



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS PROTEÍNAS DE  
OOQUISTES DE *Eimeria tenella* IDENTIFICADAS POR  
ANTICUERPOS POLICLONALES DE YEMA DE HUEVO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Ma. Antonieta Castelló Leyva

TUTOR:

Juan Joel Mosqueda Gualito

COMITÉ TUTOR:

Gary García Espinoza

Sergio Rodríguez Camarillo



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.

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS PROTEÍNAS DE  
OOQUISTES DE *Eimeria tenella* IDENTIFICADAS POR  
ANTICUERPOS POLICLONALES DE YEMA DE HUEVO**

**Ma. Antonieta Castelló Leyva**

**Tutor: Juan Joel Mosqueda Gualito**

**Comité tutor: Gary García Espinoza**

**Sergio Rodríguez Camarillo**

**Colaboradora invitada: Judith González Christen**

## DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres, a quienes debo todo lo que soy...los amo, y doy gracias a Dios por tener la dicha de poder disfrutarlos cada fin de semana....¡que no daría por tenerlos más tiempo a mi lado!

Gracias Luis, por todo el apoyo, el ejemplo, el amor, y los consejos en estos 22 años juntos, pero sobre todo.....gracias por toda la paciencia y la comprensión.

Diego, las palabras contigo salen sobrando, ¿verdad?....que orgullo tenerte a mi lado. Gracias por ser como eres ¡te amo!

Pablo querido.....tan sensible, tan apasionado, tan violento a veces pero tan noble....tú sabes bien cuanto te quiero.....¡no hace falta mas!

Ernesto, mi guapísimo Ernesto....todo lo tienes ya muy calculado y no corres riesgos....vas a lo seguro: ¡el éxito! No cambies jamás. Eres mi tesoro.

Hijos, no tengo ninguna duda, los tres serán triunfadores, tienen todos los elementos para serlo, solo necesitan decidirse. Tengan siempre confianza y seguridad en ustedes mismos. Todas las metas que decidan alcanzar, las pueden lograr....nunca lo duden. Yo tengo confianza en los tres...y lo más importante, los amo sobre todas las cosas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecer a todas las personas que de me apoyaron en ésta tesis y en toda mi trayectoria y mi vida, requeriría sin duda una tesis completa sólo para éste fin. No obstante, trataré de resumir a algunas de las personas claves en éste trabajo.....

Primero que nada, gracias a ti, querido Eduardo Lucio, por permitirme trabajar con uno de tus hijos consentidos...el Supracox. Ojala me permitas seguirlo estudiando para comprenderlo mas...Al grupo IASA, gracias por su amor. Esta correspondido.

Andrés Morales, Ruthcita, Donna, Efi, Ara...espero no olvidar a nadie.

Honor a quien honor merece...un sitio especial a tí, mi querida Judith, mi guía, mi apoyo, pero lo más importante de todo...¡mi amiga querida! Gracias por compartir conmigo tu laboratorio, tus conocimientos y tu paciencia. De grande.....¡Quiero ser como tu!

A ti, querido Juan, por todo tus conocimientos, tu amistad, tus valiosísimas clases y tus consejos de siempre aún desde Querétaro, Tabasco o donde estuvieras.

A mis amigos y asesores: Sergio Rodríguez Camarillo.....gracias por tu amistad de tantos años, tu confianza, tu apoyo, tus consejos, tus preguntas en los tutorales, que tanto me ayudaron a superarme y estudiar y por dejarme tu laboratorio para trabajar; Gary García Espinosa, por tus conocimientos y tus consejos claves en éste trabajo.....gracias por tu compañía de siempre y tu amistad incondicional.

A mi querido Dr. José Luis Montiel y a los “chicos” del Lab. 13 de Farmacia de la U.A.E.M., con quienes me une no solo una amistad, sino fraternidad.

Alfredo y Denhi...que lindos cortes e inmunohistoquímicas...¡no hay palabras!

A mis jurados y amigos: Tere, Juan, Reynaldo, Ariel y Carlos...¡los amo!

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó un producto anticoccidiano consistente en IgY purificadas provenientes de yema de huevo de gallinas libres de patógenos específicos, inmunizadas con ooquistes esporulados de cepas de *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* y *Eimeria máxima*. Los objetivos de este trabajo fueron primeramente, confirmar la presencia de IgY en dicho producto, para posteriormente identificar él o los antígenos presentes en ooquistes de *E. tenella* que pudieran ser reconocidos por el mismo. La metodología para los dos objetivos consistió principalmente en electroforesis (PAGE-SDS) e inmuno electro transferencia (Western-blot), además de la obtención de antígeno de ooquistes de *E. tenella*. La caracterización del producto mostró la presencia de varias bandas de proteínas con los métodos de tinción de plata y azul de Coomassie. El análisis por Western-blot utilizando anticuerpos específicos contra IgY de gallina mostró que 4 de las bandas corresponden a IgY, las cuales coinciden con las bandas detectadas en sueros de gallinas y con un estándar de IgY comercial. Esto permite confirmar que la proteína mayoritaria en el producto es IgY, aunque también existen otras proteínas. Para el segundo objetivo se lisaron  $5 \times 10^7$  ooquistes esporulados de *E. tenella*, se eliminaron paredes y células no lisadas por centrifugación y la mezcla de proteínas se analizó por electroforesis. Después de realizar varios protocolos para lisar los ooquistes se observó la presencia de al menos 9 proteínas en tinción con plata. Se evaluó por Western-blot, dot-blot y ELISA si alguna de estas proteínas era reconocida por el producto evaluado o por suero de gallinas inmunizadas con *E. tenella*. Todas las pruebas dieron negativas

tanto para el producto como para el suero de gallinas inmunizadas, aunque los controles de reconocimiento de IgY por el anti-IgY dieron positivo, mostrando que la técnica es adecuada. Finalmente, para comprobar si el producto puede reconocer proteínas *in situ* o en otros estadios que no sean ooquistes, se realizaron estudios de inmuno histoquímica. Para ello se incubaron cortes de ciegos de aves sanas sin infectar y de ciegos de aves infectadas con ooquistes esporulados de *E. tenella* con el producto evaluado o con suero de gallinas inmunizadas. Se observó una inmuno reacción tanto para el producto como con suero positivo, ligeramente mayor a la tinción de fondo en comparación a las muestras negativas, particularmente asociado a los estadios sexuales (macrogametocito y cigoto) de la coccidia. Con base en los resultados se concluye que el producto evaluado en este trabajo contiene varias proteínas, entre ellas IgY en cantidades importantes. Sin embargo, no se observó reconocimiento para los lisados de ooquistes esporulados de *Eimeria tenella*. Los resultados obtenidos por las pruebas de Inmunohistoquímica sugieren que las IgY pudieran estar reconociendo proteínas presentes en estadios posteriores en el ciclo de desarrollo de *E. tenella*.

## ABSTRACT

In the present study, an anticoccidial product which is mainly a concentrate of IgY purified from the egg-yolk of specific-pathogen-free hens immunized with *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima* sporulated oocysts. The objectives were to confirm the presence of IgY in the product and to identify the possible antigens of *E. tenella* oocysts which could be recognized by the product. The methodologies for both objectives were basically SDS-PAGE and Western blot, besides the purification of antigens from *E. tenella* oocysts. Characterization of the product with silver stain or Coomassie showed the presence of several bands. Western blot analysis with antibodies specific against IgY had shown that 4 of those bands were IgY, as they were the same as those found with hen serum or with commercial IgY. This confirms that the main protein present in Supracox is IgY although there are other proteins. For the second objective, *E. tenella* sporulated oocysts ( $5 \times 10^7$ ) were lysed. Cell walls and non-lysed cells were eliminated by centrifugation and the supernatant was analyzed by electrophoresis. After trying several lysis protocols at least 9 protein bands were detected with Coomassie and silver stain. Western blot, dot-blot and ELISA were used to evaluate if any of these *E. tenella* proteins was recognized by the product being evaluated or by serum from hens immunized with *E. tenella*, but all tests were negative for both the product and serum, although control IgY was recognized by the anti-IgY, showing that the protocol is adequate. Finally, to evaluate if the product can recognize proteins *in situ* or in stadiums other than oocysts, immunohistochemistry assays were done. To do that, cecum slights of non-infected healthy chickens and cecum

slights from chickens infected with sporulated oocysts of *E. tenella* were incubated with the product or with serum from immunized chickens. In these trials, some immunoreaction was observed not only for the product but also for positive serum slightly superior than that observed in the background in contrast with negative samples, particularly in association the sexual stadiums of the parasite (macrogametocyte and cigote). The results of this work indicate that the product being evaluated is a mixture of several proteins, including important quantities of IgY. Nevertheless, no recognition for the lysed sporulated oocysts from *Eimeria tenella* was observed. Immunohistochemistry results suggest that IgY in the product could be recognizing proteins from some latter stadiums of the parasite life cycle.

## ÍNDICE

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Resumen .....	iii
Resumen en inglés.....	iv
Índice.....	vii
Lista de cuadros.....	ix
Lista de figuras.....	ix
Introducción.....	1
Justificación.....	7
Objetivos generales.....	7
Objetivos específicos.....	7
Hipótesis.....	7
Revisión de literatura.....	8
Características del <i>Phylum Apicomplexa</i> .....	10
Etiología.....	12
Ciclo de vida del parásito.....	13
Especificidad de especie y de localización en intestino.....	18
Inmunidad contra eimeria y desarrollo de vacunas.....	19

Protección contra coccidiosis mediante Supracox.....	23
Material y Métodos.....	25
Resultados.....	43
Discusión.....	60
Conclusiones.....	66
Bibliografía.....	67
Anexo.....	74



## **LISTA DE CUADROS**

<b>Cuadro 1.....</b>	<b>39</b>
----------------------	-----------

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Fig 1.....</b>	<b>9</b>
<b>Fig 2.....</b>	<b>9</b>
<b>Fig 3.....</b>	<b>10</b>
<b>Fig 4.....</b>	<b>15</b>
<b>Fig 5.....</b>	<b>17</b>
<b>Fig 6.....</b>	<b>33</b>
<b>Fig 7.....</b>	<b>36</b>
<b>Fig 8.....</b>	<b>44</b>
<b>Fig 9.....</b>	<b>45</b>
<b>Fig 10.....</b>	<b>46</b>
<b>Fig 11.....</b>	<b>47</b>
<b>Fig 12.....</b>	<b>48</b>
<b>Fig 13.....</b>	<b>49</b>
<b>Fig 14.....</b>	<b>50</b>
<b>Fig 15.....</b>	<b>52</b>
<b>Fig 16.....</b>	<b>53</b>
<b>Fig 17.....</b>	<b>55</b>
<b>Fig 18.....</b>	<b>56</b>
<b>Fig 19.....</b>	<b>56</b>
<b>Fig 20.....</b>	<b>57</b>

**Fig 21.....58**  
**Fig 22.....58**  
**Fig 23.....59**  
**Fig 24.....59**  
**Fig 25.....63**  
**Fig 26.....63**  
**Fig 27.....63**

## INTRODUCCIÓN

La coccidiosis, enfermedad provocada por protozoarios del género *Eimeria*, representa la afección parasitaria de mayor importancia económica en la industria avícola mundial (1,15). Esta enfermedad afecta a más de 30 mil millones de pollos producidos mundialmente (36), lo que representa un costo aproximado de £2 mil millones anuales (38). Tan solo el costo estimado para Inglaterra en 1995 por concepto de coccidiosis y pérdidas atribuibles a ella, fue de £38,600,000 aproximadamente, lo que representa casi un 5% de las ganancias totales del mercado de pollo de engorda para Inglaterra, siendo un 82% de los costos atribuibles a mortalidad, baja ganancia de peso y mala conversión alimenticia, problemas de emplume y mala pigmentación, mientras que el restante 18% es atribuible a costos de medicamentos tanto para prevención como para control de ésta enfermedad (47). En México, es la enfermedad parasitaria más importante en la industria avícola. Para el año 2002, Moreno reportó que el costo únicamente por concepto de anticoccidianos representaba un total de \$300,000,000.00 de pesos, sin incluir los costos por tratamiento y las pérdidas económicas asociadas con éste problema (28 ).

Durante años, la prevención de la coccidiosis aviar se ha realizado mediante la inclusión de aditivos en el alimento. Existen en el mercado productos anticoccidianos de tipo coccidiostático y coccidicida. Los primeros solamente detienen el desarrollo del parásito, por lo que si se retira el medicamento, el parásito continúa su ciclo de vida. Estos, administrados de forma continua en el

alimento, previenen la infección o incluso la mantienen a un nivel muy bajo, favoreciendo la inmunidad. Los segundos, matan al parásito y tienen acción sobre diversos estadios del ciclo reproductivo de las coccidias (5,25,34).

Sin embargo, es frecuente ver problemas y brotes asociados al uso de la mayoría de estas drogas anticoccidianas, tanto por problemas de resistencia asociados al parásito, como por fallas en la inclusión del anticoccidiano, mal mezclado del producto en el alimento, subconsumo alimenticio del ave o mal manejo en la administración y consumo del alimento por el ave (4,47). Por estas causas la aparición de nuevas medidas de control contra la coccidiosis es de suma importancia (5,23,24,34,47), por lo que se ha propuesto como método alternativo la inmuno-protección mediante el uso de vacunas. Desde entonces se ha buscado diseñar mecanismos para lograr el desarrollo de inmunidad temprana en las aves, lo que en muchos casos se ha convertido en la herramienta preferida en el manejo de la coccidiosis (26). Tal es el caso del uso de IgY en la prevención y control de la enfermedad (16,17,19).

En la actualidad sólo están disponibles vacunas para prevenir la coccidiosis en aves de la especie *Gallus domesticus*, tanto para pollos de engorda como para gallinas reproductoras (4,5,20,21,22,25), con resultados hasta ahora bastante cuestionables, sobre todo por la alta especificidad de la inmunidad contra el parásito, por lo que la mayor desventaja de estos productos es el alto costo derivado de la necesidad de incluir en la vacuna múltiples especies de eimerias debido a la falta de antigenicidad cruzada entre ellas (1,7,38,46). Esto significa la

producción industrial intensiva de cada especie del parásito, sobre todo tomando en cuenta la falta de identificación de genes del parásito con función inmunoprotectora (4). Aunado a esto, está el hecho de que las vacunas vivas en pollos causan, aunque levemente, una infección que debe ser controlada también con drogas anticoccidianas y que puede afectar la ganancia de peso, pigmentación y conversión. Finalmente está el hecho de que algunas vacunas pueden ocasionar la introducción de ciertas especies de *Eimeria* (vacunales) en las granjas, aunque estas puedan no ser virulentas (47).

Se han realizado esfuerzos para tratar de elaborar vacunas vivas, con cepas no virulentas o con cepas atenuadas, vacunas subunitarias, vacunas recombinantes y vacunas con péptidos sintéticos (1,7,9,22,23,40).

Actualmente se han hecho esfuerzos por controlar la coccidiosis aviar aprovechando la inmunidad pasiva. En las aves los anticuerpos pasan en forma natural de sangre a saco vitelino para proteger al pollo al nacer, lo que se conoce como inmunidad pasiva, la cual es muy importante para el recién nacido durante las primeras etapas de vida (6,7,47). Así, existen trabajos con antígenos de eimeria utilizados para inmunizar gallinas reproductoras logrando la protección de la progenie (16,17,30,44), o inmunización *in ovo* para proteger al pollito recién nacido (7,9,45,46).

Una estrategia de inmunización pasiva consiste en la administración de anticuerpos producidos en animales adultos a los pollos jóvenes. Una buena forma de obtención de grandes cantidades de anticuerpos es la obtención de IgY a partir

de purificación de las inmunoglobulinas de yema de huevo de aves adultas previamente inmunizadas, tanto para fines terapéuticos como profilácticos (6,28). Nguyen usó IgY obtenida de yema de huevo en polvo de gallinas hiperinmunizadas con la proteína 3-1E (proteína recombinante de 20 Kda obtenida a partir de cDNA) para lograr la protección de pollos de engorda contra desafío con cepas de *Eimeria acervulina* y *Eimeria tenella* (30). Recientemente se ha encontrado que la proteína 3-1E es sintetizada en todos los estadios sexuales de *E. tenella* (9).

En México existen informes sobre el uso de anticuerpos obtenidos a partir de yemas de gallinas reproductoras libres de patógenos específicos (16,17,18,19). Este producto se comercializa en el mercado mexicano en presentación líquida y polvo bajo el nombre de Supracox (IASA Tehuacán, Mexico), que es un extracto de inmunoglobulinas aviares de yema de huevo de gallinas reproductoras libres de patógenos específicos (SPAFAS) criadas en piso, las cuales al ser inmunizadas con 6,000 ooquistes esporulados de *E. tenella*, *E. máxima* y *E. acervulina*, a partir de la octava semana de vida del ave y reforzando cada 6-8 semanas, producen altos títulos de IgY en la yema. Las aves se monitorean para confirmar la presencia de anticuerpos séricos contra *Eimeria spp.* mediante pruebas de microneutralización (MNT). Posteriormente las yemas son desecadas mediante la técnica de "spray dry" (aspersión y secado a presión con aire caliente) y liofilizadas para comercializarse en polvo con vehículo inerte de carbonato de calcio. Esta presentación se utiliza como preventiva a razón de 2kg/ton de alimento comercial. El producto ha mostrado efectividad en la protección contra diversas cepas de *E.*

*tenella*, *E. maxima* y *E. acervulina* en desafíos tanto experimentales como de campo, mostrando que mejora la ganancia de peso y disminuye el rango de lesiones en intestino y ciegos de aves tratadas comparadas contra su control (16,17).

