toluca, Edo. de México).

Diluyente vacunal

Solución de 200 ml compuesta por:

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.40 g
KH ₂ PO ₄	0.26 g
Sacarosa	75.0 g
Suero fetal bovino	0.02 g
Rojo de fenol	0.001 g

Preparación de linfocinas

Las SE-SLT fueron preparadas de acuerdo a la metodología descrita por Téllez²³ y fueron proporcionadas por el Dr. Kogut del Departamento "United States Department of Agriculture, Agricultural Research, Food Animal Protection Research Laboratory, College Station, Texas (USA USDA- ARS)".

Diseño de tratamientos

Los ELPE se dividieron en 5 grupos de 20 embriones cada uno y fueron inoculados vía saco vitelino al 10° día de incubación de la siguiente manera:

Grupo I. Los embriones se inocularon con una dosis completa de 200 μ l de los virus vacunales HVT y SB1.

Grupo II. Los embriones se inocularon con una dosis completa de 200 μ l de los virus vacunales HVT y SB1 junto con 100 μ l de SE-SLT.

Grupo III. Los embriones se inocularon con 100 μ l de SE-SLT.

Grupo IV. Los embriones se inocularon con 200 μ l del diluyente de la vacuna.

Grupo V. Los embriones no fueron inoculados.

Toma de muestras

A los embriones se les aplicó el método de eutanasia por decapitación descrito por Andrews y colaboradores²⁴, como el método más conocido para embriones de aves cuando sus órganos tienen que ser procesados para histología; utilizado para evitar la autólisis de los órganos²⁴.

Histología

Se tomó la cadena tímica derecha, una sección transversal de 2 mm de espesor de la parte media del lóbulo hepático izquierdo, así como una área de 1 cm² del saco vitelino del polo craneal, médula ósea a partir de fémur y la bolsa de Fabricio completa. Las muestras fueron fijadas en formalina al 10% amortiguada, pH 7.4. Una vez fijados los órganos, se procesaron con la técnica de rutina para cortes en parafina y teñidas con hematoxilina y eosina²⁵.

Virología

Se tomó una muestra de la VB-EM equivalente a una dosis completa por embrión de 200 μ l de manera aséptica y se procesó para la titulación del herpesvirus aviar HVT y SB1²⁶. A partir del inóculo de la VB-EM se realizaron diluciones decimales hasta llegar a la dilución 10⁻⁸. Una cantidad de 50 μ l por dilución fue inoculada en 8 pozos de una placa

que contenía fibroblastos de embrión de pollo de 9 días de desarrollo formando monocapa, dejándose controles no inoculados y controles inoculados con el diluyente de la vacuna. La placa fue incubada a 37° C con 5 % de CO₂, observándose los efectos citopáticos durante 5 días postinoculación²⁷.

Bacteriología

Se tomaron muestras del hígado, timo, saco vitelino, médula ósea y bolsa de Fabricio y se procesaron para aislamiento bacteriano²⁶, para comprobar la esterilidad de los ELPE. Se efectuó una siembra directa de cada órgano antes mencionado en los medios de cultivo de agar sangre, agar verde brillante, agar Mac Conkey y tripticasa soya agar. Los medios de cultivo se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 37° C, con el fin de destacar la presencia de bacterias gram (+) y gram (-) aerobias que crecen en el período de incubación utilizado²⁶.

Calendario de Muestreo

Se realizaron 4 tomas a los 14, 17 y 20 días de desarrollo embrionario y 1 día de edad. A los 14, 17 y 20 de desarrollo embrionario se tomaron el saco vitelino, hígado, bolsa de Fabricio y timo. A los pollitos de un día de edad se les tomó médula ósea, hígado, bolsa de Fabricio y timo.

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

Saco vitelino

Se seleccionaron 10 áreas perivasculares cortadas transversalmente, de las cuales se realizó conteo de células para obtener la proporción de granulocitos en relación al resto de las células hematopoyéticas.

Hígado

Se tomó una sección transversal de 2 mm de espesor de la parte media del lóbulo hepático izquierdo. De cada hígado se realizó un corte transversal, para el conteo de todas las áreas perivasculares, de las cuales se realizó conteo de células hematopoyéticas para obtener la proporción de granulocitos.

Bolsa de Fabricio

Se realizó un corte transversal en la parte media de cada BF, para el conteo de *foliculos linfoides por corte de cada BF*.

Timo

Se realizó un corte longitudinal de la cadena tímica derecha para obtener la proporción entre el grosor corteza/médula. La proporción se expresó como el porcentaje de la médula del timo considerando la suma en mm del grosor de la corteza y la médula como el 100%.

Médula Ósea

Se seleccionaron 10 campos microscópicos, de los cuales se realizó un conteo de los granulocitos para obtener la proporción de células hematopoyéticas con el resto de los granulocitos. Esta muestra únicamente se tomó en pollitos de un día de edad en sustitución del saco vitelino que se encontraba en proceso de involución en el pollito.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de la proporción de granulocitos en la médula ósea de la proporción de la corteza y médula tímica, y de las áreas perivasculares del saco vitelino, se

realizó la transformación de los datos a través del arcoseno de la raíz cuadrada²⁸. A los datos transformados se les aplicó análisis de varianza y las diferencias entre las medias fueron evaluadas mediante la prueba de Tukey^{29,30}.

Para la comparación de las medianas de los espacios de la región porta o áreas periféricas a las venas centrolobulillares del hígado con granulocitos y la cantidad de folículos linfoides de la bolsa de Fabricio se aplicó la prueba Kruskal-Wallis. Para comparar todos los grupos y las diferencias existentes entre cada grupo se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Se fijó el nivel de significancia en $p < 0.05$ ^{29,30}.

RESULTADOS

HISTOLOGÍA

CUANTIFICACIÓN DE GRANULOCITOS DE SACO VITELINO

En las muestras de saco vitelino de las tomas uno y dos se encontraron porcentajes mayores ($p < 0.05$) de granulocitos del total de células hematopoyéticas en los embriones inoculados con SE-SLT que en el resto de los embriones (Figura 1, Pág. 22). En los sacos vitelinos de los ELPE inoculados con HVT+SB1 se encontró un porcentaje mayor ($p < 0.05$) de granulocitos del total de células hematopoyéticas que en el resto de los embriones con excepción de los embriones inoculados con SE-SLT y los inoculados con SE-SLT+(HVT+SB1) (Figura 2, Pág. 23). En la toma tres no se observaron células hematopoyéticas y en la toma cuatro no se realizaron conteos debido a que el saco vitelino se encontraba involucionado dentro del pollo.

CUANTIFICACIÓN DE GRANULOCITOS EN LOS ESPACIOS PERIVASCULARES DEL HÍGADO

En las muestras del hígado de las tomas uno y dos se encontraron porcentajes mayores ($p < 0.05$) de granulocitos en los espacios perivasculares de los embriones

realizó la transformación de los datos a través del arcoseno de la raíz cuadrada²⁸. A los datos transformados se les aplicó análisis de varianza y las diferencias entre las medias fueron evaluadas mediante la prueba de Tukey^{29,30}.

Para la comparación de las medianas de los espacios de la región porta o áreas periféricas a las venas centrolobulillares del hígado con granulocitos y la cantidad de folículos linfoides de la bolsa de Fabricio se aplicó la prueba Kruskal-Wallis. Para comparar todos los grupos y las diferencias existentes entre cada grupo se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Se fijó el nivel de significancia en $p < 0.05$ ^{29,30}.