También existe una variante de Supracox, el cual se comercializa en forma líquida previo tratamiento con hidroxipropilmetilcelulosa, método que remueve hasta un 90% de los lípidos de la yema, concentrando así las inmunoglobulinas. El Supracox líquido se ha recomendado principalmente para controlar los brotes clínicos de la enfermedad y se utiliza en el agua de bebida a razón de 2 ml/ave por 3 días consecutivos, (Investigación Aplicada, S. A., Comunicación personal).

Las IgY contenidas en la yema de huevo de gallinas inmunizadas contra diversas especies de *Eimeria* son policlonales y dirigidas contra múltiples antígenos, muchos de los cuales seguramente no están relacionados con la inmunoprotección conferida por el producto, por lo que una forma de mejorar esta estrategia sería determinar cual o cuales de los antígenos del parásito son los que resultan en inmunoprotección al ser bloqueados por los anticuerpos presentes en la yema de las gallinas inmunizadas. Esto es importante porque en el caso de coccidias, al igual que ocurre con otros parásitos, se ha determinado la existencia de muchos antígenos que si bien son inmunogénicos, no son inmunoprotectores (4).

Así, un primer paso en este sentido sería la determinación y caracterización de los antígenos que están siendo reconocidos por los anticuerpos contenidos en el producto comercial. Recientemente, se han identificado algunos genes que

codifican proteínas específicas contra las cuales se han desarrollado vacunas efectivas contra coccidia (4,7,12,13,36). Sin embargo, no se sabe si la protección conferida por Supracox está relacionada con la presencia de anticuerpos específicos contra las proteínas codificadas por dichos genes.

## JUSTIFICACIÓN

Conocer cuales son los antígenos reconocidos por el producto Supracox, puede ayudar a diseñar un producto más específico y eficiente en el control de la coccidiosis aviar. De ésta forma se puede diseñar un producto dirigido específicamente contra los epítopes presentes en el ooquiste del parásito o para ciertas proteínas claves del mismo.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo es identificar por lo menos un antígeno específico presente en ooquistes de *Eimeria tenella* que sea reconocido por los anticuerpos presentes en el producto comercial Supracox.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterización de Supracox para detectar la presencia de IgY.
2. Obtención de proteínas a partir de ooquistes de *Eimeria tenella*.
3. Caracterización de proteínas de *E. tenella* reconocidas por el producto Supracox.

## HIPÓTESIS

Por lo menos un antígeno de los ooquistes de *Eimeria tenella* es reconocido por anticuerpos presentes en el producto comercial Supracox.

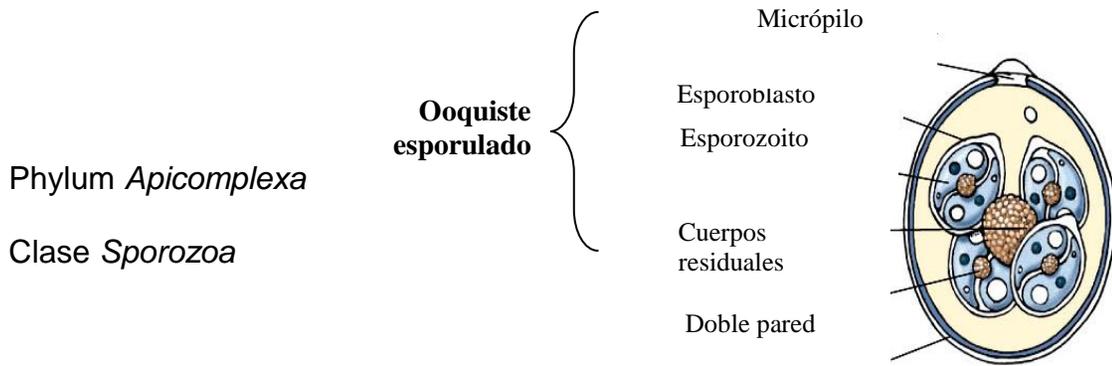
## REVISIÓN DE LITERATURA

La carne de ave es una de las más atractivas, por ser un artículo de calidad, con un precio económico y muy buenas características nutricionales. Por esta razón ha habido un incremento constante en la producción avícola, con sistemas de producción cada vez más eficientes basados en el confinamiento total, con altas densidades de población por metro cuadrado. Este sistema de producción ha favorecido, sin embargo, el incremento en la prevalencia de ciertas enfermedades, entre ellas la coccidiosis aviar (5).

Esta enfermedad es causada por protozoarios llamados coccidias, del género *Eimeria* (orden *Emeriorida*, con 1771 especies y 43 géneros) que pertenecen al Phylum *Apicomplexa*, al igual que *Isospora*, *Sarcocystes*, *Cryptosporidium*, y *Toxoplasma*, agentes causales de enfermedades diversas como malaria, babesiosis, criptosporidiosis, giardiasis, tricomoniasis, coccidiosis, toxoplasmosis y muchas más. (5,7,8,17,18,23,34,36).

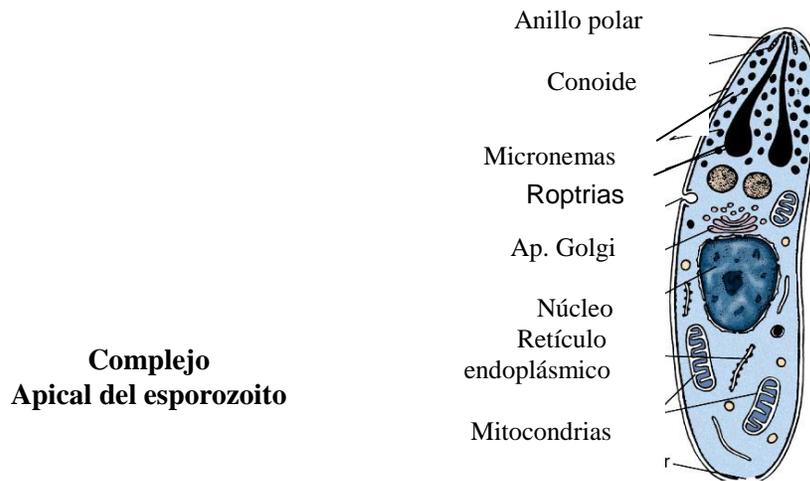
Este Phylum se caracteriza por la presencia de un complejo apical detectable por microscopia electrónica en la fase de esporozoito. considerando que estos parásitos pasan por las fases de:

1. Ooquiste no esporulado
2. Ooquiste maduro, esporulado dentro del cual se desarrollan cuatro esporoblastos con dos esporozoitos cada uno. Figs. 1, 2 y 3 (2,5,8,43).
3. Esquizontes con merozoitos en su interior
4. Macro y microgametocitos



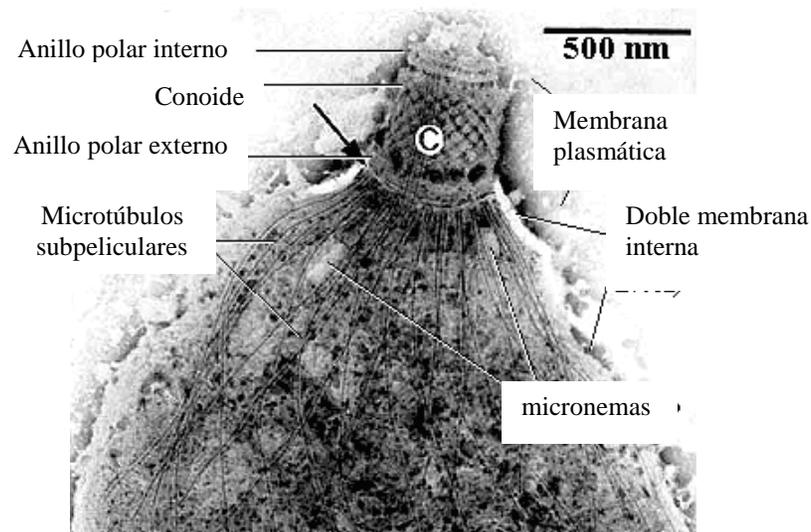
**Fig. 1** Ooquiste esporulado

\* Copyright "The Mc. Graw-Hill Co. Inc



**Fig. 2** Esporozoito

\* Copyright "The Mc. Graw-Hill Co. Inc



**Fig. 3** Acercamiento de complejo apical (c) del esporozoito, vital para la invasividad del parásito.

- Micrografía electrónica del complejo apical con una preparación de FFE. (Morriset et al 1997)

### ***CARACTERÍSTICAS DEL PHYLUM APICOMPLEXA:***

- Complejo apical: Incluye roptrías, micronemas, anillo polar, y en ocasiones, conoide (Fig. 3) (2,5,8,43).
- Sin cilios ni flagelos
- Quistes comunes
- Todos endoparásitos
- Ciclo de vida complejo

La coccidiosis afecta a la mayoría de las especies de animales domésticos, entre ellas pollo, gallina, pavos, patos, cerdos, borregos, cabras, bovinos, caballos y conejos, mostrando especificidad de especie (5,34).

En el pollo, los ooquistes de *Eimeria* ingeridos se replican en el interior de las células intestinales, causando desde infecciones subclínicas que pasan prácticamente desapercibidas, hasta infecciones severas causadas por la ingestión de grandes cantidades de ellos. En estas infecciones severas se producen lesiones a diferentes niveles, que resultan en pérdida de peso, mala conversión alimenticia, pobre o nula pigmentación, diarrea acuosa o con sangre e incluso alta mortalidad, traduciéndose todo esto en pérdidas económicas importantes en la industria avícola (1,5,47). En la coccidiosis generalmente está involucrada más de una especie de *Eimeria*, lo que la convierte en una enfermedad compleja (47).

Básicamente se conocen tres tipos de presentación de la enfermedad:

- Coccidiosis clínica.- Cursa con alta morbilidad y mortalidad, depresión, diarrea acuosa o incluso con sangre
- Coccidiosis subclínica.- Difícilmente reconocida en muchos casos. Se manifiesta básicamente por pérdida de peso, baja eficiencia y alta conversión alimenticia, mal emplume y pigmentación, etc. Es la causante de las mayores pérdidas económicas en la industria de pollo de engorda.

- Coccidiasis.- En ésta última presentación no hay signos clínicos debido al reducido número de ooquistes que se encuentran en el huésped, lográndose incluso inmunidad parcial (47).

Como en otras enfermedades parasitarias, en la coccidiosis los animales infectados, generalmente aves jóvenes, desarrollan rápidamente cierta inmunidad humoral y celular tras la exposición al parásito (5,22,45), la cual se mantiene mientras siga habiendo exposición a las coccidias. Por esta razón las aves adultas son relativamente resistentes a la infección, y la enfermedad afecta principalmente a aves jóvenes que aún no han tenido la oportunidad de desarrollar defensas propias contra la enfermedad y que ya perdieron la inmunidad pasiva conferida por los anticuerpos de origen materno. Así, entre la tercera y la sexta semana de edad es cuando las aves son más susceptibles y desarrollan más fácilmente signos y lesiones (5). La enfermedad es autolimitante, y los animales que se recuperan de la infección compensan parcialmente la pérdida de peso (5,7).

## **ETIOLOGÍA**

Aunque algunos autores mencionan sólo 7 especies de *Eimeria* en pollos, otros grupos han descrito 9, considerando las otras, como variantes de las primeras 7 como *E. mivafí* (1964) (1,5,25,28,34):

*Eimeria acervulina* (1929)

*Eimeria necatrix* (1930)

*Eimeria tenella* (1891)

*Eimeria maxima* (1929)

*Eimeria mitis* (1929)

*Eimeria brunetti* (1942)

*Eimeria praecox* (1930)

*Eimeria hagani* (1938)

La identificación de cada especie se basa principalmente en: (1,5,26,34)

- la localización y apariencia de las lesiones
- la localización del parásito en el intestino
- el tamaño del ooquiste
- el periodo de prepatencia

### ***CICLO DE VIDA DE LA Eimeria spp.***

Para el desarrollo de estrategias tendientes a la prevención y control de la coccidiosis es importante conocer el ciclo de vida del parásito, así como las características estructurales en cada una de las etapas de dicho ciclo.

Este ciclo incluye tres fases (Fig. 4 y 5):

- Esporogonia, que consiste en la esporulación del ooquiste excretado en las heces. Se lleva a cabo en el medio si las condiciones de humedad (70%-80%),

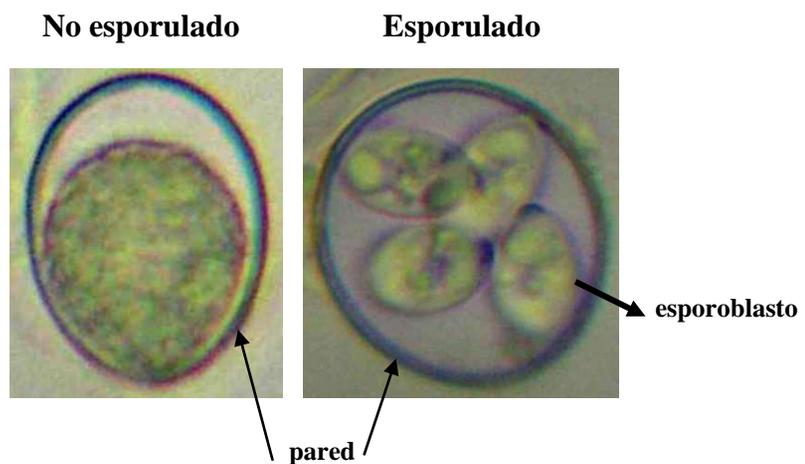
temperatura (entre 10° C y 50°C) y oxigenación son favorables. Así, se forman dentro del ooquiste esporoblastos con esporozoitos, las formas infestantes del parásito.

- Esquizogonia o Merogonia (21), proceso asexual que se lleva a cabo en el interior de las células intestinales a partir de la entrada de los esporozoitos a las células. Esta fase se repite entre 2 y 4 veces.
- Gametogonia, es un proceso sexual en el interior de las células intestinales, implicando la formación de gametos femeninos y masculinos, fertilización y formación de un huevo o cigoto que será excretado en heces (5,21,25,28,34).

El ciclo de vida de este parásito es bastante complejo. Dependiendo de la especie de *Eimeria*, el ciclo de vida es de 4 a 7 días. La transmisión se efectúa por la ingestión de los ooquistes esporulados presentes en heces, cama, polvo, escarabajos (*Alphytobius* spp.), moscas y otros fomites presentes dentro y fuera de la granja (5, 25).

El número de ooquistes en la cama puede variar de acuerdo con las condiciones climáticas, prácticas de manejo, edad de las aves, el producto anticoccidiano utilizado para la prevención y control de coccidias en la explotación, y por supuesto la *Eimeria* de que se trate. Se puede constatar que las aves vivas contienen varios estadios del parásito, permaneciendo a veces como portadores por largos períodos (26).

En las deyecciones del huésped infectado se eliminan los ooquistes que sobreviven hasta por 86 semanas (Moreno) y bajo condiciones adecuadas de humedad (70%-80%), sombra, presencia de oxígeno y temperatura superiores a 10°C e inferiores a 50°C sufren un proceso de mitosis llamado esporogonia, dando lugar al ooquiste esporulado. Este proceso de esporulación tarda aproximadamente 24 a 48 horas (Fig.4),



**Fig. 4** Microscopía de un ooquiste no esporulado y uno esporulado con sus 4 esporoblastos y 8 esporozoitos

Cada ooquiste esporulado contiene en su interior 4 pequeños esporoblastos con dos esporozoitos cada uno, que son las células infectivas (Figs.1,2,4). Posteriormente, el ooquiste esporulado es ingerido y su pared se rompe por la acción mecánica y de los jugos gástricos, liberándose así los esporozoitos que penetran a la célula intestinal para seguir con su reproducción dentro de ella, comenzando así la fase de reproducción asexual del parásito (1,5,22,34). Para

penetrar en la célula hospedera entra en juego el complejo apical del parásito, antes mencionado, a través del cual se ancla a la célula huésped, atacando a los componentes superficiales de dicha célula para penetrar en ella y formar en su interior una vacuola parasitófora (2,8,43).

El éxito en la propagación del parásito se debe parcialmente a su pared altamente resistente contra el medio ambiente (3,36). En 1978 Stotish informa que la pared del ooquiste está constituido en 67% por péptidos, 14% lípidos y 19% carbohidratos. Los lípidos se encuentran principalmente en una capa externa de 10 nm (en forma de alcoholes, fosfolípidos, esteroides y triglicéridos), la cual recubre la capa interna de 90 nm, conformada principalmente por glicoproteínas (3,39).

Una vez dentro de la célula se forma alrededor del esporozoito la vacuola parasitófora donde se inician múltiples divisiones asexuales llamadas esquizogonias o merogonias (fisiones múltiples asexuales con división nuclear), durante las cuales se forman de 2 a 100,000 merozoítos según la especie de *Eimeria*. Ya maduros los merozoítos rompen y neutralizan a las células hospederas y migran a otras nuevas donde inician una nueva esquizogonia (se piensa que cada especie de *Eimeria* está programada genéticamente para un número determinado de generaciones de merozoítos, de manera que el proceso no continúa indefinidamente). En las especies en las que se ha determinado el número de generaciones de merozoítos se ha encontrado que varía entre dos y cuatro (1,5).

La última generación de merozoítos penetra en las células epiteliales para desarrollar la gametogonia, que es la fase de reproducción sexual del parásito. Al entrar en la fase de reproducción sexual, la mayoría de los merozoítos formará micro y macro gametos (Fig. 5,25,34).

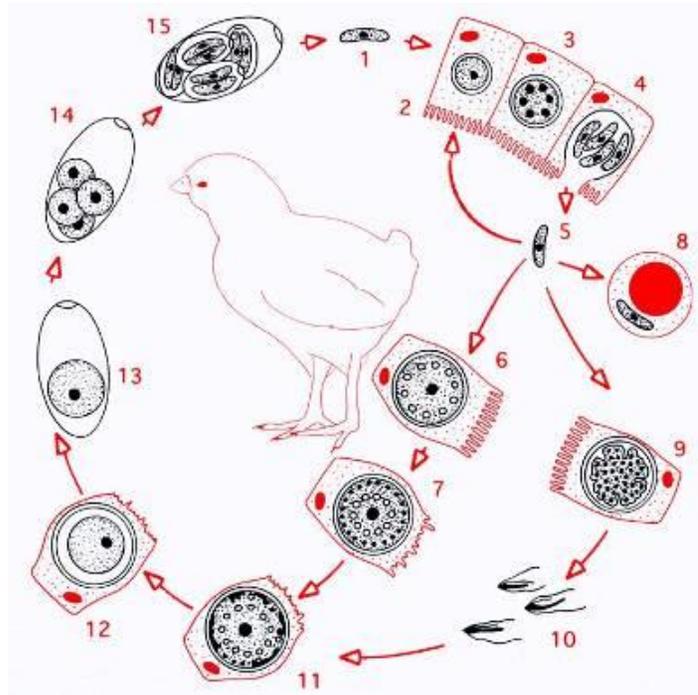


Imagen de [http:// edoc.hu-berlin.de/dissertationen/klotz-christian-2005-02-21/HTML/chapter1.html](http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/klotz-christian-2005-02-21/HTML/chapter1.html)

**Fig. 5** Ciclo de vida de la coccidias

Ambos tipos sufrirán múltiples divisiones que darán origen a miles de microgametocitos o células masculinas, mientras que los restantes formarán un solo macrogametocito o célula femenina. Finalmente los microgametocitos móviles y biflagelados al madurar abandonan sus células huéspedes y penetran en las

células que contienen macrogametos, a los cuales fertilizarán dando origen al huevo o cigoto diploide ( $2n$ ) llamado ooquiste (1,5,34,36).

Alrededor del cigoto se forma rápidamente una delicada membrana, y dentro del citoplasma se desarrollan dos tipos de elementos formadores de pared, los cuales migran hacia la superficie de la membrana, con la cual se funden para formar una pared celular muy resistente, descrita ya anteriormente. Cuando la pared se ha formado completamente el ooquiste rompe a la célula huésped, pasa a la luz intestinal y sale en las heces para continuar así el ciclo de vida (1,3,39).

Aún no se conocen los mecanismos bioquímicos ni genéticos por los cuales los merozoitos regulan la formación de macro o microgametocitos, ni la forma en que los microgametocitos encuentran a las células hospederas que contiene los macrogametocitos y los detalles del proceso de fertilización. Tampoco se conoce el mecanismo que regula el desarrollo de la *Eimeria* dentro de la célula del huésped (1,24).

### ***ESPECIFICIDAD DE ESPECIE Y DE LOCALIZACIÓN EN INTESTINO***

Como se mencionó anteriormente, la coccidiosis es una enfermedad compleja que se caracteriza por la presencia simultánea de diferentes especies de *Eimeria* en el mismo huésped, las cuales no siempre compiten entre sí debido a que presentan especificidad de localización en el intestino del ave. Esto, junto con las características de las lesiones, facilita el diagnóstico rápido en el campo

(1,5,21). Desafortunadamente, la coexistencia de diversas especies de *Eimeria* dificulta la profilaxis y el control de la enfermedad debido a la diversidad intra e interespecie y a que no existe protección cruzada entre diferentes especies (4,5,21).

### ***INMUNIDAD CONTRA EIMERIA Y DESARROLLO DE VACUNAS.***

Al igual que en mamíferos, en las aves existe tanto la inmunidad innata como la adaptativa.

En la inmunidad innata podemos mencionar barreras físicas que impiden la entrada de patógenos, como la piel y las mucosas, y barreras químicas como el moco, enzimas, péptidos antimicrobianos, complemento, etc.

Es importante también mencionar en la inmunidad innata a las células del sistema mieloide como células polimorfonucleares, representadas en aves principalmente por heterófilos, células mononucleares y trombocitos (5,42)

En los mecanismos de inmunidad adquirida se encuentran los linfocitos T fundamentales para la respuesta de tipo celular, y los linfocitos B, fundamentales en la producción de anticuerpos ó inmunoglobulinas y como cooperadoras para la actividad de las células citotóxicas. En aves podemos mencionar principalmente 3 tipos de inmunoglobulinas: IgM, IgY, IgA (5,7,21,22,25,42).

En relación con la respuesta inmune contra la coccidiosis, aún no se ha determinado cuál de las ramas de la inmunidad juega un papel preponderante, o la

secuencia de eventos que conducen a una inmunidad efectiva, que puede involucrar a todos los participantes de la respuesta inmune.

En relación a la inmunidad innata no existen muchos trabajos de investigación sobre su papel en el control de la coccidiosis. Algunas citocinas han mostrado ser inducidas durante la infección, por ejemplo la producción de IL-1 por macrófagos *in vitro*, se observa durante e inmediatamente después de la infección de los pollos con *E. tenella* y *E. máxima*. Los linfocitos de aves infectadas con *Eimeria*, producen altos títulos de interleucina uno (IL-1) comparados con células de aves no infectadas (1, 3, 6). También se menciona la presencia de interleucina seis (IL-6) citocina importante en la inmunología contra coccidia, aumentando el número de eosinófilos y células cebadas (7,13,14,22).

En aves jóvenes ya sin inmunidad pasiva, la respuesta inmunológica primaria se produce después de la primera semana de edad. Una vez establecida la respuesta actúa de la siguiente forma: desenquistamiento de esporozoitos, freno de la penetración de esporozoitos en las células del epitelio intestinal, opsonización, neutralización de esporozoitos en la luz intestinal y la activación del complemento sobre los esporozoitos (7,25).

Por otro lado se ha hablado acerca de la importancia de la inmunidad celular en la respuesta inmune a coccidiosis, ya que muchos trabajos han fallado en la demostración de la efectividad de la inmunidad humoral para la protección de las aves. La activación de células T con merozoitos de eimeria, provoca la liberación de interferón (IFN- $\gamma$ ), estimulando a los linfocitos para expansión clonal

e inhibiendo el desarrollo intracelular de la coccidia, lo que indica que la inmunidad protectora del huésped es contra la fase de crecimiento exponencial del ciclo de vida del parásito (1,12,13,14,21). Es tan importante su actividad, que se ha utilizado como adyuvante en vacunas contra coccidia (13,14,21,22). Es importante señalar también la presencia de linfocitos TCD4+ y CD8+ en epitelio y lámina propia intestinal durante las infecciones con *Eimeria*. Estas células, en aves, presentan 3 clases de TCR, el TCR1, TCR2 y TCR3, a diferencia de los TCR presentes en las mismas células en mamíferos (7). La presencia de estos linfocitos CD4+ y CD8+ depende del tipo de *Eimeria* que infecta (1,13,19). Incluso se sugiere que los linfocitos T CD8+ al igual que los macrófagos, son infectados por esporozoitos, utilizándolos como medio de transporte hacia las criptas u otros tejidos blanco en intestino o ciegos, dependiendo de la especie de *Eimeria* de la que se trate (1,21,22).

A su vez, algunos investigadores piensan que los anticuerpos si juegan un papel importante en la inmunidad protectora contra coccidiosis. Lillehoj y Trout en 1996 mencionan la importancia de las inmunoglobulinas en infecciones con *eimeria* (22). Incluso se han identificado por inmunoblotting y otras técnicas biomoleculares, la presencia de algunos antígenos, y se ha demostrado la efectividad de algunos de los mismos para estimular una respuesta humoral similar en importancia a la generada por la respuesta celular (2,4,7).

Los estadios tempranos en el ciclo de vida de la *Eimeria* se consideran más inmunogénicos que los estadios sexuales tardíos, aunque se ha demostrado que

los antígenos de gametos de *E. máxima* son inmunogénicos y confieren protección contra infecciones con parásitos vivos (4,44).

Se han detectado IgG, IgM y IgA en el suero de pollos una semana después de administrarse el antígeno, alcanzando a las dos a tres semanas el máximo nivel. Sin embargo, para algunos investigadores, los anticuerpos tienen una importancia relativa, ya que los pollos sin bolsa de Fabricio también adquieren inmunidad frente a coccidiosis (1,21,22). Se piensa que los anticuerpos pueden disminuir la invasión de los enterocitos de pollo por algunas especies de *Eimeria*, sin embargo, la entrada de esporozoitos y merozoítos a las células intestinales es tan rápida que la efectividad de la respuesta humoral es limitada (21). Más aún, algunos investigadores mencionan que la inmunidad no previene la invasión, sino el desarrollo del esporozoito (1,25). Además, se ha observado que aunque los títulos de anticuerpos circulantes y secretores aumentan después de iniciada la infección por coccidias, estos títulos no correlacionan con los niveles de protección del ave frente a desafíos posteriores (7).

En el pollo de engorda recién nacido es frecuente la existencia de inmunidad pasiva, ya que la IgY de los pollos es el anticuerpo dominante después de la inmunización secundaria y transfiere desde el oviducto de la gallina de postura al saco vitelino del embrión durante su desarrollo tardío (6,7,25). La IgY sérica tiene una vida media de 36 a 65 horas, y requiere de una secuencia HEAL en el dominio 3 de la región variable de la cadena pesada (posiciones 429-432) para ser transportada a la yema y requiere de receptores específicos (6). A este

proceso de protección por transferencia de anticuerpos se le conoce como inmunidad pasiva materna, que protegerá al pollito recién nacido durante un corto periodo de tiempo (7,21,25).

La concentración de IgY en la yema varía entre 10 a 20 mg/ml, pudiendo encontrarse de 100 a 400 mg de IgY en total por huevo, según la raza o estirpe del ave, tamaño del huevo y en general, características individuales (6,27). En el pollito recién nacido, las concentraciones de IgY sérica son de 1 a 1.5 mg/ml (6)

Se ha buscado la forma de incrementar el grado de inmunidad de los pollos recién nacidos mediante la inmunización de las gallinas reproductoras con antígenos de superficie del gametocito de *E. máxima*, tal como lo reporta Wallach y colaboradores(1995). Los anticuerpos contra el gametocito transferidos a través del saco vitelino proveen inmunidad pasiva a aves jóvenes contra desafíos con *E. máxima* reduciendo la excreción de ooquistes (44). También se ha probado administrar vacunas *in ovo* al embrión de 17 a 18 días de incubación para tratar de protegerlo contra desafíos posteriores al nacimiento (45,46).

### **PROTECCIÓN DE COCCIDIOSIS MEDIANTE SUPRACOX**

Actualmente, la empresa IASA (Tehuacán, México) desarrolló un producto para la prevención y control de la coccidiosis en gallinas, mediante la inmunización de gallinas reproductoras libres de patógenos específicos en forma oral con  $6 \times 10^3$  ooquistes totales provenientes de cepas de *E. tenella* (40%), *E. máxima* (20%) y *E. acervulina* (40%), logrando así la transferencia de anticuerpos

maternos a yema de huevo específicos contra las cepas utilizadas. Posteriormente la yema es deslipidificada en un 90% con hidroxipropilmetilcelulosa. El producto resultante se comercializa en dos presentaciones: líquido o polvo bajo el nombre de Supracox.

Se ha demostrado que el Supracox es eficaz para detener la infección cuando se administra en forma oral a pollo de engorda y se desafían con  $5 \times 10^3$  ooquistes esporulados de *Eimeria acevulina*, disminuyendo la excreción de ooquistes en heces y mejorando la ganancia de peso (16,17).

Las IgY contenidas en la yema de huevo de gallinas inmunizadas contra diversas especies de *Eimeria* son policlonales y dirigidas contra múltiples antígenos, muchos de los cuales seguramente no están relacionados con la inmunoprotección, por lo que una forma de mejorar esta estrategia sería determinar cual o cuales de los antígenos del parásito son los que generan inmunoprotección. Esto es importante porque en el caso de coccidias, al igual que ocurre con otros parásitos, se ha determinado la existencia de muchos antígenos que si bien son inmunogénicos, no son inmunoprotectores (4). Así, un primer paso en este sentido sería la determinación y caracterización de los antígenos que están siendo reconocidos por los anticuerpos contenidos en el producto comercial Supracox. Recientemente, se han identificado algunas proteínas específicas contra las cuales se han desarrollado vacunas efectivas contra coccidia (4,9,43). Sin embargo, no se sabe si la protección conferida por Supracox está relacionada con la presencia de anticuerpos específicos contra dichas proteínas.

La finalidad de la presente tesis es demostrar si el producto Supracox está constituido exclusivamente de IgY, si estos anticuerpos reconocen algún(os) antígeno(s) del ooquiste de *E. tenella*, con el fin de analizar si alguno(s) de ellos son inmuno dominantes e inmuno protectores.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Supracox (lic. SAGARPA B-4579-032), producto elaborado y proporcionado por el laboratorio IASA (Tehuacán, México), a partir de yemas de huevo de gallinas inmunizadas con cepas de *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. máxima*, deshidratadas con la técnica de spray-dry y tratadas con hidroxipropilnitrocelulosa con objeto de concentrar las IgY presentes.

### ***Reactivos:***

Estuches de revelado de membranas por quimioluminiscencia:

- Estuche de reactivo comercial CDP-Star de Roche, catálogo número 12 041 677 001 con sustrato de quimioluminiscencia para fosfatasa alcalina.
- Estuche comercial de Perkin Elmer, Western Lightning Chemiluminiscense Reagent Plus, catálogo NEL 103 con sustrato quimioluminiscente para peroxidasa se rábano.

Estuche para Inmunohistoquímica:

- Zymed Histomouse Max. Broad Spectrum (DAB) catálogo 87-9551

### ***Anticuerpos:***

Sueros aviares positivos y negativos:

- Como controles positivos se utilizaron sueros positivos y negativos producidos en pollos de engorda de 5 semanas, criados en unidades de aislamiento e infectados oralmente con los ooquistes esporulados viables de

parásitos, para obtención de anticuerpos séricos contra *Eimeria*. Como controles negativos se utilizaron sueros de animales que no habían sido infectados. Dichos sueros fueron también proporcionados por el laboratorio IASA (Tehuacán, México). La seropositividad o negatividad de los mismos fue comprobada por IASA mediante pruebas de micro-seroneutralización tanto en placa como en cultivo celular.

- IgY de Sigma-Aldrich catálogo GW11010 donada amablemente por los Dres. Lucia Rangel y Carlos Gutiérrez.
- IgG<sub>1</sub> humana de Millipore catálogo AG502 proporcionada por la Dra. Judith González Christen.
- IgG<sub>2</sub> bovina, purificada por cromatografía de intercambio iónico en una matriz proporcionada por el Dr. Sergio Rodríguez Camarillo.

**Antígenos:**

- Se utilizaron ooquistes esporulados viables de *Eimeria tenella* proporcionados por el laboratorio IASA y conservados en una solución al 2.5% de dicromato de potasio o con hipoclorito de sodio al 13%. Esta cepa es la misma utilizada para inmunizar a las aves libres de patógenos específicos (ALPES) a partir de las cuales se obtienen las yemas para la elaboración del Supracox.
- Proteína Et-MIC-2 (Proteína de 42 KDa obtenida a partir del gen de Et-MIC-2 para micronemas de *E. tenella*) amablemente proporcionada por IASA y producida por la Dra. Hyunn Lillehoj.

### ***Anticuerpos:***

- Anti-IgY (H+L) producida en caprinos, acoplada a fosfatasa alcalina de Jackson Immuno Research Laboratories Inc. con número de catálogo 103-055-155.
- Anti-IgY producida en conejo, acoplada a fosfatasa alcalina de Milipore con número de catálogo AP 162A.
- Anti-IgY (H+L) producida en conejo, acoplada a fosfatasa alcalina lote 3332, amablemente proporcionada por el Dr. Alejandro Alagón, del IBT, U.N.A.M
- Anti-IgY (H+L) producida en conejo, acoplada a peroxidasa de rábano lote 5884, amablemente proporcionada por el Dr. Alejandro Alagón, del IBT, U.N.A.M.

### ***Órganos y tejidos:***

Ciegos procedentes de gallos reproductores Leghorn de 12 semanas de edad, infectados con ooquistes esporulados de *E. tenella* y sacrificados al día 7 post infección y ciegos de gallos Leghorn de la misma edad sanos. Ambas muestras se conservaron en solución de formol al 10% amortiguado con una solución de fosfatos pH 7.0 (ver anexo).