RESULTADOS

HISTOLOGÍA

CUANTIFICACIÓN DE GRANULOCITOS DE SACO VITELINO

En las muestras de saco vitelino de las tomas uno y dos se encontraron porcentajes mayores ($p < 0.05$) de granulocitos del total de células hematopoyéticas en los embriones inoculados con SE-SLT que en el resto de los embriones (Figura 1, Pág. 22). En los sacos vitelinos de los ELPE inoculados con HVT+SB1 se encontró un porcentaje mayor ($p < 0.05$) de granulocitos del total de células hematopoyéticas que en el resto de los embriones con excepción de los embriones inoculados con SE-SLT y los inoculados con SE-SLT+(HVT+SB1) (Figura 2, Pág. 23). En la toma tres no se observaron células hematopoyéticas y en la toma cuatro no se realizaron conteos debido a que el saco vitelino se encontraba involucionado dentro del pollo.

CUANTIFICACIÓN DE GRANULOCITOS EN LOS ESPACIOS PERIVASCULARES DEL HÍGADO

En las muestras del hígado de las tomas uno y dos se encontraron porcentajes mayores ($p < 0.05$) de granulocitos en los espacios perivasculares de los embriones

inoculados con SE-SLT que en el resto de los embriones (Figura 3, Pág. 24). En los hígados de los ELPE inoculados con SE-SLT+(HVT+SB1) se encontró un porcentaje mayor ($p<0.05$) de granulocitos en los espacios perivasculares que en el resto de los embriones con excepción de los embriones inoculados con SE-SLT (Figura 4, Pág. 25). En las tomas tres y cuatro se encontraron porcentajes mayores ($p<0.05$) de granulocitos en los espacios perivasculares de los embriones inoculados con SE-SLT que en el resto de los embriones. Así mismo en los hígados de los ELPE inoculados con HVT+SB1 se encontró un porcentaje mayor ($p<0.05$) de granulocitos en los espacios perivasculares que en resto de los embriones con excepción de los embriones inoculados con SE-SLT y los inoculados con SE-SLT+(HVT+SB1) (Figura 4, Pág. 25).

CUANTIFICACIÓN DE FOLÍCULOS LINFOIDES DE BOLSA DE FABRICIO

En las muestras de BF de la toma uno se encontró una mediana mayor ($p<0.05$) de la cantidad de foliculos linfoides de los embriones inoculados con SE-SLT que en el resto de los embriones (Figura 5, Pág. 26). En las BF de los ELPE inoculados con HVT+SB1 y los inoculados con SE-SLT+(HVT+SB1) se encontraron medianas mayores ($p<0.05$) de la cantidad de foliculos linfoides que en las BF de los ELPE inoculados con el diluyente de la vacuna y de los no inoculados (Figura 6, Pág. 27). En la toma dos se encontró una mediana mayor ($p<0.05$) de la cantidad de foliculos linfoides de los embriones inoculados con SE-SLT que en el resto de los embriones (Figura 6, Pág. 27). En las tomas tres y cuatro se encontraron medianas mayores ($p<0.05$) de la cantidad de foliculos linfoides de los embriones inoculados con SE-SLT que en el resto de los embriones. En las BF de los ELPE inoculados con SE-SLT+(HVT+SB1) se encontraron medianas mayores ($p<0.05$) de la cantidad de foliculos linfoides que en el resto de los embriones con excepción de los ELPE inoculados con SE-SLT. En los ELPE inoculados con HVT+SB1 y diluyente de la vacuna no se encontró diferencia ($p>0.05$) en la cantidad de foliculos linfoides. Únicamente en la toma cuatro se observó una mediana mayor ($p<0.05$) de la cantidad de foliculos linfoides entre los embriones inoculados con el diluyente de la vacuna y los no inoculados (Figura 6, Pág. 27).

CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE LA MÉDULA DEL TIMO

En las muestras del timo de las tomas uno no se encontró diferencia ($p > 0.05$) en el porcentaje de la médula del timo entre los diferentes inóculos utilizados. En la toma cuatro no se encontró diferencia ($p > 0.05$) en el porcentaje de la médula del timo entre los diferentes inóculos utilizados. En la toma dos se encontró un porcentaje mayor ($p < 0.05$) de la médula del timo en los embriones inoculados con SE-SLT que en el resto de los embriones. En los ELPE inoculados con HVT+SB1, SE-SLT+(HVT+SB1) y el diluyente de la vacuna no se encontró diferencia ($p > 0.05$) en el porcentaje de la médula del timo. En la toma tres no se encontró diferencia ($p > 0.05$) en el porcentaje de la médula del timo de los ELPE inoculados con excepción de los embriones no inoculados, encontrándose un mayor porcentaje de médula del timo en esta toma con relación a las demás tomas realizadas (figura 7, Pág. 28).

CUANTIFICACIÓN DE GRANULOCITOS DE LA MÉDULA ÓSEA

En la única toma realizada de médula ósea de pollitos de un día de edad se encontró un porcentaje mayor ($p < 0.05$) de granulocitos en los embriones inoculados con SE-SLT+(HVT+SB1) y los inoculados con SE-SLT que en los ELPE inoculados con el diluyente de la vacuna y los no inoculados (Figura 8, Pág. 29). De la misma manera en los ELPE inoculados con HVT+SB1 se encontró un porcentaje mayor ($p < 0.05$) de granulocitos que en los sacos vitelinos de los ELPE inoculados con el diluyente de la vacuna (figura 9, Pág. 30).

RECOPIACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS ÓRGANOS EVALUADOS

Una comparación de los resultados obtenidos de los órganos evaluados demuestra un porcentaje mayor ($p < 0.05$) de granulocitos en la BF, hígado, saco vitelino y médula ósea, y un porcentaje mayor ($p < 0.05$) de la médula del timo en los embriones inoculados con SE-SLT que en el resto de los embriones, seguido de los ELPE inoculados con SE-

SLT+(HVT+SB1) en las cuatro tomas realizadas siendo sus efectos más notorios en las tomas tres y cuatro (figuras 2, 4, 6, 7 y 9, Págs. 23, 25, 27, 28 y 30).

VIROLOGÍA

Se confirmó por aislamiento virológico la presencia de los virus de Marek (HVT+SB1) en una concentración de 10^3 UFP/200 μ l en la muestra utilizada para inocular los ELPE. El virus alcanzó una concentración de 10^3 UFP/200 μ l. Las muestras de SE-SLT y diluyente de la vacuna se encontraron libres del virus de Marek.

BACTERIOLOGÍA

Las muestras de hígado, timo, saco vitelino, bolsa de Fabricio y médula ósea se encontraron libres de bacterias.

DISCUSIÓN

En la presente investigación se encontró un mayor número de folículos linfoides en la BF de los ELPE inoculados con SE-SLT, con relación a los demás grupos. Este efecto se atribuye a la posible presencia de un factor estimulante de linfocitos en el sobrenadante de SE-SLT utilizado, ya que existen linfocinas liberadas por los linfocitos que según su actividad biológica se dividen en citocinas mediadoras de la activación, proliferación y desarrollo de linfocitos, tales como la interleucina 2 y la interleucina 4¹⁴. Si bien se observó un ligero aumento en el número de folículos linfoides en los ELPE inoculados con HVT+SB1, este pequeño aumento fue similar al desarrollo de los embriones inoculados con el diluyente de la vacuna y los no inoculados, lo cual puede explicarse debido a que los virus vacunales de EM estimulan la resistencia mediante la formación y movilización de granulocitos¹¹; este efecto se observa en los demás órganos evaluados en esta investigación. Contrario a lo observado en la EM, el número de folículos linfoides bursales de los ELPE inoculados con la VB-EM no disminuyó sino que se mantuvo similar al de los embriones no inoculados³¹.