### ***Reactivos varios:***

- Cocktail antiproteasas de Roche: Complete Mini catálogo 1 836 153  
Trans Blot (membrana de nitrocelulosa) Bio-Rad catálogo 162-0112 de 0.2µm.  
Tinción para geles con azul de Coomassie (ver anexo)
- Tinción para geles con nitrato de plata (ver anexo)
- Page Ruler Prestained Protein Ladder de Fermentas, catálogo SM0671

- Precision Plus Protein Unstained Standards de Bio-Rad, catálogo 161-0363
- Precision Plus Protein All Blue Standards de Bio-Rad, catálogo 161-0373
- Precision Plus Protein Western C Standards de Bio-Rad, catálogo 161-0376

***Metodología:***

**Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida/bisacrilamida en condiciones reductoras con dodecil sulfato de sodio (E.P.G.A-DDS)**

- Para las pruebas de electroforesis de proteínas en geles de acrilamida/bisacrilamida en condiciones reductoras, con dodecil sulfato de sodio, se realizó el análisis según la técnica reportada por Laemmli en 1970 y de acuerdo al protocolo descrito en el manual técnico de Bio-Rad.
- Se prepararon geles de corrimiento al 8%, 10% y 12% de acrilamida/bisacrilamida con espesores de 1.0 mm y 1.5 mm, en cartuchos Bio-Rad (catálogo 1653311 para los de 1.0 mm de espesor y 1653312 para los de 1.5 mm de espesor y 1653308 en el caso de los cartuchos cortos). Los geles concentradores fueron hechos al 4% de acrilamida/bisacrilamida. Se colocaron las muestras en los respectivos pozos, previamente enjuagados con agua destilada. Las muestras colocadas en los pozos fueron Supracox, IgY comercial e IgG bovina o humana para la determinación de IgY en el producto, o de antígenos obtenidos a partir de la lisis de ooquistes esporulados, todos solubilizados en

solución buffer de muestra (ver anexo). En ambos casos los geles se corrieron en la cámara de electroforesis Mini-Protean III cell de Bio-Rad (catálogo 165-3301/33ce) a 110 Volts constantes por aproximadamente 1.5 horas hasta que el frente de corrimiento estaba 5 mm arriba del borde inferior del gel. Los geles se tiñeron con Coomassie o tinción de plata coloidal, o bien se transfirieron a membranas de nitrocelulosa según el caso.

### **Electrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa**

- Las proteínas separadas por EGPA-DSS fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.22 $\mu$ m, en cámara húmeda Mini-Trans Blot Electrophoretic Transfer cell, (Bio-Rad catálogo 170-3930/3935) durante una hora a 100 Voltios y 350 mA, según el método de Towbin et al. en 1979, descrito en el manual técnico de Bio-Rad, para posteriormente proceder al revelado utilizando el sistema de quimioluminiscencia.
- En el caso de las muestras de Supracox, se procedió según el estuche comercial de quimioluminiscencia CDP-Star. Básicamente, la membrana se enjuagó ligeramente con TBS-Tween20 y se bloqueó toda la noche a 4°C con caseína diluida en TBS. Posteriormente se añadió el anticuerpo anti-IgY conjugado a fosfatasa alcalina, en dilución 1:1,000 con solución de bloqueo por una hora a temperatura ambiente con agitación ligera. Se enjuagó nuevamente con TBS-Tween 20, 2 veces por 5 minutos en agitación constante y se añadió el buffer de ensayo (Mg<sub>2</sub>Cl ver anexo) diluido en agua destilada para hacer lavados 2

veces por 2 minutos con él. Por último, la membrana se secó ligeramente y se añadió el sustrato quimioluminiscente con el potenciador. Se realizó la lectura con exposiciones de entre 5 y 30 minutos, con cámara de Biorad.

- Para el caso de las muestras con antígeno de ooquistes de *E. tenella*, el proceso fue similar al anterior mencionado para Supracox, la única diferencia fue que una vez bloqueada la membrana por toda la noche a 4°C con caseína, se agregó como primer anticuerpo Supracox o suero positivo en diluciones 1:1,000, 1:500, 1:200, 1:100, una hora a temperatura ambiente con agitación suave, 12 horas a 4°C, e incluso 12 horas en estufa a temperatura constante de 25°C. Los lavados siguientes se realizaron también con TBS-Tween 20, para incubarse posteriormente con el conjugado anti-IgY acoplado a fosfatasa alcalina por una hora a temperatura ambiente con agitación leve. Por último se enjuagó la membrana y se añadió el búfer de ensayo y el sustrato y potenciador igual que para el Supracox.

### **Obtención de proteínas de *E. tenella***

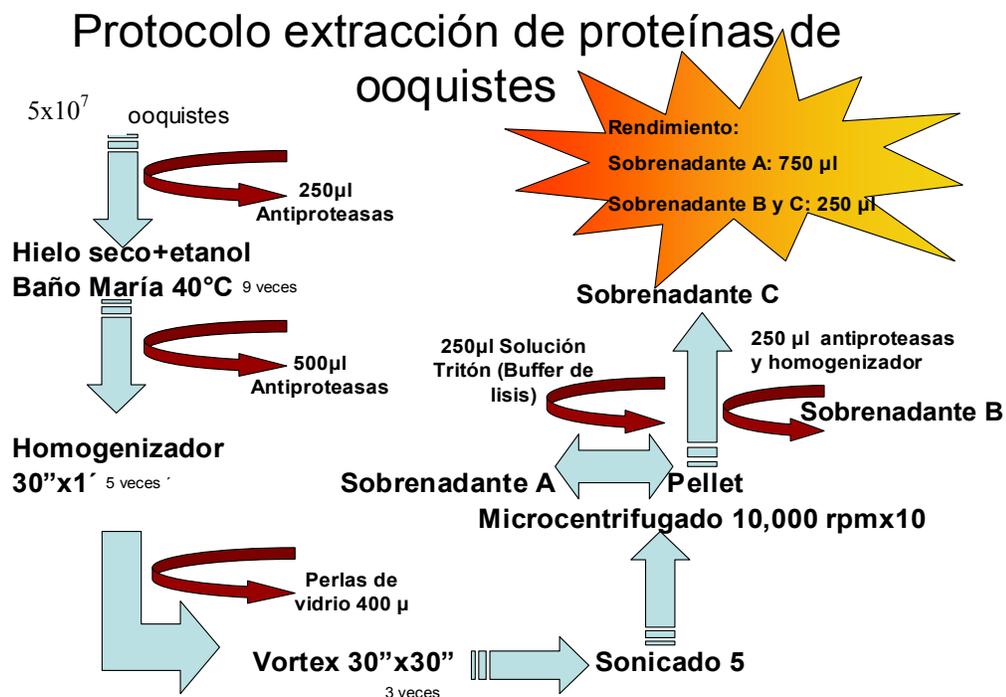
- Con el fin de obtener proteínas de ooquistes esporulados para analizar el posible reconocimiento antigénico por parte de Supracox, se procedió a lisar los ooquistes de *Eimeria tenella* conforme al protocolo de purificación de antígenos de *Eimeria* proporcionado por la Dra. Hyunn Lillejoh, quien ha obtenido grandes

cantidades de proteína a partir de ooquistes. Al protocolo original se le hicieron pequeñas modificaciones para tratar de incrementar la cantidad de proteína obtenida por el procesamiento. Inicialmente se realizó la lisis de aproximadamente 50,000 ooquistes, posteriormente se incrementó a 200,000 ooquistes, y finalmente se utilizaron 500,000,000 ooquistes esporulados. Con base en ese protocolo, se probaron varias opciones:

I. Primer procedimiento de extracción de proteínas a partir de la lisis ooquistes esporulados viables de *E. tenella* (Fig. 6):

$5 \times 10^7$  de ooquistes esporulados se lavaron varias veces con agua destilada (25 ml en cada lavado) y se centrifugaron por 10 minutos a 300 g. a 4°C. Se repitió 6 veces el procedimiento. Se resuspendió el pellet con 2500 µl de solución de cocktail inhibidor de proteasas de Roche en solución de Hank's de acuerdo con las instrucciones del proveedor y se congeló varias veces la muestra con hielo seco-etanol descongelando en baño María a 40°C en un Precision Water Bath 180 series. Se repitió el procedimiento de congelado/descongelado 9 veces. Nuevamente se adicionaron 500 µl de mezcla de antiproteasas de Roche para luego macerar la muestra con un homogenizador marca Power Gen 125 de Fisher Scientific, por 30 segundos consecutivamente con periodos de descanso de 1 minuto, utilizando siempre en hielo para evitar aumento de temperatura en la muestra que pudiera afectarla. Se repitió el procedimiento 5 veces. Se adicionaron perlas de vidrio de 400µm vortexeando la muestra 3 veces por 30 segundos con periodos de descanso de 30 segundos. Posteriormente se sonicó por 5 minutos la

muestra en baño María en un sonicador Branson 1510. Se centrifugó en microcentrifuga Allegra 21 R de Beckman Coulter a 300 g. por 10 minutos para obtener el **sobrenadante A**. Al pellet restante conteniendo las perlas de vidrio se le adicionaron 250 µl de mezcla de antiproteasas de Roche además de buffer de lisis con Tritón X-100 para romper paredes celulares y se dejó 15 minutos en reposo. Este pellet se centrifugó a 300g por 10 minutos y se colectó el **sobrenadante B**. Se resuspendió nuevamente el pellet restante con PBS y se molió nuevamente 30 segundos con 30 de descanso y se centrifugó para obtener el **sobrenadante C**.



**Fig. 6** Primer protocolo realizado para la extracción de proteínas a partir de la lisis de ooquistes esporulados.

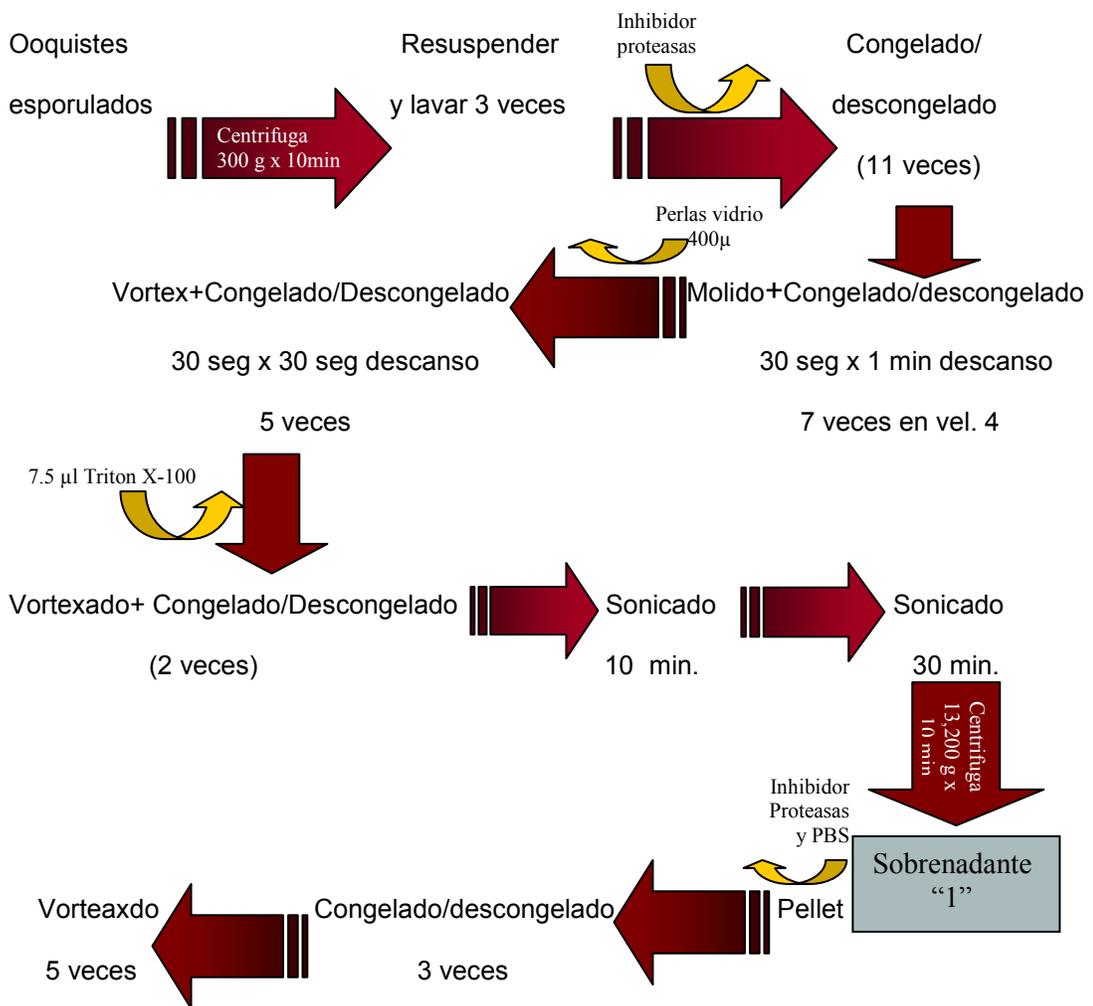
30" x 1"= 30" homogenizado x 1" descanso

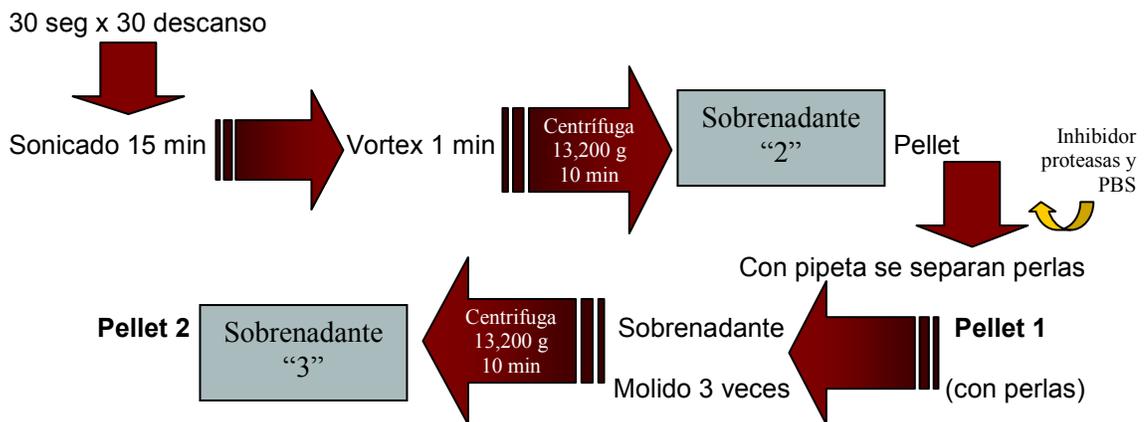
30" x 30"= 30" vortexado X 30" descanso

II. Segundo procedimiento de extracción de proteínas a partir de la lisis ooquistes esporulados viables de *E. tenella* (Fig. 7):

$5 \times 10^7$  de ooquistes esporulados se lavaron con agua destilada (10 ml en cada lavado) y centrifugaron por 10 minutos a 300 g. a 4°C. Se repitió 3 veces el procedimiento pero ahora resuspendiendo en 8 ml de agua destilada. Se agregaron 500 µl de solución comercial de inhibidores de proteasas de Roche en solución de Hank's de acuerdo con las instrucciones del proveedor y se congeló varias veces la muestra con hielo seco-etanol descongelando en baño María a 40°C. Se repitió el procedimiento de congelado/descongelado 11 veces. Se maceró la muestra con un homogenizador marca Power Gen 125 de Fisher Scientific a velocidad 4 por 30 segundos con un minuto de descanso entre cada molienda conservándola en hielo para evitar aumentos de temperatura y luego se alternó molienda con congelado/descongelado con hielo seco-etanol para congelar y descongelar a baño María, repitiendo estos pasos por 2 veces más. Se adicionaron perlas de vidrio de 400µ vortexeando la muestra 5 veces por 30 segundos con periodos de descanso de 30 segundos. Posteriormente se añadió Tritón X-100 al 1% (7.5µl) y se alternaron procedimientos de vortex con congelado/descongelado 2 veces y sonicado por diez minutos la primera vez y 30 segundos la segunda vez. Se centrifugó a 13,200 g por diez minutos. El **sobrenadante** obtenido en éste paso se identificó como "1". Se adicionaron al pellet restante de éste procedimiento, las perlas de vidrio, 250 µl de mezcla de

antiproteasas de Roche y 250 µl de PBS. Nuevamente se procedió a congelar/descongelar la muestra pero ahora en hielo seco-acetona (-78° C) y baño María a 40°C por 3 veces. Posteriormente se vortexeó la muestra 30 segundos con 30 segundos de descanso por 5 veces y se procedió a sonicar nuevamente durante 15 minutos, para luego vortexear otra vez por 1 minuto la muestra. Se centrifugó a 300 g por 10 minutos y se tomó el **sobrenadante "2"**. Nuevamente, el pellet resultante se resuspendió con 250 µl de mezcla de antiproteasas de Roche y 250 µl PBS. Se mezcló perfectamente y separó el sobrenadante del pellet con perlas de vidrio con una pipeta. El pellet con las perlas de vidrio y se resuspendió en PBS y se identificó como **pellet 1**. Este sobrenadante sin perlas se molió nuevamente 3 veces por 30 segundos con uno de descanso. Se centrifugó a 13,200 g en ultracentrífuga por 10 minutos y se colectó el **sobrenadante "3"**. El pellet final se resuspendió con PBS y se conservó como **pellet 2**.