SLT+(HVT+SB1) en las cuatro tomas realizadas siendo sus efectos más notorios en las tomas tres y cuatro (figuras 2, 4, 6, 7 y 9, Págs. 23, 25, 27, 28 y 30).

VIROLOGÍA

Se confirmó por aislamiento virológico la presencia de los virus de Marek (HVT+SB1) en una concentración de 10^3 UFP/200 μ l en la muestra utilizada para inocular los ELPE. El virus alcanzó una concentración de 10^3 UFP/200 μ l. Las muestras de SE-SLT y diluyente de la vacuna se encontraron libres del virus de Marek.

BACTERIOLOGÍA

Las muestras de hígado, timo, saco vitelino, bolsa de Fabricio y médula ósea se encontraron libres de bacterias.

DISCUSIÓN

En la presente investigación se encontró un mayor número de folículos linfoides en la BF de los ELPE inoculados con SE-SLT, con relación a los demás grupos. Este efecto se atribuye a la posible presencia de un factor estimulante de linfocitos en el sobrenadante de SE-SLT utilizado, ya que existen linfocinas liberadas por los linfocitos que según su actividad biológica se dividen en citocinas mediadoras de la activación, proliferación y desarrollo de linfocitos, tales como la interleucina 2 y la interleucina 4¹⁴. Si bien se observó un ligero aumento en el número de folículos linfoides en los ELPE inoculados con HVT+SB1, este pequeño aumento fue similar al desarrollo de los embriones inoculados con el diluyente de la vacuna y los no inoculados, lo cual puede explicarse debido a que los virus vacunales de EM estimulan la resistencia mediante la formación y movilización de granulocitos¹¹; este efecto se observa en los demás órganos evaluados en esta investigación. Contrario a lo observado en la EM, el número de folículos linfoides bursales de los ELPE inoculados con la VB-EM no disminuyó sino que se mantuvo similar al de los embriones no inoculados³¹.

Investigaciones realizadas por el Dr. Kogut y colaboradores¹⁶ han demostrado que la administración profiláctica de linfocinas procedentes de pollos inmunizados contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13 confiere protección contra la infección de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella sp* mediante la proliferación de granulocitos, principalmente el heterófilo, incrementando la resistencia de los pollos contra infecciones de *Salmonella sp*. Esta respuesta se caracteriza por granulocitopoyesis e incremento de la cantidad de heterófilos circulantes^{32,33}. En esta investigación se observó un mayor aumento en el número de granulocitos en los ELPE inoculados con HVT+SB1, SE-SLT+(HVT+SB1) y SE-SLT que en el resto de los embriones, desde la primera toma realizada. Dicho efecto fue mayor conforme la edad de los embriones inoculados. El grupo con mayor cantidad de granulocitos siempre fue el de los embriones inoculados con SE-SLT. La mayor cantidad de granulocitos probablemente se deba a un posible CSF-GM. Dicha cantidad de granulocitos fue observada en los órganos analizados: hígado, saco vitelino y médula ósea. El efecto granulocítico observado en los embriones inoculados con HVT+SB1 es menor al de los ELPE inoculados con SE-SLT+(HVT+SB1) y SE-SLT; este efecto se puede deber a la inmunodepresión descrita por Sharma³⁴, causada en los embriones al replicarse los virus de la EM intensamente en los órganos del embrión, empezando de esta manera una estimulación temprana del sistema inmune embrionario hacia la presencia de los virus de la EM. Así mismo se explica el por qué el número de granulocitos en los embriones inoculados con SE-SLT+(HVT+SB1) es mayor a los ELPE inoculados con HVT+SB1 y menor a los embriones inoculados con SE-SLT, ya que el número de granulocitos se ve afectado por el posible efecto de inmunodepresión descrito por Sharma³⁴, provocado por los virus en la EM y a su vez por el efecto estimulante del extracto de linfocinas aviares utilizado. Los embriones inoculados con el diluyente de la vacuna no mostraron ningún cambio significativo comparado con los embriones no inoculados; este efecto fue observado de forma constante en las cuatro tomas realizadas en los órganos analizados en la presente investigación.

En los timos no se observaron cambios significativos entre los grupos, debido a que las linfocinas utilizadas únicamente produjeron una activación detectable por la técnica histológica empleada en los linfocitos B de la BF. Únicamente se observó un aumento de

la médula tímica hacia finales de la incubación (embriones de 19 días), observándose que el efecto en los embriones inoculados con HVT+SB1, SE-SLT+(HVT+SB1) y SE-SLT fue menos específico comparado con los resultados obtenidos en los demás órganos analizados, ya que este mismo efecto se observó en los ELPE inoculados con el diluyente de la vacuna. Contrario a lo planteado en la hipótesis la corteza del timo de los ELPE inoculados con la VB-EM no sufrió de hipoplasia comparada con los embriones no inoculados.

Por otra parte, dentro de las hipótesis planteadas en esta investigación se observó un aumento en el número de granulocitos presentes en el hígado, saco vitelino y médula ósea de los ELPE inoculados con la VB-EM, debido a que las cepas HVT+SB1 estimularon la resistencia de los embriones de pollo mediante la formación y movilización de granulocitos con relación a los ELPE no inoculados. Estos mismos resultados se han observado en investigaciones realizadas por Petrone y colaboradores¹¹.

Sin embargo, la cantidad de folículos linfoides bursales se vio aumentada en los ELPE inoculados con SE-SLT, ya que este sobrenadante de linfocinas estimuló la proliferación y maduración de linfocitos B, efecto que no había sido observado con anterioridad, ya que al respecto no se han realizado investigaciones. Dicho efecto es atribuible a la interleucina 2 y a la interleucina 7 que estimulan el crecimiento y maduración de los linfocitos B. Pero si bien la interleucina 7 estimula el crecimiento y maduración de linfocitos B, su presencia no ha sido demostrada en el sobrenadante de linfocinas utilizado, a diferencia de la interleucina 2 cuya presencia fue demostrada en el mismo sobrenadante de linfocinas utilizado por Gómez y colaboradores¹⁴ en investigaciones anteriores.

La aplicación del sobrenadante de linfocitos T utilizado en la presente investigación al igual que la VB-EM utilizada tuvo un efecto de maduración y proliferación de granulocitos. Este efecto fue observado en el saco vitelino, hígado y médula ósea como consecuencia de un estímulo de la resistencia de los ELPE inoculados con relación a los embriones no inoculados. En los ELPE inoculados con SE-SLT además de haber estimulado la maduración y proliferación de granulocitos, esta substancia también provocó

un aumento en el número de los folículos linfoides bursales mediante la maduración y proliferación de linfocitos B, al estimular el sistema inmune de los ELPE inoculados con relación a los embriones no inoculados.