**Fig. 7** Segundo protocolo realizado para la extracción de proteínas a partir de la lisis de ooquistes esporulados.

### ***Cuantificación de proteínas***

- Se cuantificaron proteínas en Supracox, sueros positivos y extractos de ooquistes de *E. tenella* por el método de Bradford utilizando la técnica y el reactivo de Bio-Rad (Dye Reagent catálogo 210004776). La curva patrón fue realizada con albúmina sérica bovina (BSA).

### **Dot Blot**

Se hicieron varias pruebas de Dot Blot, con algunas variaciones:

- Se depositó suavemente una gota de 1µl de antígeno en cada sitio asignado en la membrana y se dejó secar. En el caso de 3µl y 5µl, se repitió la operación una vez seca la primera gota hasta lograr la cantidad deseada. Se dejó secar la membrana. Se bloqueó con leche descremada al 5% diluida en PBS-Tween 20 toda la noche a 4°C. Se descartó la leche y se añadió el primer anticuerpo a las tiras con antígeno obtenido a partir de la lisis de ooquistes de *E.*

*tenella* (sobrenadante “B”) en dilución 1:1,000. Luego se incubó por 45 minutos. Se lavó 3 veces por 5 minutos en agitación constante con PBS-Tween 20. Se añadió el conjugado Anti-IgY acoplado a peroxidasa diluido 1:5,000 por 45 minutos. Se lavó 3 veces la membrana con TBS-Tween 20. Se añadió el sustrato y revelador para peroxidasa preparando: 20 ml de PBS, 16 mg de DAB, 60 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- Nuevamente se repitió la prueba colocando ahora en los carriles 1 y 2 , 5 µl de sobrenadantes 1 y 2 y pellet 1 del segundo protocolo de lisis de ooquistes de *E. tenella*, además de BSA y PBS como controles. El carril 1 fue incubado con Supracox 1:200 y el carril 2 con suero positivo 1:200 por una hora a temperatura ambiente con agitación constante. En el carril 3 se colocaron directamente 5 µl BSA (1mg/1ml), IgG, PBS, IgY Supracox, suero positivo aviar y suero negativo aviar. Todas las membranas se incubaron posterior al lavado con PBS con un conjugado Anti-IgY diluido 1:1,000 por 1 hora a temperatura ambiente con agitaciones constantes y reveladas con el estuche para peroxidasa de rábano con sustrato quimioluminiscente Perkin-Elmer.

### **Ensayo de Inmunoabsorbencia enzimática (ELISA)**

Se realizaron pruebas de inmunoabsorbencia enzimática adsorbiendo 200 µl del antígeno identificado como sobrenadante “1” del segundo protocolo de lisis de ooquistes en diluciones 1:10 y 1:20 y de la proteína Et-MIC-2 (proteína recombinante de micronemas obtenida a partir de la proteína 2 de dichos orgánulos del complejo apical de *E. tenella*) a las placas de ELISA de 96 pozos y

haciendo diluciones dobles seriadas a partir del pozo A y hasta el H en buffer de carbonatos como sigue:

	1	2	3	4	5	6	7
A	Mic 3.4	Supra 1:2000					
B	Mic 1.7	Supra 1:2000					
C	Mic 0.85	Supra 1:1000					
D	Mic 0.42	Supra 1:1000					
E	Mic 0.21						
F	Mic 0						
G	Sobrenadante "1" 1:10						
H	Sobrenadante "1" 1:20						
	SUPRACOX 1:100		SUPRACOX 1:200		SUPRACOX 1:400		

Cuadro 1. Colocación en la placa de 96 pozos para ELISA, de las muestras de antígeno identificado como "1" segundo protocolo de extracción de proteínas a partir de la lisis de ooquistes esporulados de *E. tenella* , y de la proteína de *E. tenella* Et-MIC2, en diluciones dobles seriadas

Una vez pegado al antígeno en la placa, se incubó con Supracox o con suero positivo a *E. tenella* por 2 horas diluido en PBS/BSA 1:100, 1:200 y 1:400 como se muestra en la tabla 1. También se colocó un control con Supracox 1:2,000 y 1:1,000 sin antígeno en los pozos A7 a D7. Se lavaron e incubaron las muestras con conjugado Anti-IgY acoplado a peroxidasa de rábano en dilución 1:4,000 en PBS/BSA durante 30 minutos. Se lavaron los pozos 3 veces y se añadió el sustrato y solución de revelado (30 mg de OPD en 10 ml PBS+ 30  $\mu$ l  $H_2O_2$ ) incubándose 1 hora en la oscuridad. La reacción se detuvo con 100  $\mu$ l  $H_2SO_4$  (2N) y se leyó a 490 nm.

### **Inmunohistoquímica**

Se realizaron pruebas de inmunohistoquímica tanto a cortes de ciegos incluidos en parafina de aves machos raza Leghorn de 12 semanas de edad, infectadas con *E. tenella* y sacrificadas al día 7 post inoculación, como a ciegos de aves sanas sin infectar, esto con objeto de identificar si las inmunoglobulinas presentes en la yema de huevo (Supracox), reconocían a los parásitos. Los ciegos se incluyeron en parafina para hacer cortes histológicos a los mismos y teñirlos con hematoxilina-eosina como control o con la tinción de inmunohistoquímica siguiendo las indicaciones del manual técnico contenido en el estuche comercial de Zymed.

### **Procesamiento de la muestra para inmunohistoquímica.**

1. Se colectó el órgano o tejido en frasco de cristal con formol al 10% para tinciones, en éste caso hematoxilina-eosina, o en formol amortiguado para Inmuno histoquímica.
2. Se cortó un pequeño trozo de tejido, de unos 2-3 mm de grosor y se colocó en la canastilla con orificios para colocarlo en el histokinette.
3. El histokinette constó de varios pasos:
  - a) Se deshidrató sumergiendo la muestra en :
    - Un paso por formol
    - 1 paso por etanol al 70%
    - 2 pasos por etanol al 96%
    - 3 pasos por etanol absoluto
    - 1 paso por xilol/etanol (1.1)
    - 2 paso por xilol absolutos
  - b) Infiltración:
    - 2 pasos por parafina
  - b) Una vez infiltrado en parafina, (al día siguiente), se sacó de la canastilla y se colocó en el molde (cubo, etc) para incluir y formar el bloque de parafina
  - c) Se colocó el cubo en el microtomo y se hicieron cortes del tejido de aproximadamente 3 micras de espesor.
  - d) Se colocó el tejido cortado con la parafina en baño María a 36°C, esto para que el tejido se “extienda” y se recolectó con el portaobjetos centrando bien la muestra.

e) Se desparafinó para trabajarla, en estufa a 60°C por 2 horas (inclinado el portaobjetos para que resbalara la parafina)

f) Se rehidrató el tejido sumergiendo la muestra en:

- Un paso por xilol absoluto por 15 min,
- Un paso por xilol/etanol (1.1)
- Un paso de etanol absoluto
- Un paso por etanol 96%
- Un paso por agua destilada

g) Se procedió a realizar la inmuno histoquímica

Las muestras para inmunohistoquímica fueron:

Ciego + con suero (+) + anti IgY-HRP

Ciego + con Supracox + anti IgY-HRP

Ciego + con suero (-) + anti IgY-HRP

Ciego + sin anticuerpo + anti IgY-HRP

Ciego - con Supracox + anti IgY-HRP

Ciego - con suero (+) + anti IgY-HRP

1. Se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena mediante la adición de 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 9 ml metanol.

2. Se incubó con solución de bloqueo del estuche Zymed

3. Para incubar, se añadió el primer anticuerpo (Supracox, suero positivo, suero negativo o nada) dilución 1:20 y se incubó el tejido 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavo bien con PBS 3 veces.

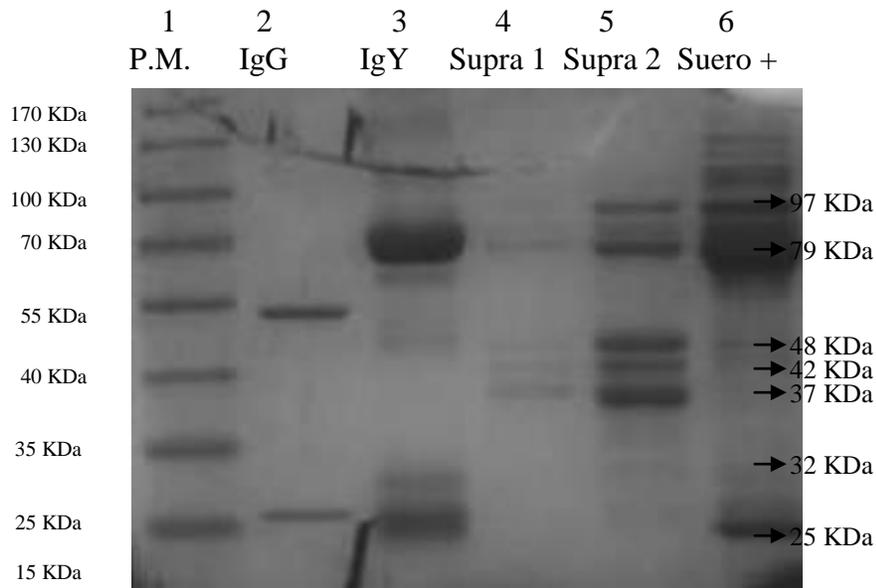
4. Se colocó el segundo anticuerpo o Anti-IgY acoplado a peroxidasa y producido en conejo. Se incubó el tejido por 30 minutos. Se lavó con PBS.
5. Se añadió al tejido el cromógeno, buffer del sustrato y sustrato, una gota de cada reactivo, y se dejó 3 a 5 minutos hasta que desarrollara color, todos estos reactivos del estuche comercial de Zymed. Se enjuagó con agua destilada.
6. Se realizó la contra tinción con Hematoxilina y se dejó 1 a 3 minutos hasta que tomara coloración azul. Se enjuagó con agua corriente y luego con PBS
7. Se dejó secar la muestra y se montó con resina y el cubreobjetos.

## **RESULTADOS**

### **1. Caracterización de Supracox para detectar la presencia de**

#### **IgY:**

Con el fin de analizar si el Supracox tiene únicamente IgY, o bien presenta otras proteínas, se realizaron varias pruebas en geles de acrilamida-bisacrilamida al 10% y 12% en condiciones reductoras (EGPA)-SSD, teñidas por Coomassie (Fig 8). En todas las ocasiones se encontraron 6 bandas muy aparentes cuyos pesos iban de 98 KDa a 25KDa. Como ejemplo se presenta uno de los geles de poliacrilamida al 10% con 1 mm de espesor (Fig. 9), en donde claramente se puede apreciar, en el carril 5, el producto Supracox, con 6 bandas fácilmente distinguibles de aproximadamente 97kDa, 84kDa, 79kDa, 48kDa, 42kDa y 35kDa. En forma más tenue se pueden distinguir tres bandas más, de 37kDa, 32kDa y 25kDa. Algunas de las bandas corresponden a las encontradas tanto en la IgY comercial (carril 3), como en el suero aviar, (carril 6), pero no en la IgG (de humano o de bovino) comercial (carril 2).

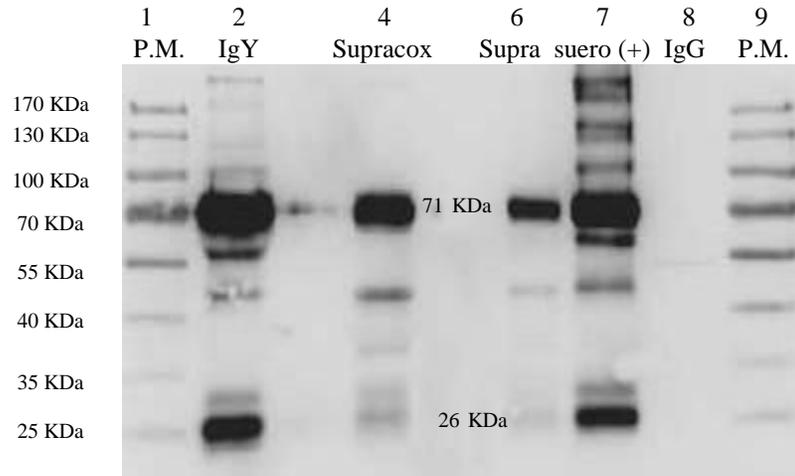


**Fig. 8** Electroforesis en gel al 10% de poliacrilamida

Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 IgG1 humana; carril 3 IgY comercial pollo; carril 4 Supracox con 2 años de elaboración; carril 5 Supracox de reciente elaboración, carril 6, suero aviar. En los carriles 4 y 5 observamos 6 bandas con rangos de peso aproximado de entre 97kDa a 25kDa.

Para determinar si estas bandas son IgY o sus productos de degradación, se procedió a realizar un análisis por Western Blot, utilizando para el revelado conjugados anti-IgY, tanto de origen cunícola como caprino, acoplados a fosfatasa alcalina y un sustrato quimioluminiscente. Como se observa en la Fig. 9, en el carril que contiene Supracox se reconocen por estos anticuerpos bandas proteínicas de aproximadamente 71kDa, 45kDa y 26kDa, iguales a las observadas en el carril de IgY de gallina, utilizado como referencia. Esto permite afirmar que

Supracox contiene cantidades abundantes de IgY además de otras proteínas antes detectadas en la electroforesis.



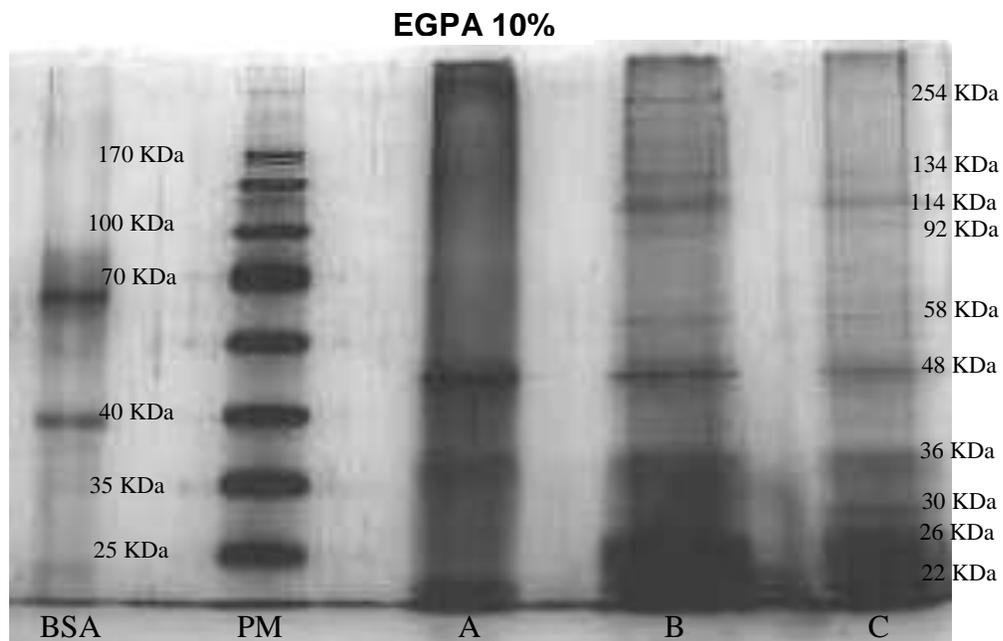
**Fig. 9** Inmunoblot de IgY gallina (carril2), Supracox (carril 4), supracox (carril6), suero de gallina, (Carril 7), IgG humano (carril 8), revelado con anti-IgY acoplado a fosfatasa alcalina, por quimioluminiscencia. En el carril 1 está el marcador de peso molecular de Fermentas, con rango de peso de 170 kDa a 10 kDa.

## 2. Obtención de proteínas a partir de ooquistes de *Eimeria*

### *tenella*:

Con el primer procedimiento del lisis de ooquistes esporulados de *E. tenella*, mediante el cual se obtuvieron 3 sobrenadantes: A, B y C, estos se analizaron por electroforesis. Se encontraron varias bandas que van desde 254 KDa hasta 22 kDa, como se observa en la figura 10. Cabe destacar que los carriles con sobrenadantes B y C, vemos que presentan más bandas que el carril con

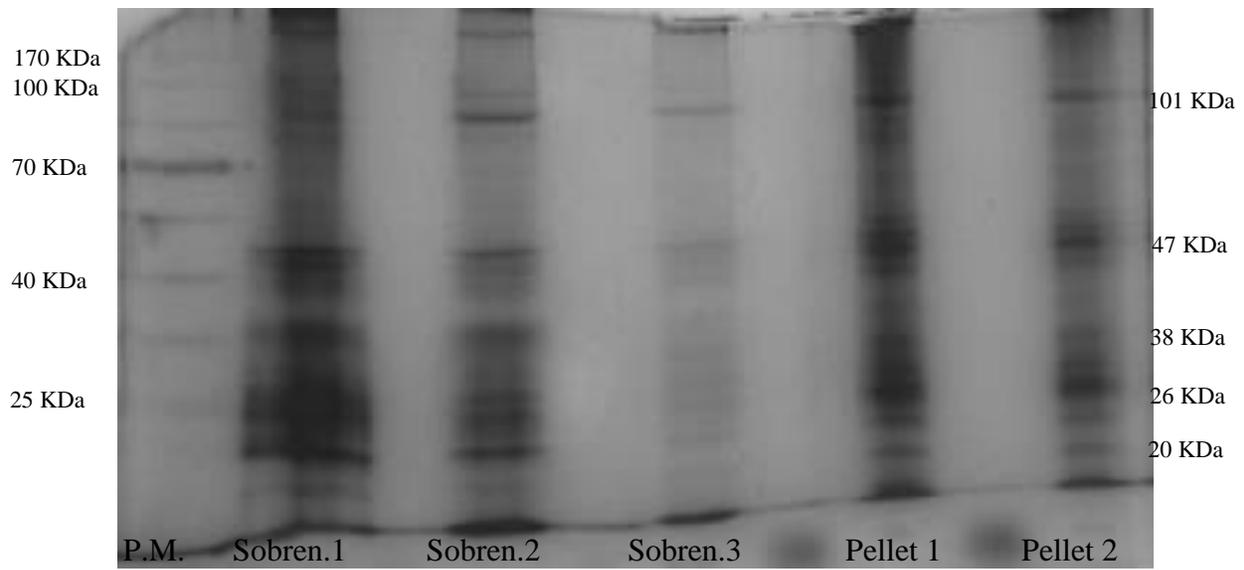
sobrenadante A, debido a que B y C son sobrenadantes de las partículas no solubles, que fueron tratadas con Triton X-100, por lo que probablemente se traten de moléculas asociadas a la pared o membrana del ooquiste.



**Fig 10** La PAGE-SDS al 10% teñido con azul de Coomasie de las fracciones “A”, “B” y “C” obtenidas por lisis de ooquistes esporulados, mostró la presencia de varias bandas. Las proteínas encontradas varían en peso, encontrándose con rangos de entre 254 a 22 kDa.. Carril 1 Albúmina sérica bovina, carril 2 Marcador de peso molecular, carril 3 sobrenadante A, carril 4 sobrenadante B, carril 5 sobrenadante C

En la Fig. 11 se observan varias bandas de proteína con la tinción de plata coloidal para todos los sobrenadantes y pellets obtenidos con el segundo protocolo de lisis de ooquistes esporulados de *E. tenella*. Los rendimientos de todos los protocolos

de lisis de ooquistes para extracción de proteínas del parásito son en general bajos, obteniéndose entre 250µl a 500 µl de muestra con cantidades variables de proteína (aproximadamente 96µg/ml).



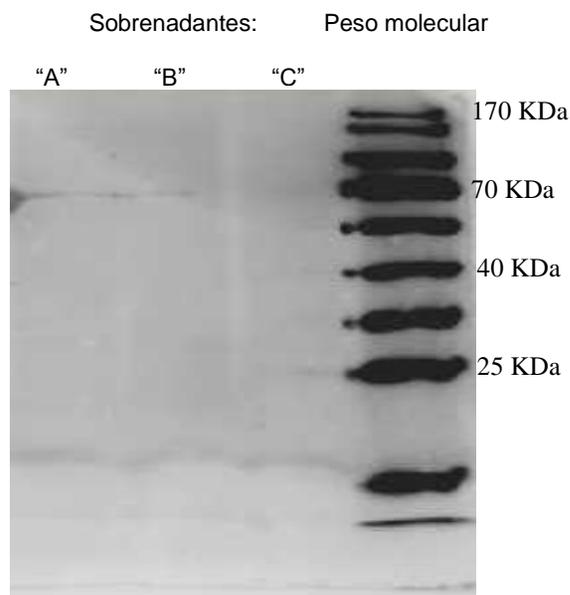
**Fig 11** La EGPA al 10% de fracciones “1”, “2” y “3” y pellets “1” y “2” de proteínas obtenidas por lisis de ooquistes de *Eimeria tenella* muestra nuevamente varias bandas con rangos de pesos variables. Las muestras colocadas se refieren a las fracciones obtenidos mediante el segundo procedimiento de lisis de ooquistes de *E. tenella*. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular.

### **3. Caracterización de las proteínas de *E. tenella* reconocidas por el producto Supracox**

Se realizó western blot con los antígenos obtenidos a partir de la lisis de ooquistes de *E. tenella*. Las membranas fueron incubadas con Supracox o con suero, colocando en uno de los carriles IgY comercial como control.

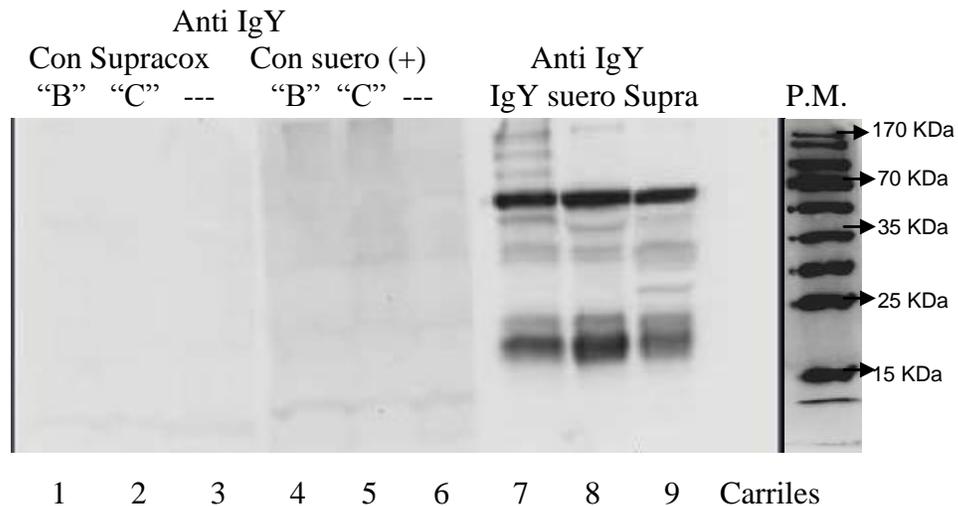
Para asegurar que la transferencia de las proteínas gel a la membrana de nitrocelulosa fue correcta, ésta fue teñida con rojo Ponceau y desteñida antes de bloquear y realizar el inmunoensayo.

En ninguna de las ocasiones en que se realizó el western blot se encontró señal ni con el Supracox, ni con el suero frente a los antígenos obtenidos de los ooquistes lisados, un ejemplo de estos ensayos se presenta en las Figs.12 y 13. Se realizaron varios ensayos incrementando la concentración de lisado en los carriles, incubando las membranas con Supracox o suero a diluciones de 1:200 hasta 1:1,000, así como de anti-IgY de 1: 1,000 hasta 1:5,000



**Fig. 12** Western blot con los antígenos “A”, “B” y “C” obtenidos del primer procedimiento de lisis de ooquistes de *E. tenella* esporulados e incubados con Supracox como primer anticuerpo. No se observa reconocimiento en ninguno de ellos.

En la figura 13 se puede observar el reconocimiento de IgY comercial por el anti-IgY-peroxidasa (carriles 7-9) a diferentes concentraciones. Sin embargo en la membrana con proteínas de ooquistes incubadas con Supracox 1:200 (carriles 1-3) o con suero positivo 1:200, no observamos reconocimiento.

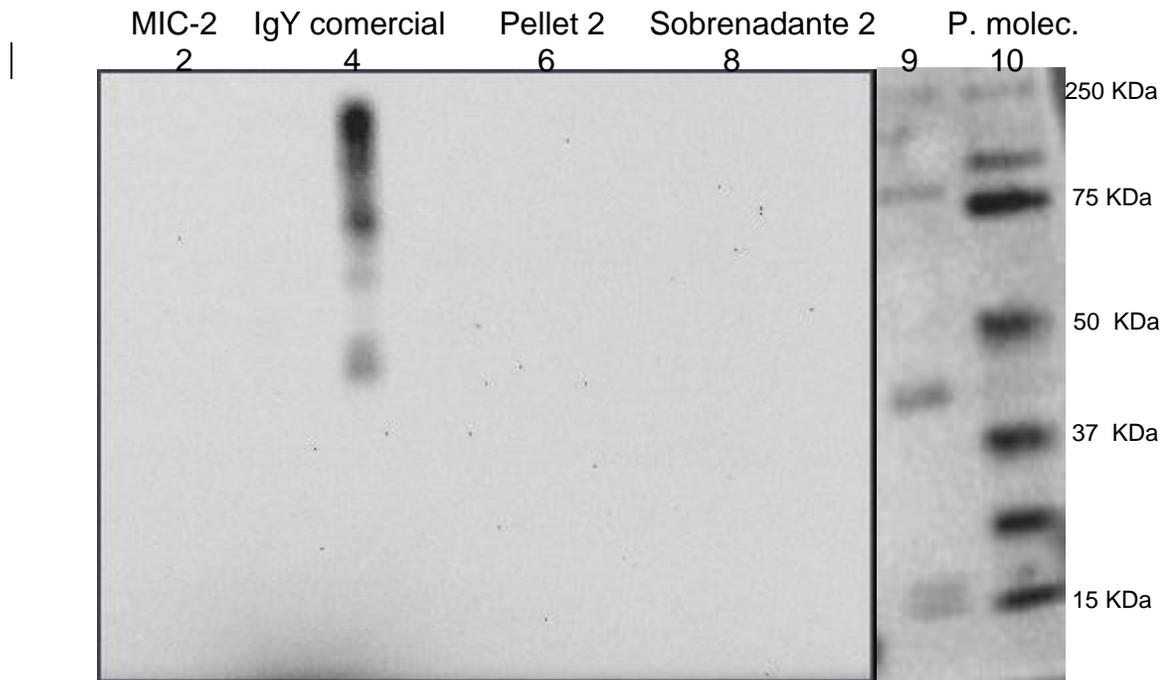


**Fig. 13** Western blot. En los carriles 1, 2, 4 y 5 sobrenadantes B y C respectivamente, incubados con Supracox diluido 1:200 (1 y 2) o suero positivo 1:200 (4 y 5). Carriles 3 y 6 sin antígeno proveniente de ooquistes lisados *E. tenella* como controles. En los carriles 7, 8 y 9 se colocó IgY comercial, suero aviar (+) y Supracox directamente y se incubó con Anti-IgY 1:1,000 para evaluar la confiabilidad del sistema.

Con la finalidad de ver si Supracox reconoce algún antígeno de *E. tenella*, se le solicitó a la Dra. Hyunn Lillehoj que proporcionara un antígeno recombinante. Este corresponde a la proteína Et-MIC-2 de *E. tenella*,

purificada de *E. coli* recombinante. Como se observa en la Fig. 14, tampoco contra esta proteína hubo reconocimiento.

### Western blot

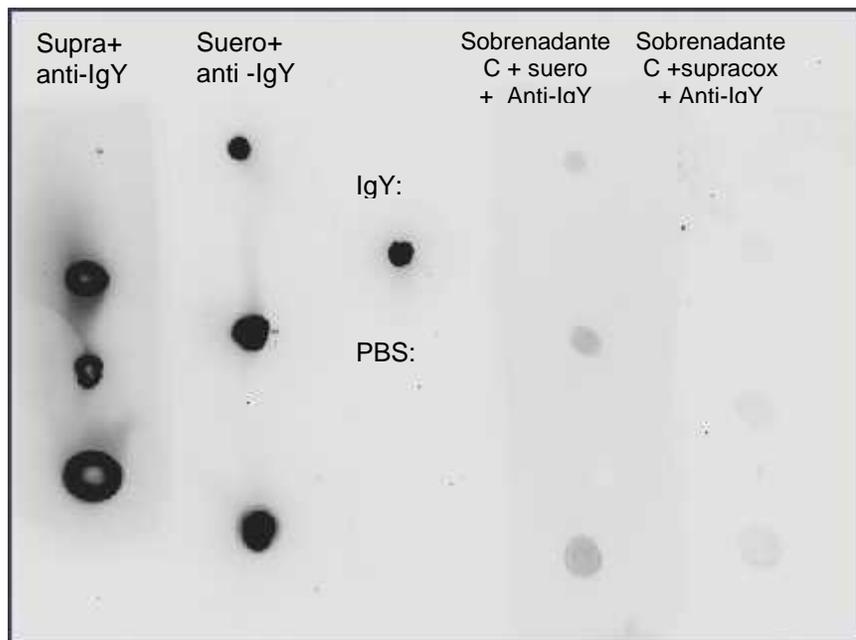


**Fig. 14** Western blot de proteínas antigénicas obtenidas a partir del segundo protocolo de lisis de ooquistes esporulados de *E. tenella*. Carril 2 proteína Et-MIC-2 de micronemas de esporozoitos de *E. tenella*, carril 4 IgY comercial, carril 6 pellet 2, carril 8 sobrenadante 2, carril 9 marcador molecular, carril 10 marcador molecular. La membrana se incubó con Supracox 1:200

Para descartar que la falta de detección se debiera a que se tratara de antígenos conformacionales desnaturalizados por las condiciones reductoras de la electroforesis, se realizaron pruebas de Dotblot con antígenos en su

forma nativa en membranas de nitrocelulosa incubadas con suero aviar (+) o Supracox y conjugado anti-IgY producido en caprinos y acoplado a peroxidasa.

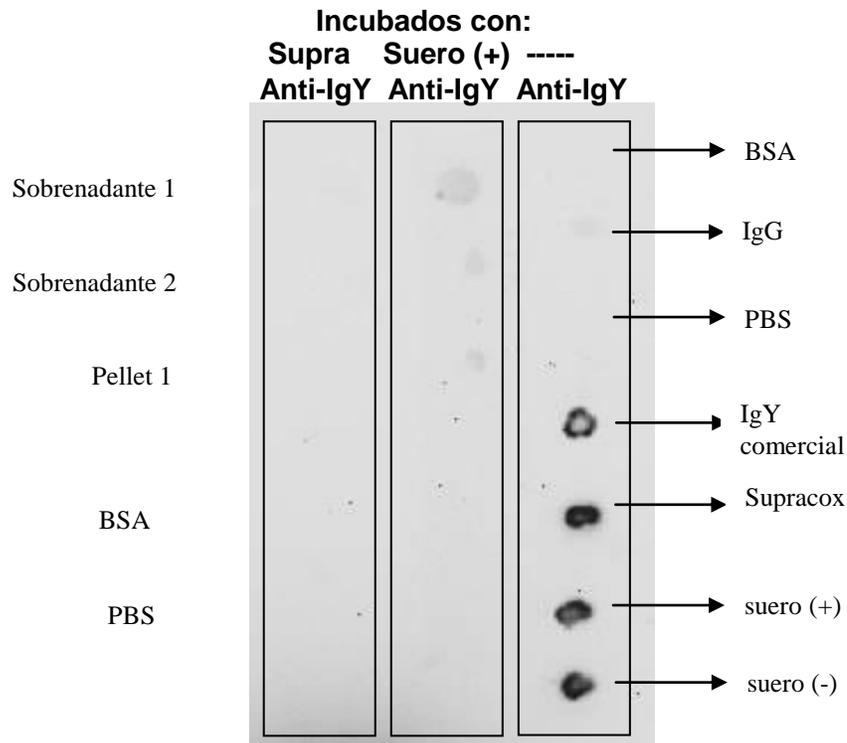
Para las pruebas de Dot Blot sólo se encontró señal en los controles de IgY, tanto sérica como de origen de yema de huevo (Supracox), con anti-IgY acoplada a fosfatasa o peroxidasa. En la figura 15 se muestran los resultados de colocar diferentes cantidades tanto de suero positivo como de Supracox, incubando con anti-IgY de origen cunícola acoplado a peroxidasa en las dos primeras columnas. En la columna 3 se colocó IgY comercial y PBS como controles, también incubados con anti-IgY acoplada a peroxidasa. Por último en las columnas 4 y 5 se colocó al antígeno, consistente en 1, 3 o 5 µl de sobrenadante "C" del primer protocolo de lisis de ooquistes esporulados (concentración inicial de ooquistes lisados de 5 millones/ml y 96µg/ml de proteína obtenida), incubándose con suero positivo en la columna 4 y con Supracox en la columna 5, ambos en dilución 1:1,000, para posteriormente incubarse ambas columnas (4 y 5) con anti-IgY de origen cunícola acoplado a peroxidasa diluído 1:5,000. Se reveló con un estuche comercial. En las dos ultimas columnas no hubo reconocimiento antigénico ni con Supracox ni con suero positivo aviar.



**Fig.15** Dot Blot . La columna 1 muestra Supracox incubado con anti-IgY; columna 2 suero (+) incubado con anti-IgY; columna 3 control (+) de IgY comercial y control (-) de PBS, ambos incubados con anti-IgY; columnas 4 y 5 sobrenadante C de *E. tenella* incubados con suero (+) o con Supracox en diluciones 1:1,000 respectivamente e incubados con anti-IgY en diluciones 1:5,000.

En la figura 16 se muestra que en los carriles 1 y 2 se colocaron 5  $\mu$ l de sobrenadantes 1 y 2 del segundo protocolo de lisis de ooquistes de *E. tenella*, además de BSA y PBS como controles negativos. El carril 1 fue incubado con Supracox 1:200 y el carril 2 con suero positivo 1:200 por una hora a temperatura ambiente. Todas las membranas se incubaron posteriores al lavado con PBS con anti-IgY diluido 1:1,000 por 1 hora a temperatura ambiente Como segundo anticuerpo. Nuevamente se puede

observar reconocimiento sólo en los controles de IgY y suero o Supracox colocados directamente sobre la membrana y revelados con anti-IgY. No se observó reconocimiento antigénico ni con Supracox ni con suero positivo.



**Fig. 16** Dot Blot en donde se observan, en los carriles 1 y 2 las fracciones sobrenadantes “1” y “2” obtenidos de la lisis de ooquistes de *E. tenella* colocados a razón de 5µl, además de PBS y BSA (1mg/1ml) como controles negativos. El carril 1 fue incubado con Supracox y el 2 con suero positivo aviar en diluciones 1:200. Posteriormente toda la membrana fue incubada con anti-IgY en dilución 1:1,000.