A lo largo de la investigación se observó que el sobrenadante de linfocitos T utilizado estimuló más el sistema inmune de los ELPE con relación a los embriones inoculados únicamente con la VB-EM, efecto que puede observarse de manera más notoria en el hígado, saco vitelino y médula ósea a partir de la tercera toma. Además, la aplicación simultánea de la VB-EM con el sobrenadante de linfocitos T muestra un efecto similar a las investigaciones realizadas por Kogut y colaboradores¹⁶ donde se aplicó en pollitos de un día de edad y embriones de 18 días el mismo sobrenadante de linfocitos T junto con *Salmonella enteritidis*, lográndose un estímulo de la resistencia con la correspondiente maduración y proliferación de granulocitos.

La inmunodepresión descrita por Sharma y colaboradores²⁰ y Montiel²¹ en pollitos vacunados *in ovo* a los 18 días de desarrollo embrionario, debido a la replicación de los virus de la EM^{20,21}, pudiese ser modulada con la aplicación simultánea del sobrenadante de linfocitos T al momento de la vacunación, las cuales además de estimular la resistencia también estimulan el sistema inmune del embrión de pollo, con lo cual pudiese llegar a disminuirse la incidencia de enfermedades como bronquitis infecciosa al encontrarse el sistema inmune en alta capacidad de respuesta.

LITERATURA CITADA

1. Sharma JM. The structure and function of the avian immune system. *Acta Vet Hung* 1997; 45: 229-238.
2. Sarma G, Greer W, Gildersleeve RP, Murray DL, Miles AM. Field safety and efficacy of *in ovo* administration of HVT+SB1 bivalent Marek's disease vaccine in commercial broilers. *Avian Dis* 1995; 39: 211-217.
3. Seto F. Early development of the avian immune system. *Poult Sci* 1981; 60: 1981-1995.
4. Tizard I. *Inmunología Veterinaria*. México (DF). Interamericana Mc Graw-Hill. 1992.
5. Deterlen-Lievre F, Godin I, Pardanaud L. Ontogeny of Hematopoiesis in the Avian Embryo: A General Paradigm. *In: Vainio O, Imhof BA, editors. Immunology and developmental biology of the chicken. Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 212:119-127.
6. Glávits R, Rátz F, Fehérvári T. The role of the Bursa of Fabricius in the ontogeny of the myeloid system. *Acta Vet Acad Sci Hung* 1981; 29: 327-333.
7. Maxwell MH. Histochemical identification of tissue eosinophils in the inflammatory response of the fowl (*Gallus domesticus*). *Res Vet Sci* 1984; 37: 7-11.
8. Zulkifli I, Siegel PB. Heterophil to lymphocyte ratios during perinatal and neonatal stages in chickens. *Br Poult Sci* 1994; 35: 309-313.
9. Topp RC, Carlson HC. Studies on avian heterophils. II Histochemistry. *Avian Dis* 1972; 16: 369-373.
10. Topp RC, Carlson HC. Studies on avian heterophils. III Phagocytic properties. *Avian Dis* 1972; 16: 374-380.
11. Petrone VM, Santiago R, Escorcía M, Fehérvári T, Juárez MA, Téllez G. Evaluación de la respuesta leucocitaria de embriones de pollo inoculados con Herpesvirus tipo 1. *Memorias del VII Congreso Nacional de Patología Veterinaria*; 1998 junio 3-6; Manzanillo (Colima) México. México (DF): Sociedad de Patólogos Veterinarios AC; 1998: 12-14.
12. Campbell TW. *Avian Hematology and Cytology*. Ames (Iowa): Iowa State University Press, 1988.

13. Maxwell MH, Robertson GW. The avian basophilic leukocyte: a review. *World Poultry Sci J* 1995; 51: 307-325.
14. Gómez VG. Identificación de linfocinas en sobrenadantes de esplenocitos de pollo estimulados con Concanavalina-A (tesis de licenciatura) México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.
15. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular*. 2ª ed. España (Madrid). Interamericana Mc Graw-Hill, 1995.
16. Kogut HM, Wells LL, Lowry KV. Ontogenia de las actividades bactericida y fagocítica de los heterófilos de pollo y pavo, y su estimulación por linfocinas. *Memorias de las VII Jornadas Médico Avícolas*. 1998 marzo 11-12; México (DF); México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1998: 44-47.
17. Camacho AJC, García EG, Wong GRA, Téllez IG. Evaluación de la protección por linfocinas obtenidas de LT de aves inmunizadas contra *Eimeria tenella* ante un desafío de *Salmonella enteritidis* FT-13 en pollos de engorda. *Memorias de las VII Jornadas Médico Avícolas*. 1998 marzo 11-12; México(DF); México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1998: 68-72.
18. Calnek BW, Witter RL. Marek's disease. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, editors. *Diseases of poultry*. 10th ed. Ames (Iowa): Iowa State University Press, 1997:369-413.
19. Sharma JM, Burnmester BR. Resistance to Marek disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey Herpesvirus. *Avian Dis* 1981; 26: 134-149.
20. Sharma JM, Graham CK. Influence of maternal antibody on efficacy of embryo vaccination with cell-associated and cell-free Marek disease vaccine. *Avian Dis* 1982; 26: 860-870.
21. Montiel E. La enfermedad de Marek. *Memorias del Curso de actualización en Leucosis Aviar y Enfermedad de Marek*; 1998 febrero 20; México (DF). México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1998: 33-37.
22. Rosenberger KJ, Cloud SS, Murphy VM, Odor ME, Salem M, Pope RC. The effects *in ovo* vaccination on the response to infectious bronchitis vaccination. 32nd National Meeting on Poultry Health and Processing. 1997 October 15-17; Ocean City

- (Maryland); Ocean City (Maryland): Sponsored By Delmarva Poultry Industry, Inc. In Cooperation of Delaware and University of Maryland; 1997: 99-100.
23. Téllez IG, Kogut MH, Hargis BM. Immunoprophylaxis of *Salmonella enteritidis* infection by lymphokines in Leghorn chicks. *Avian Dis* 1993; 37: 1062- 1070.
 24. Andrews EJ, Bennett BT, Clark JD, Houpt KA, Pascoe PJ, Robinson GW and Boyce JR. 1993 Report of the AVNA Panel on Euthanasia. *JAVNA* 1993; 202: 229- 249.
 25. Allen TC. Hematoxilina y Eosina. *In*: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editores. Métodos histotecnológicos. Washington (DC): Instituto de Patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995:55-60.
 26. Mallison ET and Snoeyenbos. Salmonellosis. Jensen MM and Skeells. Staphylococcosis. Sharma JM. Marek's Disease. *In*: Hitchner BS, editor. A Laboratory Manual for the isolation and identification of avian pathogens. The American Association of avian Pathologist. 3rd ed. USA, 1993: 3-11, 43-44, 89-94.
 27. Palya V. Preparation and control of Marek's disease vaccine. *In*: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Manual for the production of Marek's disease, Gumboro disease and inactivated Newcastle disease vaccines. Food and Agriculture Organization Animal Production and Health paper. 1st ed. Rome, 1991: 7-25.
 28. Wayne WD. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. México (DF). 3^a ed. Limusa. 1987: 338-339.
 29. Marriott FHC. The Interpretation of Multiples Observations. Londres (UK): Academic Press, 1974.
 30. Méndez RI. Modelos Estadísticos Lineales. 2^a ed. México (DF): CONACYT, 1981.
 31. García GJ. Características específicas de la enfermedad de Marek y la Leucosis aviar. Memorias del Curso de Actualización en Leucosis Aviar y enfermedad de Marek. 1998 febrero 20; México (DF); México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1998: 3-7.
 32. McGruder ED, Ray PM, Téllez IG, Kogut MH, Corrier DE, Deloach JR, Hargis BM. *Salmonella enteritidis* immune leukocyte-stimulated soluble factors: effects on increased resistance to *Salmonella* organ invasion in day-old Leghorn chicks. *Poult Sci* 1993; 72: 2264-2271.

33. Kogut MH, Téllez IG, McGruder, Wong RA, Isibasi A, Ortiz VN, Hargis BM, DeLoach JR. Evaluation of *Salmonella enteritidis* immune lymphokines on host resistance to *Salmonella enterica* ser *gallinarum* infection in broiler chicks. *Avian Pathol* 1996; 25: 237-249.
34. Sharma JM. Delayed replication of Marek's disease virus following *in ovo* inoculation during late stages of embryonal development. *Avian Dis* 1987; 31: 570-576.

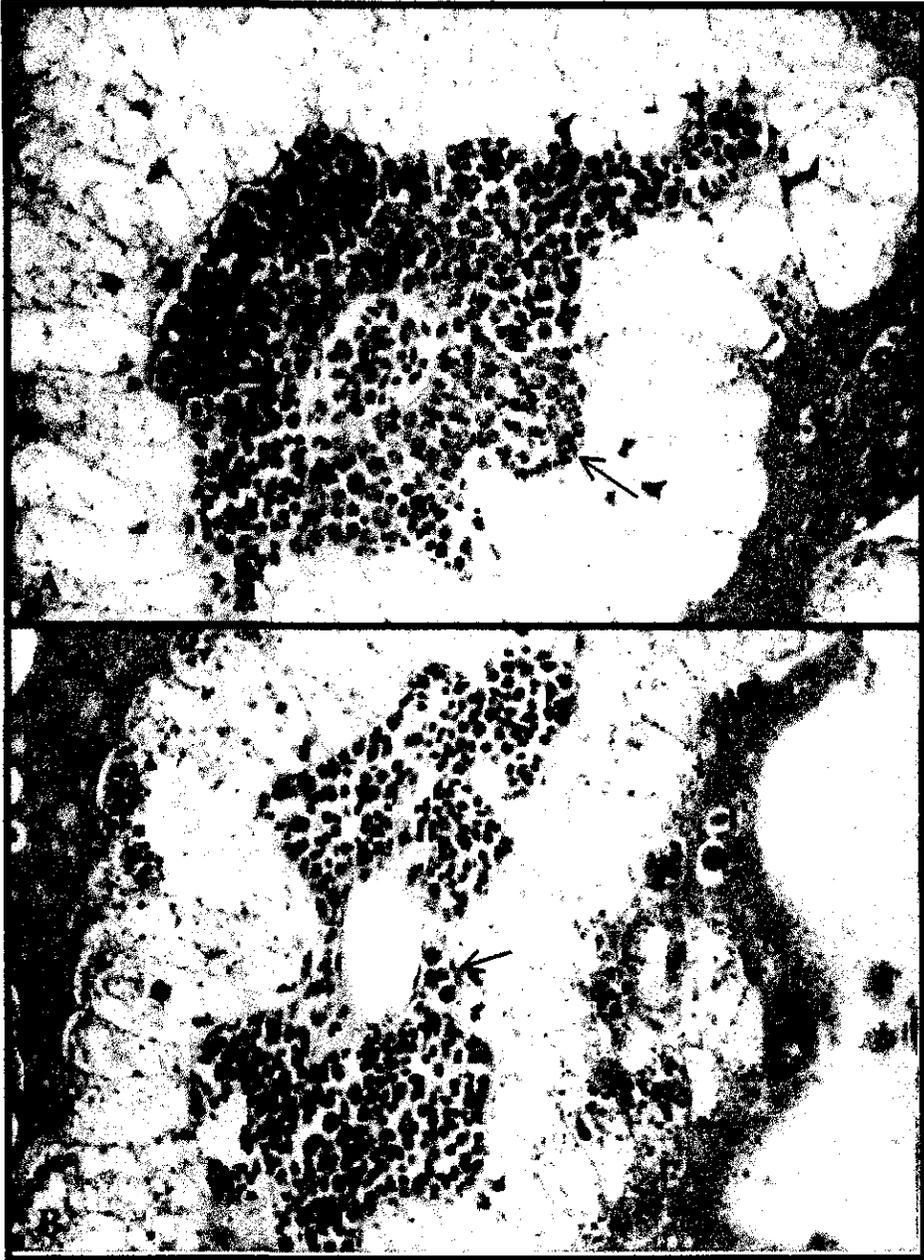
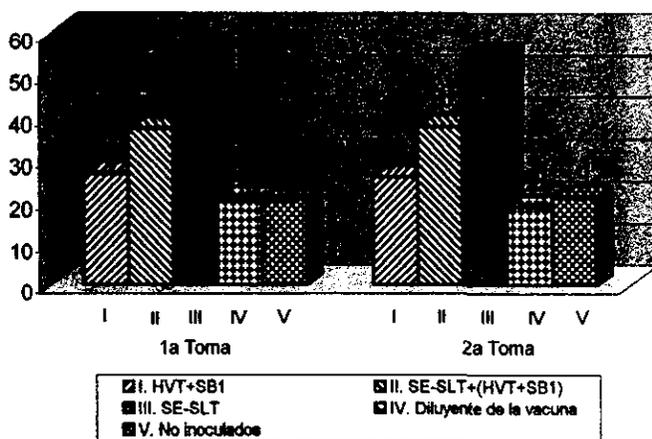


Figura 1. A) Aumento en la cantidad de granulocitos (→) en saco vitelino de embrión de pollo libre de patógenos específicos (ELPE) de 13 días inoculados con SE-SLT¹. B) Desarrollo de granulocitos (→) en saco vitelino de ELPE de 13 días de desarrollo no inoculados. Tinción de hematoxilina y eosina (400 x).

¹ Sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13.

Figura 2. Media (desviación estándar) del porcentaje de granulocitos cuantificados del total de células hematopoyéticas de saco vitelino de embriones de pollo libres de patógenos específicos inoculados con HVT+SB1¹, SE-SLT²+(HVT+SB1), SE-SLT, diluyente de la vacuna y no inoculados



Tratamiento	1ª Toma	2ª Toma
I. HVT+SB1 ¹	26.74 (6.69) ^a	25.75 (14.74) ^a
II. SE-SLT ² +(HVT+SB1)	37.37 (9.22) ^b	37.75 (14.86) ^b
III. SE-SLT	57.30 (18.98) ^c	55.18 (27.96) ^c
IV. Diluyente de la vacuna	20.73 (7.35) ^d	18.75 (8.20) ^d
V. No inoculados	20.63 (6.42) ^d	20.95 (5.62) ^d

Método estadístico utilizado: análisis de varianza y prueba de Tukey.