En las pruebas de Elisa para detectar reconocimiento antigénico, los resultados fueron negativos, encontrando lecturas semejantes tanto en las

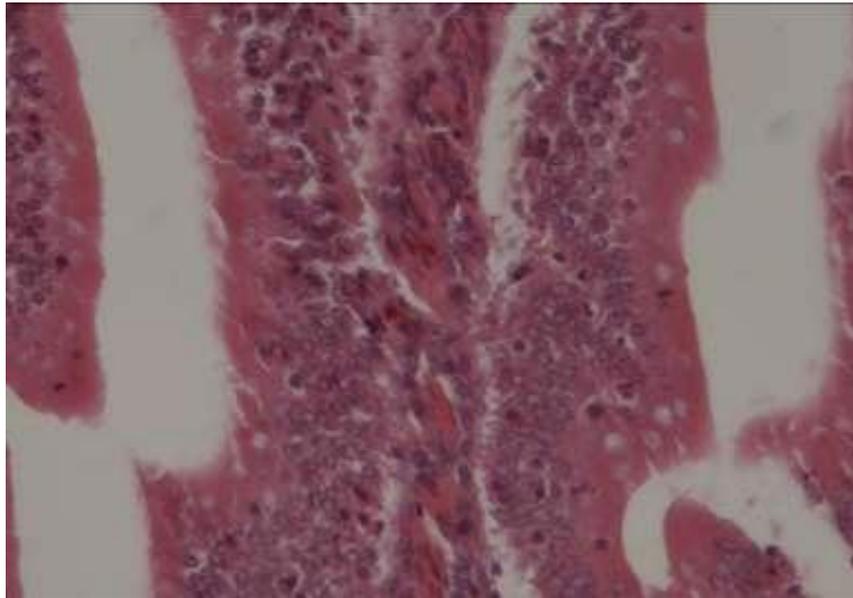
muestras de antígeno Et-MIC2, el sobrenadante 1 extraído a partir del segundo protocolo de lisis de ooquistes esporulados de *E. tenella*, como en los controles negativos, encontrando lecturas semejantes tanto en las muestras de antígeno como en los controles negativos.

### **Reconocimiento del parásito por Supracox *in situ*.**

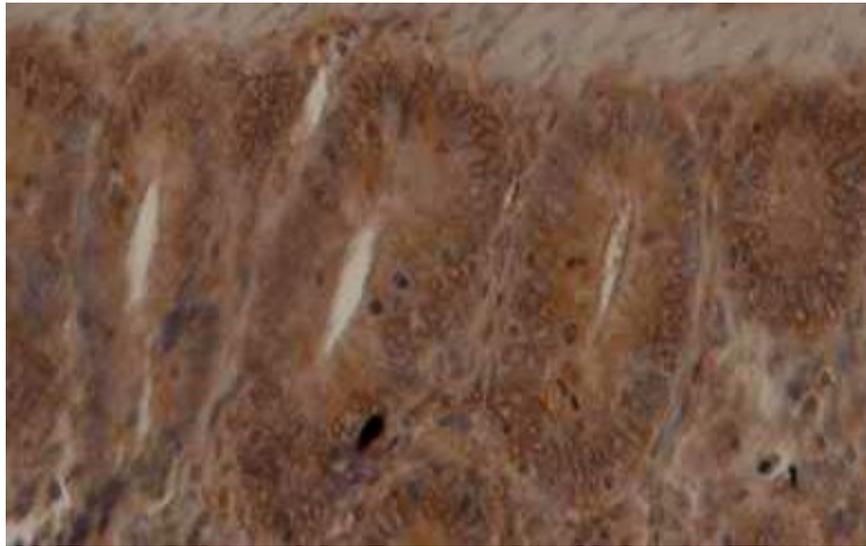
Con la finalidad de analizar si el Supracox reconoce otro estadio del parásito diferente al ooquiste, o alguna región particular del parásito, se decidió realizar un estudio de inmunohistoquímica en cortes de intestino de gallinas infectadas. En las figuras 17 y 18 se observan cortes de ciegos normales procedentes de aves sanas, sin la presencia del parásito, teñidas con tinciones de hematoxilina-eosina y con tinción de inmunohistoquímica respectivamente.

En la figura 19 se puede observar el ciego de una gallina infectada con *E. tenella* al día 7 post-infección, teñido con hematoxilina-eosina. Con esta tinción se pueden identificar claramente las vacuolas parasitóforas (merogonia/ gametogonia). Este tejido incubado con Supracox (Figura 20) o con suero positivo (Figura 21), utilizando en ambos casos la técnica de inmunohistoquímica, aparentemente muestra cierto reconocimiento de estas vacuolas, siendo particularmente evidente la asociación con la pared del parásito y muy poco la unión al interior de la misma. Sin embargo, también se observa ligero reconocimiento inespecífico detectado como una coloración café en otras partes del ciego, como en la superficie de las

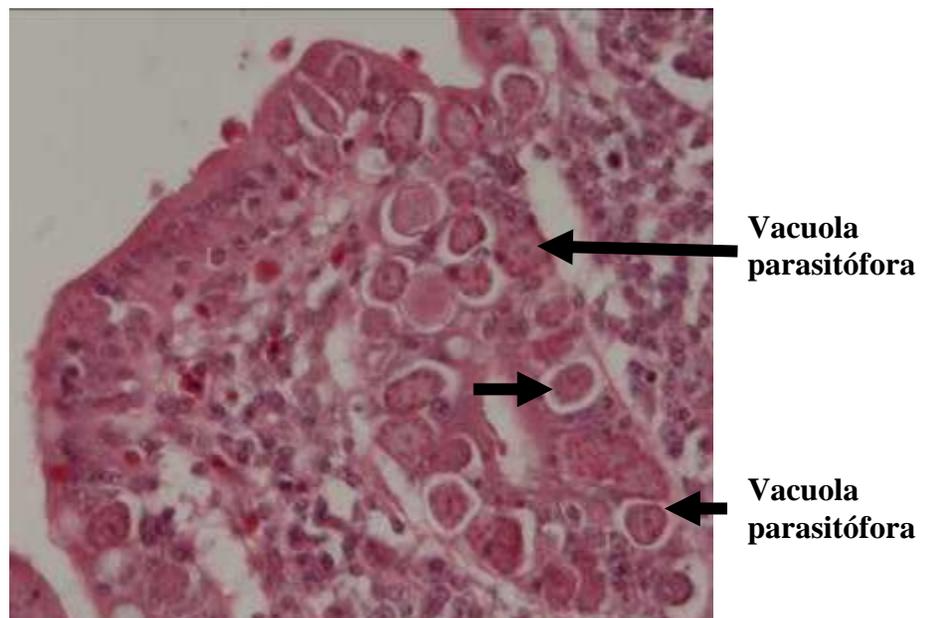
células. Ciegos infectados incubados únicamente con anticuerpo secundario no presentan esta tinción en vacuolas, pero si la tinción inespecífica antes mencionada (figuras 22 y 23). Tampoco se observaron vacuolas parasitóforas y por lo tanto no hay tinción de las mismas en ciego de gallinas no infectadas con *E. tenella* e incubadas con Supracox pero sí tinción inespecífica en todo el tejido (Figura 24).



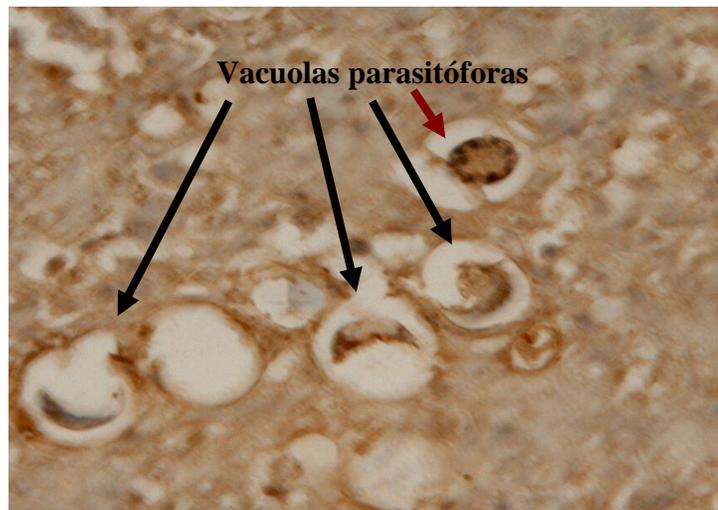
**Fig. 17** Ciego normal de ave teñido con hematoxilina-eosina (40x), sin la presencia del parasito em el tejido epitelial.



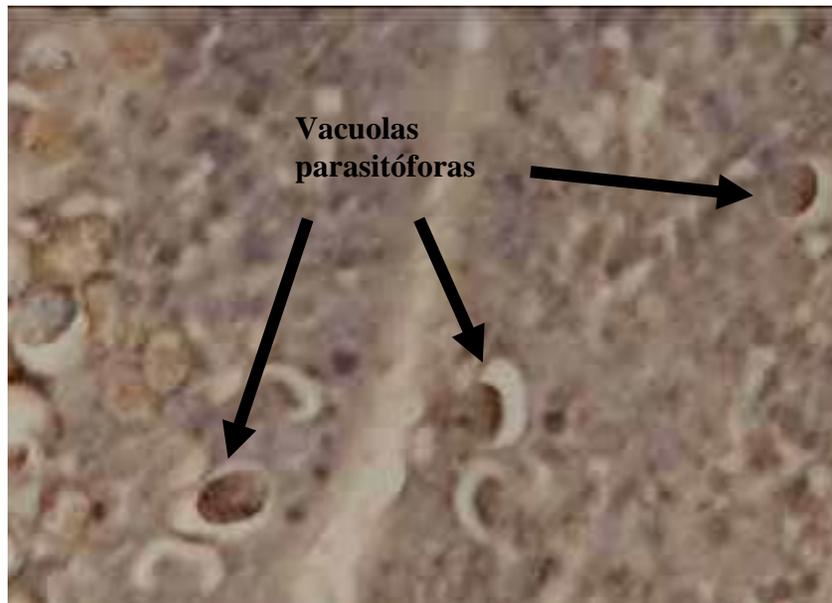
**Fig. 18** Ciego normal de ave teñido con la técnica de Inmunohistoquímica (40x), sin la presencia del parásito en el tejido.



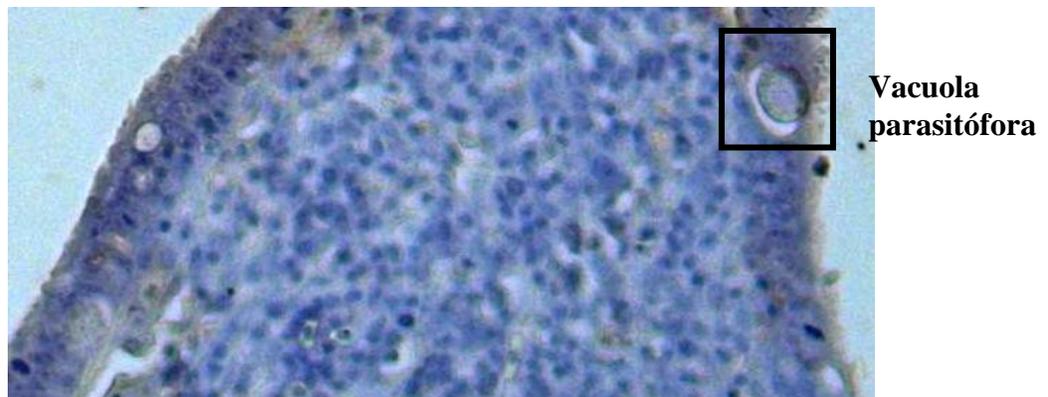
**Fig. 19** Ciego infectado con *E. tenella*. Las flechas muestran claramente algunas vacuolas parasitóforas. Tinción Hematoxilina-Eosina (40x)



**Fig. 20** Ciego infectado con *E. tenella*, incubado con Supracox y teñido con Inmunohistoquímica. Casi al centro y en la esquina inferior derecha se observa claramente la presencia del parásito en la vacuola parasitófora (ver flecha color rojo) (40x), con estructuras teñidas bien definidas hacia la periferia de la vacuola. Las fases del parásito dentro de las vacuolas corresponden a merogonias ó esquizogonias y gametogonias.



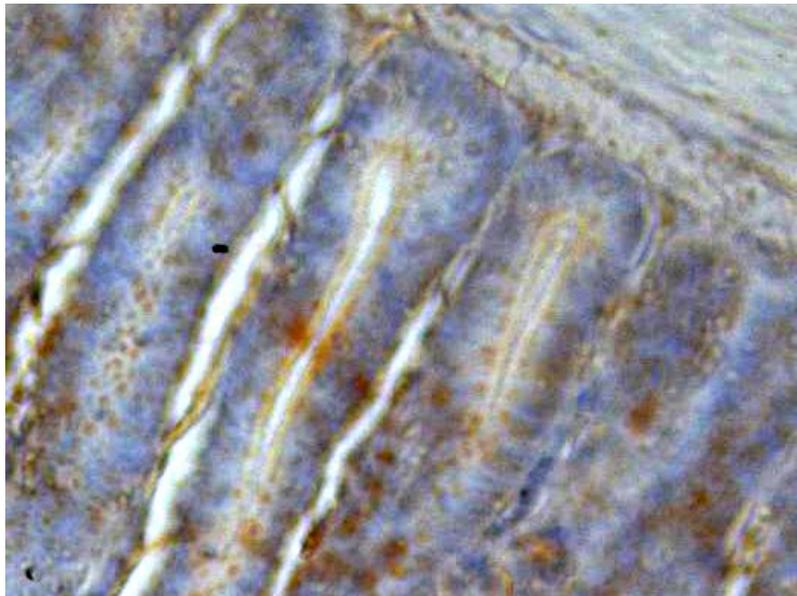
**Fig. 21** Ciego infectado con *E. tenella*, incubado con suero positivo y teñido con la técnica de Inmunohistoquímica (40X). Algunas vacuolas parasitóforas están señaladas con flechas.



**Fig. 22** Ciego infectado con *E. tenella* incubado sólo con anticuerpo secundario y sin anticuerpo primario (Supracox ó suero positivo) (40X). Tinción de Inmunohistoquímica. En el recuadro se observa una vacuola con el parásito (amplificada en la fig. 23).



**Fig. 23** Acercamiento de vacuola parasitófora negativa a la tinción de inmunohistoquímica proveniente de tejido infectado con *E. tenella* pero sin incubarse con anticuerpo primario.



**Fig. 24** Ciego sin infección incubado con Supracox. No se observan parásitos en el tejido, pero si inespecificidad en la tinción, nótese una coloración café en toda la muestra.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo demuestran que el producto comercial Supracox, es una mezcla de varias proteínas de yema de huevo, además de IgY (Fig 8 y 9). Algunas de estas proteínas están presentes también en sueros positivos obtenidos de aves inmunizadas con ooquistes esporulados de eimeria y confirmados mediante pruebas de microaglutinación en placa en cultivo con células de riñón de pollo. Esto se observó claramente en todos los Western blots realizados al Supracox (Fig. 9), donde se vió reconocimiento específico mediante el uso de una Anti-IgY conjugada tanto a fosfatasa alcalina como a peroxidasa, producidas en cabra o en conejo como anticuerpo primario contra IgY contenidas en Supracox y en suero aviar, en donde aparecen bandas de alrededor de 71 KDa, 45 KDa, y 26 KDa, que concuerdan también con lo reportado en la literatura para las cadenas pesada (65-70 KDa) y ligera (18-22 KDa) de la IgY (6). Esta inmunoglobulina es más pesada que la IgG de mamíferos, por tener un dominio extra en la cadena pesada y carente de región de bisagra, lo cual la hace más rígida que ésta última (42).

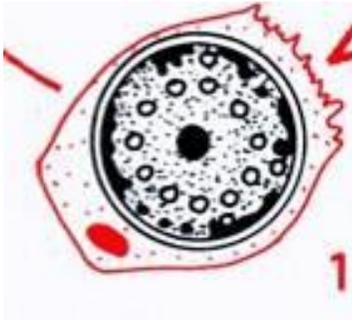
Sin embargo, en las pruebas de EPGA no se encontró reconocimiento por parte de Supracox ni del suero aviar positivo a *E. tenella*, proporcionado por la empresa IASA (Tehuacán, México) para las proteínas obtenidas a partir de la lisis de ooquistes esporulados de *E. tenella* detectados en geles de acrilamida/bisacrilamida (Figs. 12,13 y 14).

Para confirmar la falta de reconocimiento antigénico, se repitieron las pruebas de Western blot y se realizaron además pruebas de Dotblot y Elisa,

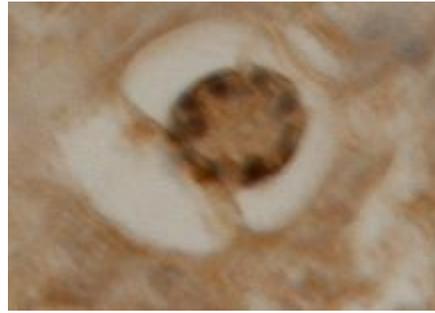
descartando que esta falta de reconocimiento hubiese sido debida a la presencia de antígenos conformacionales que se perdieran en el Western blot bajo condiciones reductoras. No obstante, no se encontró reconocimiento con ninguna de las pruebas realizada (Figs. 15 y 16).