Literales distintas (a, b, c y d) dentro de la misma columna muestra diferencia significativa ($p < 0.05$)

¹ Cepas vacunales de la enfermedad de Marek

² Sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13

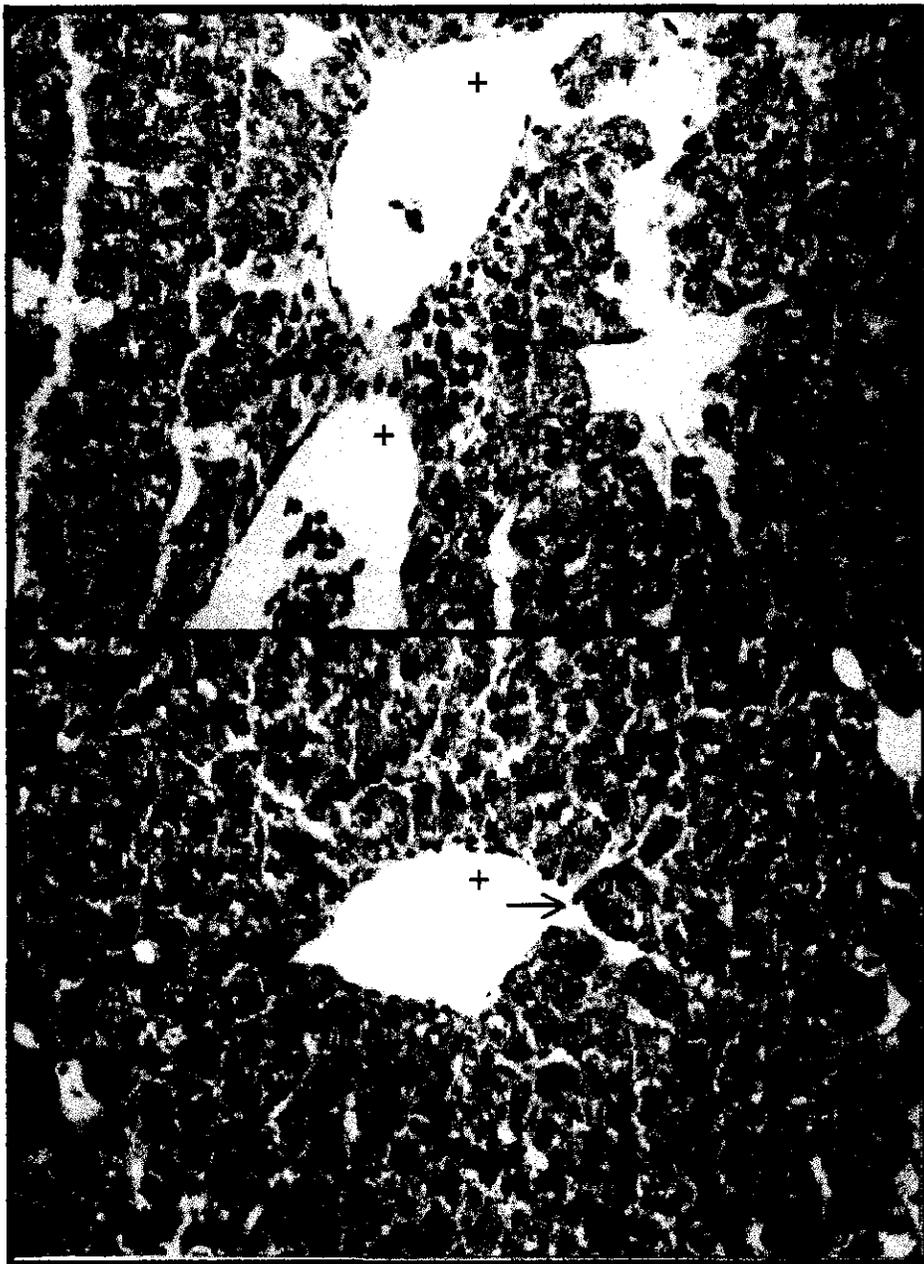
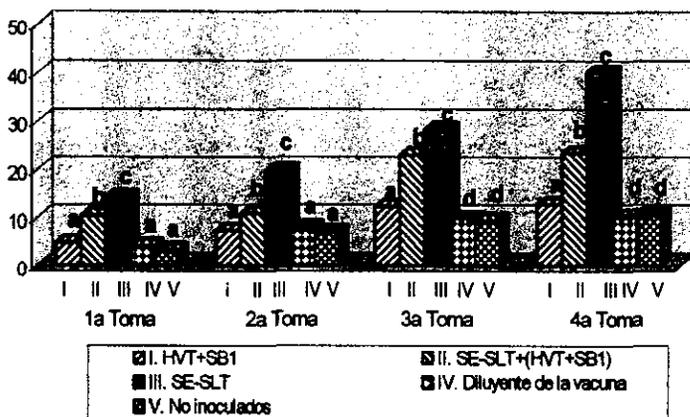


Figura 3. A) Aumento en la cantidad de granulocitos (→) en los espacios perivascular⁺ del hígado de embrión de pollo libre de patógenos específicos (ELPE) de 13 días inoculados con SE-SLT¹. B) Desarrollo de granulocitos (→) en los espacios perivascular⁺ del hígado de ELPE de 13 días de desarrollo no inoculados. Tinción de hematoxilina y eosina (400 x).

¹ Sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13.

Figura 4. Media (mediana) del porcentaje de granulocitos cuantificados en los espacios perivasculars del hígado de embriones de pollo libres de patógenos específicos inoculados con HVT+SB1¹, SE-SLT²+(HVT+SB1), SE-SLT, diluyente de la vacuna y no inoculados.



Tratamiento	1ª Toma	2ª Toma	3ª Toma	4ª Toma
I. HVT+SB1 ¹	4.76 (4.26) ^a	7.33 (6.58) ^a	12.22 (10.53) ^a	12.75 (12.90) ^a
II. SE-SLT ² + (HVT+SB1)	10.31 (10.53) ^b	10.81 (10.96) ^b	23.05 (21.81) ^b	23.40 (24.14) ^b
III. SE-SLT	14.16 (14.52) ^c	19.69 (19.67) ^c	28.26 (26.92) ^c	40.05 (41.18) ^c
IV. Diluyente de la vacuna	4.04 (3.23) ^a	7.84 (6.90) ^a	9.78 (9.43) ^d	10.08 (8.33) ^d
V. No inoculados	3.28 (3.13) ^a	7.05 (6.90) ^a	9.42 (9.43) ^d	10.50 (9.38) ^d

Método estadístico utilizado: prueba de Kruskal-Wallis y prueba U de Mann-Whitney.

Literales distintas (a, b, c y d) dentro de la misma columna muestra diferencia significativa ($p < 0.05$)

¹ Cepas vacunales de la enfermedad de Marek.

² Sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13

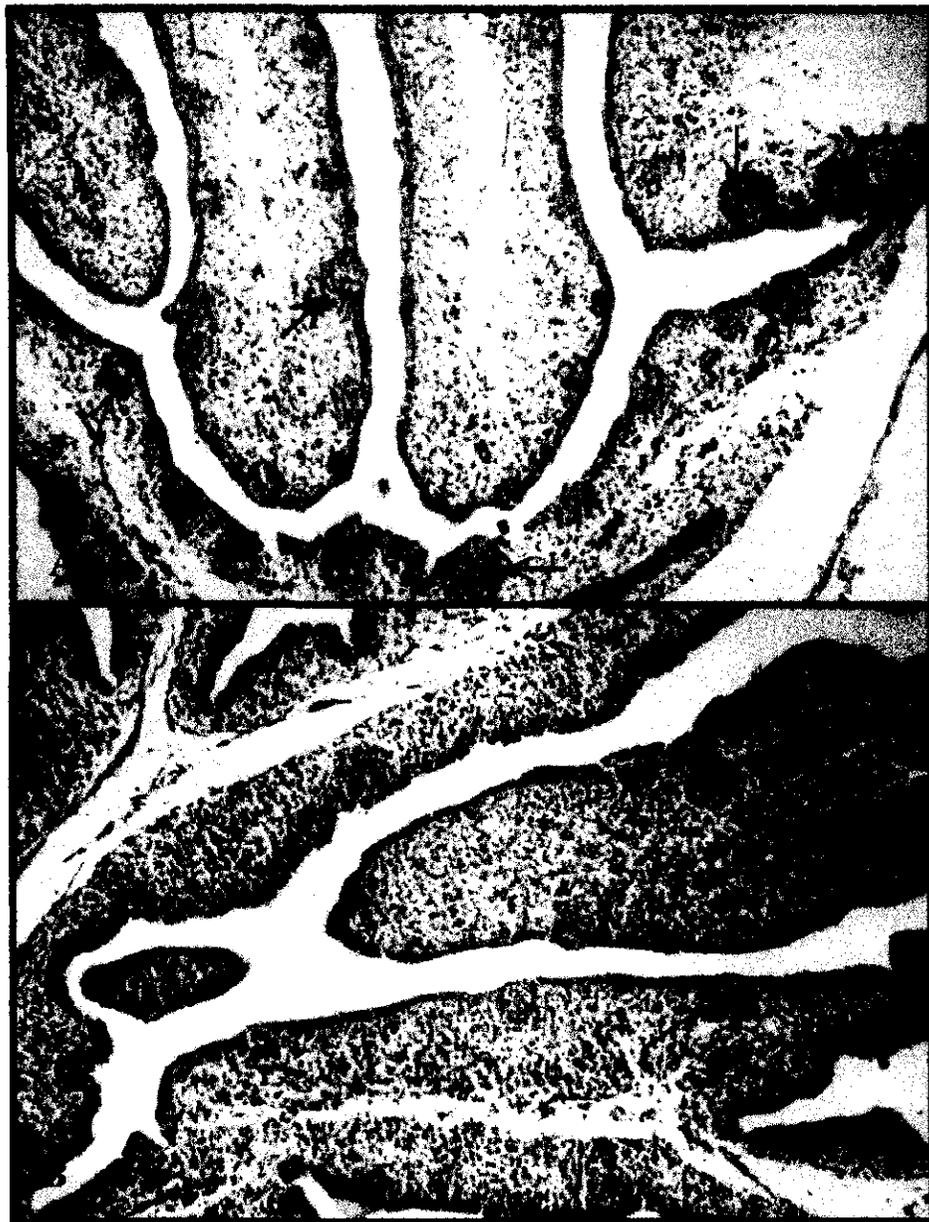
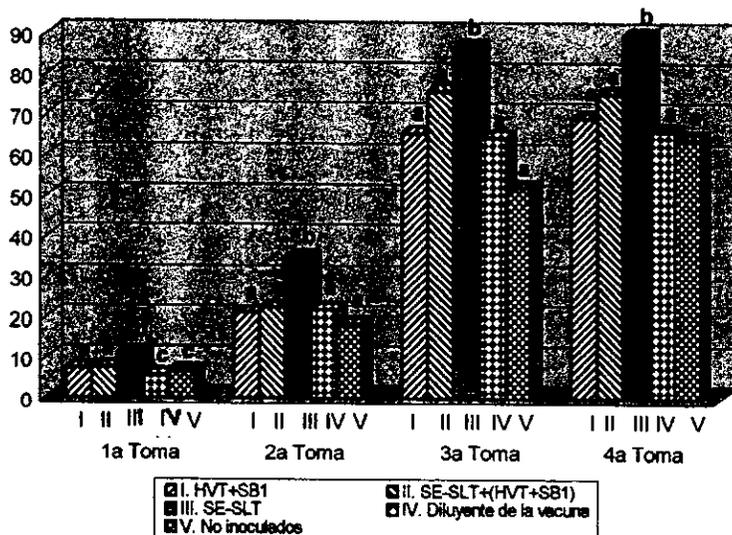


Figura 5. A) Aumento en la cantidad de folículos linfoides (→) en bolsa de Fabricio de embrión de pollo libre de patógenos específicos (ELPE) de 13 días inoculados con SE-SLT¹. **B)** Desarrollo de folículos linfoides (→) en bolsa de Fabricio de ELPE de 13 días de desarrollo no inoculados. Tinción de hematoxilina y eosina (400 x).

¹ Sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13.

Figura 6. Media (mediana) del número de folículos linfoides de la Bolsa de Fabricio cuantificados de embriones de pollo libres de patógenos específicos inoculados con HVT+SB1¹, SE-SLT²+(HVT+SB1), SE-SLT, diluyente de la vacuna y no inoculados.



Tratamiento	1ª Toma	2ª Toma	3ª Toma	4ª Toma
I. HVT+SB1 ¹	7.28 (7.40) ^a	21.12 (21.60) ^a	65.48 (68.80) ^a	69.20 (68.00) ^a
II. SE-SLT ² + (HVT+SB1)	7.44 (7.60) ^a	22.48 (22.20) ^a	76.08 (76.40) ^a	75.36 (72.00) ^a
III. SE-SLT	11.24 (11.20) ^b	35.04 (36.80) ^b	87.04 (88.80) ^b	89.88 (90.00) ^b
IV. Diluyente de la vacuna	5.52 (5.60) ^c	22.00 (21.80) ^a	64.48 (63.60) ^a	66.08 (66.00) ^a
V. No inoculados	6.52 (6.80) ^c	18.28 (18.40) ^a	52.24 (58.40) ^a	64.32 (63.00) ^a

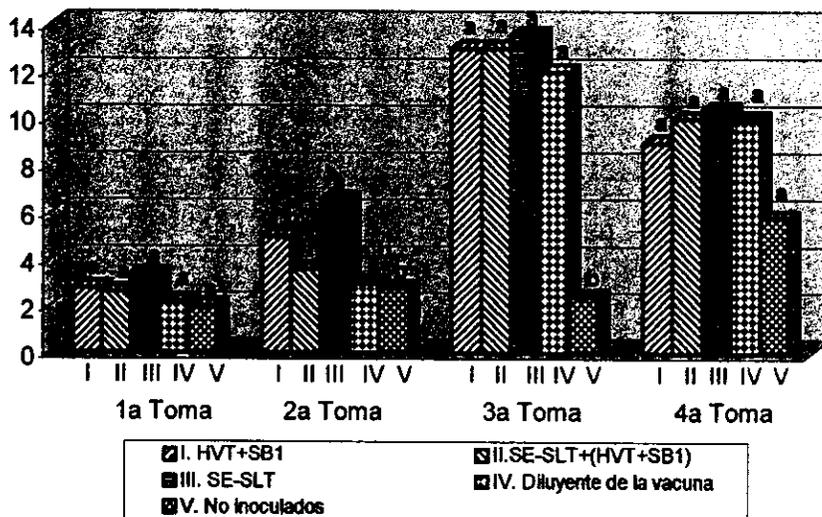
Método estadístico utilizado: prueba de Kruskal-Wallis y prueba U de Mann-Whitney.

Literales distintas (a, b y c) dentro de la misma columna muestra diferencia significativa ($p < 0.05$)

¹ Cepas vacunales de la enfermedad de Marek.

² Sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13

Figura 7. Media (desviación estándar) del porcentaje de la médula del timo de embriones libres de patógenos específicos inoculados con HVT+SB1¹, SE-SLT²+(HVT+SB1), SE-SLT, diluyente de la vacuna y no inoculados



Tratamiento	1ª Toma	2ª Toma	3ª Toma	4ª Toma
I. HVT+SB1 ¹	2.8 (0.84) ^a	5 (1.22) ^{a,b}	13 (4.47) ^a	9 (4.18) ^a
II. SE-SLT ² + (HVT+SB1)	2.6 (0.55) ^a	3.6 (1.34) ^{a,b}	13 (2.74) ^a	10 (3.54) ^a
III. SE-SLT	3.4 (0.55) ^a	6.6 (2.70) ^a	13.6 (2.19) ^a	10.4 (3.65) ^a
IV. Diluyente de la vacuna	2.2 (0.84) ^a	3 (1.58) ^{a,b}	12 (2.74) ^a	10 (3.54) ^a
V. No inoculados	2 (1.00) ^a	2.8 (1.48) ^b	2.4 (1.14) ^b	5.8 (2.59) ^a

Método estadístico utilizado: análisis de varianza y prueba de Tukey.

Literales distintas (a y b) dentro de la misma columna muestra diferencia significativa ($p < 0.05$)

¹ Cepas vacunales de la enfermedad de Marek

² Sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13

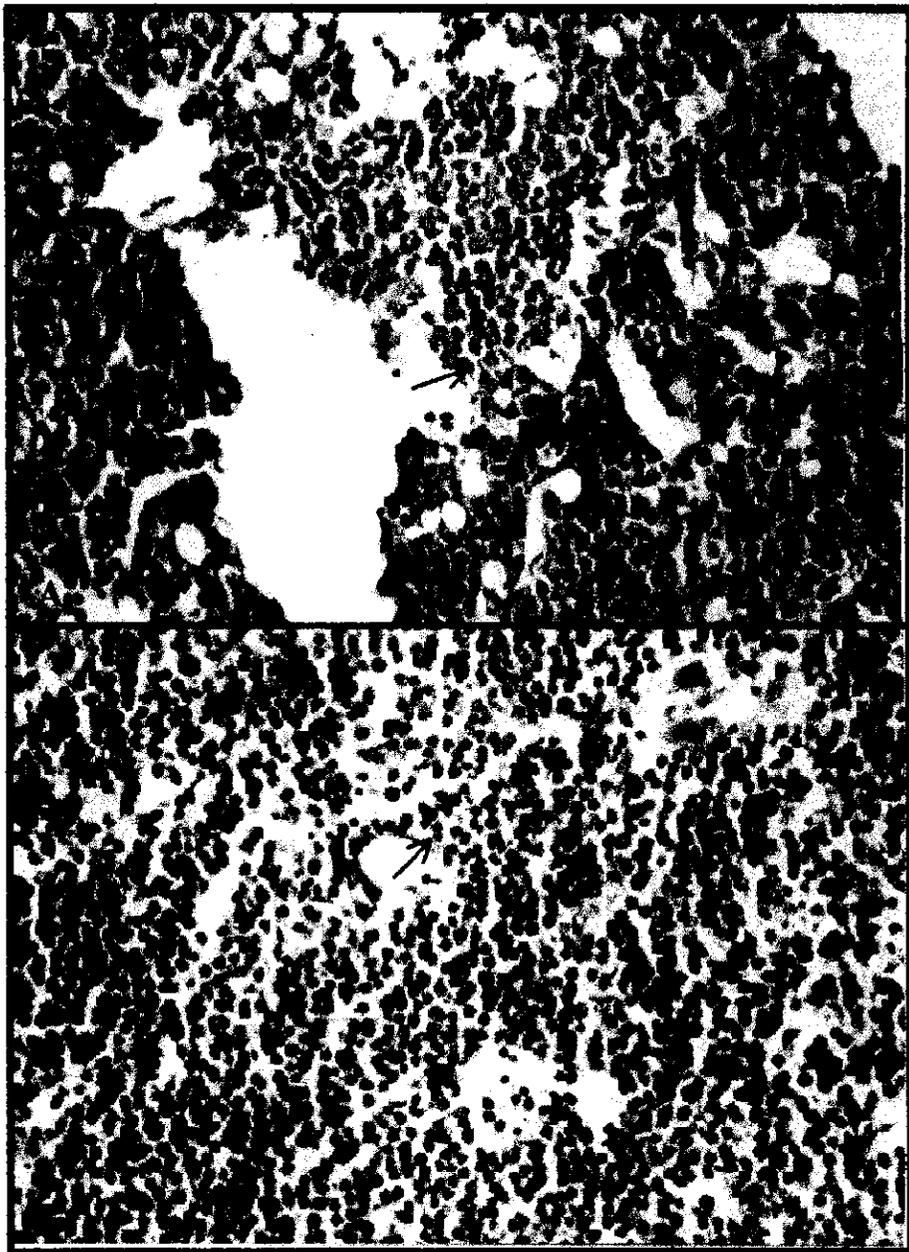
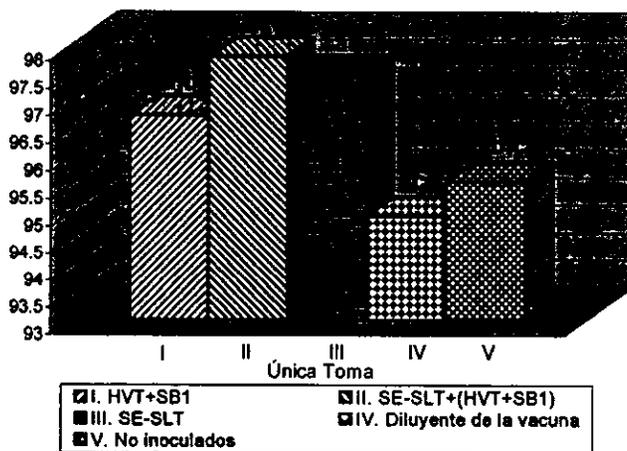


Figura 8. A) Aumento en la cantidad de granulocitos (→) en médula ósea de pollito de un día de edad libre de patógenos específicos inoculados con SE-SLT¹. B) Desarrollo de granulocitos (→) en médula ósea de pollito de un día de edad libre de patógenos específicos no inoculados. Tinción de hematoxilina y eosina (400x).

¹ Sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13.

Figura 9. Media (desviación estándar) del porcentaje de granulocitos cuantificados en Médula Ósea de embriones libres de patógenos específicos inoculados con HVT+SB1¹, SE-SLT²+(HVT+SB1), SE-SLT, diluyente de la vacuna y no inoculados



Tratamiento	Única Toma: Pollitos de un día postnacimiento
I. HVT+SB1 ¹	96.74 (4.14) ^{a,b}
II. SE-SLT ² + (HVT+SB1)	97.82 (2.30) ^a
III. SE-SLT	97.49 (2.82) ^a
IV. Diluyente de la vacuna	94.92 (5.57) ^c
V. No inoculados	95.56 (4.47) ^{b,c}

Método estadístico utilizado: análisis de varianza y prueba de Tukey.

Literales distintas (a, b y c) dentro de la misma columna muestra diferencia significativa ($p < 0.05$)

¹ Cepas vacunales de la enfermedad de Marek.

² Sobrenadante de linfocitos T obtenido de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* fagotipo 13