En las pruebas de Inmunohistoquímica se detectó reconocimiento antigénico en ciegos de aves infectadas con ooquistes esporulados de *E. tenella*, incubados tanto con Supracox (Fig. 20) como con suero positivo al parásito (Fig. 21) lo cual podría indicar que el reconocimiento por los anticuerpos presentes tanto en el suero como en el Supracox pueden estar dirigidos contra algún otro estadio del ciclo de vida y no necesariamente contra las proteínas provenientes del ooquiste esporulado, que fue la forma del parásito utilizada en las pruebas del presente trabajo. Esto es comprensible debido a que las yemas utilizadas para la elaboración de éste producto provienen de ooquistes maduros esporulados de *E. tenella*, *E. máxima* y *E. acervulina* administrados por vía oral a las gallinas libres de patógenos específicos vacunadas al día de edad con una vacuna comercial e inmunizadas a partir de la 8 a 9 semana de edad con ooquistes de las tres cepas de eimerias y reforzando cada 6 semanas, lo que provoca una infección en el ave, el desarrollo de todas las fases de vida del parásito en el tracto intestinal del mismo y la consecuente inducción inmunidad celular y humoral, ésta última representada por anticuerpos séricos transmitidos a la yema del huevo. Se escogió trabajar con ooquistes esporulados por ser estos los utilizados para inmunizar a las gallinas libres de patógenos específicos que producirán los huevos para elaborar el Supracox. La hipótesis de que el Supracox actúa contra otras

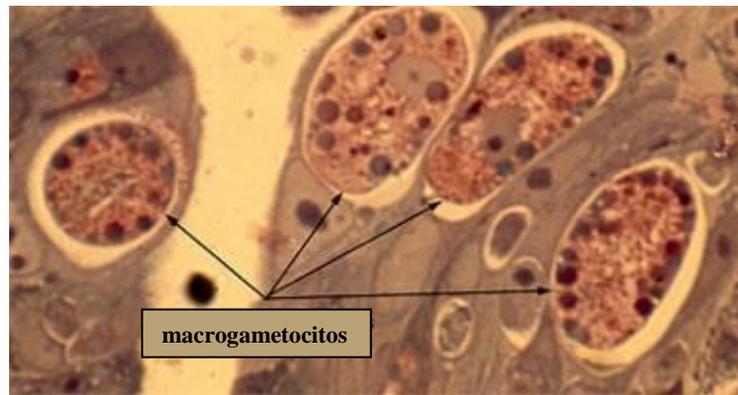
fases del ciclo de la coccidias es sugerido por las imágenes de Inmunohistoquímica de ciegos infectados con *E. tenella* e incubados con Supracox, donde se observa reconocimiento de estructuras periféricas presentes en la vacuola parasitófora, correspondientes más a las imágenes de etapas del parásito posteriores en el desarrollo del parásito que al ooquiste (Figs. 25,26,27) específicamente las etapas sexuales del macrogametocito y cigoto. La figura 25 es una representación didáctica de un macrogametocito (el ciclo completo se muestra en la figura 5). Como se puede observar en la figura 25, que reproduce un acercamiento de la vacuola parasitófora mostrada en figura 20 de la sección de resultados, las estructuras aparentes reconocidas por la tinción son muy similares a las mostradas en una representación gráfica de estadios sexuales del ciclo de vida del parásito en la figura 26, así como a las mostradas en la figura 27, que también corresponden a macrogametocitos. No obstante, la inespecificidad de la tinción observada en ciegos negativos a la infección con *E. tenella*, observada en la figura 22 y 24, dificulta la conclusión sobre reconocimiento de otros estadios posteriores en el desarrollo del parásito.



**Fig 25 Representación del macrogametocito o del cigoto fecundado. Nótese estructuras periféricas.**



**Fig. 26 Inmunohistoquímica del parásito en vacuola parasitófora. Nótese estructuras periféricas contenidas en el macrogametocito.**



Dr. S. S. Desser, University of Toronto, Toronto Canada

**Fig. 27 Macrogametocitos**

Por otra parte, como se mencionó con anterioridad, el tracto digestivo de las aves presenta muchos mecanismos de defensa físicos y químicos contra patógenos, tanto de inmunidad pasiva, tales como lisozima, sales biliares, mucina,

defensinas, pH, como de inmunidad adaptativa, como las inmunoglobulinas, producidas unos días después de la infección con eimerias pero con un papel de protección aún incierto. Aves bursectomizadas responden contra coccidiosis, no así aves timectomizadas o tratadas con anticuerpos anti CD8<sup>+</sup>, betametasona o ciclosporina A (19,20). Incluso se observan infiltrados de células mononucleares (linfocitos CD8<sup>+</sup> entre ellas) y granulocitos alrededor de las criptas de Lieberkühn y lamina propia, posteriores a la infección con eimerias (21,22). Se han observado estos mismos linfocitos CD8<sup>+</sup> en contacto directo con células intraepiteliales infectadas con eimerias (infecciones secundarias), sugiriéndolas como blanco de dichos linfocitos. Es por esta razón que algunos autores cuestionan el papel de la inmunidad humoral y apoyan la respuesta celular como base contra las infecciones contra coccidias. En base a éstos datos es también probable que por ello no logramos encontrar reconocimiento por parte de Supracox contra las proteínas presentes en los ooquistes esporulados de *E. tenella*.

Se reportan también picos de producción de anticuerpos, tanto circulantes como secretores tras la infección con *E. tenella*, IgM e IgY a los 17 días post infección, IgA biliar a los 7 días postinfección con ooquistes de *E. tenella* y *E. acervulina*. Es claro que la infección con ooquistes esporulados de eimeria estimula la respuesta inmune humoral mediante la producción de inmunoglobulinas que impidan la unión del esporozoito al epitelio intestinal, produciendo cambios conformacionales en el parásito o simplemente bloqueando sitios de unión o motilidad de la coccidias (22), sin embargo, Blake menciona que

no necesariamente la producción de anticuerpos es sinónimo de inmuoprotección (4).

Oneaga et al. en 1980 observó que la adición de suero inmune *in vitro* estimula la fagocitosis de merozoitos y esporozoitos en cultivo celular (31).

Es importante destacar el papel de las citocinas aumentando la presentación de antígeno y la expresión de moléculas co-estimuladoras (10). Esto podría sugerir otro probable mecanismo de acción del producto Supracox.

A futuro se podría tratar de hacer una separación por gradientes de Percoll, siguiendo un protocolo previamente reportado por la Dra. Paula Dulsky (10), de los diferentes estadios del parásito, para la extracción de proteínas y pruebas subsecuentes de posible reconocimiento celular en cada una por parte del Supracox. De esta forma se confirmaría el reconocimiento del producto hacia epítopes presentes en otra fase del desarrollo del parásito, como las fases sexuales del mismo, observadas en la inmunohistoquímica (Figs. 20 y 25).

Otra alternativa sería tratar de realizar inmunoprecipitación ó cromatografía con columnas de afinidad con el ligando adecuado para ambas técnicas, debido a que la IgY aviar, a diferencia de la IgG de mamíferos, no se une ni a proteína G ni a proteína A.

## **CONCLUSIÓN**

Tras estas pruebas se descarta la hipótesis planteada, concluyendo que Supracox no reconoce ningún antígeno obtenido a partir de la fase de ooquistes de las eimerias estudiadas, quedando abierta la posibilidad de que el producto reconozca antígenos presentes en otros estadios del ciclo de vida del parásito. Es necesario continuar con la caracterización del Supracox y el reconocimiento in situ en fases posteriores en el desarrollo de las coccidias.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Allen PC, Fetterer RH, Recent Advances in Biology and Immunobiology of *Eimeria* Species and in Diagnosis and Control of Infection with the Coccidian Parasites of Poultry. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 58-65
2. Bashar A E, Jian-Ping C, Ming-quan X, Guo-qing L, Zong-hua Q, Hui-xian W, Xing-Yu P, Weng-kang W. Characterization of Microneme-2 (EtMIC-2) gene of *Eimeria tenella* Guangdong strain. *International Journal of Poultry Science* 2003; 2(2): 133-138.
3. Belli S, Wallach G M, Luxford C, Davies M J, Smith N C. Roles of tyrosine-rich precursor glycoproteins and Dityrosine- and 3,4-dihydrophenylalanine-mediated protein cross linking in development of the oocyst wall in the coccidian parasite *Eimeria maxima*. *Eukaryotic Cell* 2003; 2(3): 456-464.
4. Blake DP, Shirley MW, Smith AL, Genetic identification of antigens protective against coccidian. *Parasite Immunology* 2006; 28: 305-314
5. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Ponder HW. *Diseases of Poultry*. 9<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press 1991.
6. Chacana P A, Terzolo H R, Gutiérrez Calzado E, Schade R. Anticuerpos de yema de huevo o Tecnología IgY. *Rev. Med. Vet.* 2004; 85(5): 179-189
7. Dalloul RA, Lillehoj H, Poultry coccidiosis. *Future Drugs LTD* 2006; 143-163.
8. De Souza W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2006; 78(2): 271-291
9. Ding X, Lillehoj H, Quiroz M A, Bevenssee E, Lillehoj E P. Protective Immunity against *Eimeria acervulina* following in ovo Immunization with

recombinant subunit vaccine and cytokine genes. *Infection and Immunity* 2004; 72(12): 6939-6944.

10. Dulsky P, Turner M. The purification of sporocysts and sporozoites from *Eimeria tenella* oocysts using Percoll density gradients. *Avian Diseases* 1988; 32: 325-329.
11. Elhag B A, Jian-ping C, Ming-quan X, Guo-qing L, Zong-hua Q, Hui-xian W, Xing-yu P, Weng-kang W. Characterization of microneme-2 (EtMIC-2) gene of *Eimeria tenella* Guangdong strain. *International Journal of Poultry Science* 2003; 2(2): 133-138
12. Hong Y H, Lillehoj H S, Lillejoh EP, Lee S H., Dallou R A, Lillehoj E P. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006; 114:209-223.
13. Hong Y H, Lillejoh H S, Lillehoj E, Lee S H. Changes in expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria maxima* infection in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006; 114: 259-272
14. Hong YH, Lillehoj H, Lillejoh EP, Lee SH. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria* infection of chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006; 114:256-272
15. Karkhanis Y D, Nollstadt K A, Boghal B S, Ravino O, Cllegrino R P, Crane M S, Murray P K, Turner M J. Purification and characterization of a

protective antigen from *Eimeria tenella*. Journal of Animal Health and Production 1983; 59(3): 983-989.

16. Lee S H, Lillehoj H S, Park D W, Jang S I, Morales A, García D, Lucio E, Larios R, Victoria G, Manrufo D, Lillehoj E P. Protective effect of hyperimmune egg yolk antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. Veterinary Parasitology 2009; 163: 123-126.
17. Lee S H, Lillehoj H S, Park D W, Jang S I, Morales A, García D, Lucio E, Larios R, Victoria G, Manrufo D, Lillehoj E P. Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk immunoglobulin. Poultry Science 2009; 88: 562-566.
18. Levine N D. Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa. The Journal of Eukaryotic Microbiology 1988; 35(4): 518-520.
19. Lillehoj H S. Passive Protection Against Coccidiosis. Poultry Science Association Meeting Abstract 2007; 13
20. Lillehoj H S, Dallou R A. Recent advances in Immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. Avian Diseases 2005; 49(1): 1-8.
21. Lillehoj H S, Okamura M. Host Immunity and vaccine development to coccidia and Salmonella infections in chickens. Journal of Poultry Science 2003; 40: 151-193.
22. Lillehoj H S, Trout J M. Avian Gut Associated Lymphoid Tissues and Intestinal Immune Response to *Eimeria* Parasites. Clinical Microbiology Reviews 1996; 9(3): 349-360

23. Ling KH, Rajandream M A, Rivailler P, Ivens A, Yap SJ Madeira A MBN, Mungall K, Billington K, Yee WY, Bankier A T, Carroll F, Durham A M, Peters N, Loo SS, Mat Isa M N, Novaes J, Quail M, Rosli R, Shamsudin M, Sobreira T J P, Tivey A R, Wai SF, White S, Wu K, Kerhornou A, Blake D, Mohamed R, Shirley M, Gruber A, Berriman M, Tomley F, Dear P H, Wan KL. Sequencing and analysis of chromosome 1 of *Eimeria tenella* reveals a unique segmental organization. *Genome Research* 2007; 17: 311-319.
24. Ling KH, Rajandream MA, Rivailler P, Ivens A. Sequencing and analysis of chromosome 1 of *Eimeria tenella* reveals a unique segmental organization. *Genome Res.* 2007; 17:311-319.
25. Lopez P R, Machado T Y, Serrano P H Z. Coccidiosis aviar: algunas consideraciones. [www.monografias.com](http://www.monografias.com).
26. McDougald L. Intestinal protozoa important in poultry. <http://www.poultryscience.org/psa/toc/papers/98/ps/981156.pdf>.
27. Miska KB, Fetterer RH, Lillehoj HS, Jenkins MC, Allen PC, Harper SB. Characterization of macrophage migration inhibitory factor from *Eimeria* species infectious to chickens. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2007; 151: 173-183.
28. Moreno D. R., Dinámica poblacional de las especies de *Eimeria* en pollos de engorda en varios estados de la República Mexicana. Tesis de doctorado. UNAM 2002.

29. Mouafo AN, Weck-Heimann A, Dubremetz JF, Monoclonal antibodies specific for the two types of wall-forming bodies of *Eimeria tenella* macrogametes (Coccidia, Apicomplexa). *Parasitol Res* 2002; 88:217-224.
30. Nguyen S, Lillehoj H S, Donohue J, Yokohama A, Kodoma Y. Passive protection against two *Eimeria* species in chickens by orally administered antibodies specific for a single *Eimeria* protein. *American Association of Avian Pathologists* 2004; 21.
31. Onaga H, Ishii T. Effects of chicken anti *Eimeria tenella* serum on phagocytosis of sporozoites and merozoites by chicken peritoneal macrophages. *Journal of Veterinary Science* 1980; 42: 211-219.
32. Ourzane M, Labbe M, Pery P. Purification of first-generation *Eimeria tenella* schizonts. *Journal of Parasitology* 1998; 84(5): 1027-1031.
33. Pinto J, Barco M, Afanador M C, Merchán A M, Montañez M F, Andrade F, Torres O. Obtención de anticuerpos policlonales IgY antiparvovirus canino a partir de yema de huevo de gallina. *Universitas Scientarum* 2005; 10 (1): 37-44
34. Quiroz R H. *Parasitología y Enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. Editorial Limusa 1984;119-177
35. Shirley MW, The genome of *Eimeria spp.*, with special reference to *Eimeria tenella*- a coccidium from the chicken. *International Journal of Parasitology* 2000; 30:485-493.

36. Shirley M W, Harvey D A. A genetic linkage map of the apicomplexan protozoan parasite *Eimeria tenella*. *Genome Research* 2000; 10:1587-1593
37. Shirley M W, Harvey D A. Sequencing and analysis of chromosome 1 of *Eimeria tenella* reveals a unique segmental organization. *Genome Research* 2007; 10:1587-1593
38. Shirley M W, Ivens A, Gruber A, Madeira A M B N, Wan K-L, Dear P H, Tomley F M. The *Eimeria* genome projects: a sequence of events. *Trends in Parasitology* 2004; 20 (5) 199-201.
39. Stotish R L, Wang C C, Meyenhoffer M. Structure and composition of the oocyst wall of *Eimeria tenella*. *Journal of Parasitology* 1978; 64: 1074-1081.
40. Talebi A, Mulcahy G. High resolution mapping of B-cell epitopes within an antigenic sequence from *Eimeria tenella*. *Infection and Immunity* 1994; 62(10) 4202-4207.
41. Takehiko Y., Raj J. L., Hatta H., Kim M. (1996). *Hen Eggs: Their Basic and Applied Science*. CRC Press. Pp.153.
42. Tizzard I R. *Inmunología Veterinaria*. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. Londres 2000.
43. Tomley F M. Characterization of rhoptry proteins of *Eimeria tenella* sporozoites: Antigenic diversity of rhoptry epitopes within species of the genus *eimeria* and among three asexual generations of a single species, *E. tenella*. *Infection and Immunity* 1994; 62(10): 4656-4658

44. Wallach M G, Smith N C, Petracca M, Miller C M, Eckert J Braun R. *Eimeria maxima* gametocyte antigens; potencial use in a subunit maternal vaccine against coccidiosis in chickens. *Vaccine* 1995; 13: 347-354.
45. Weber F H, Genteman K C, LeMay M A, Lewis D O, Evans N A. Immunization of broiler chicks by in ovo injection of infective stage of *Eimeria*. *Poultry Science* 2004; 83: 392-399.
46. Weber F H, Evans N A. Immunization of broiler chicks by *in ovo* injection of *Eimeria tenella* sporozoites, sporocysts or oocysts. *Poultry Science* 2003; 82: 1701-1707.
47. Williams R B. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *International Journal of Parasitology* 1999; 29: 1209-1229.
48. Yuño M M, Gorgoza L M. Coccidiosis aviar. *Revista veterinaria* 2008; 19 (1): 61-66

## **ANEXO**

### **Protocolo de Western blot para sobrenadante y pellet, obtenidos a partir de ooquistes de *Eimeria tenella***

#### 1. 0 A Gel para los antígenos:

Se preparó un gel de corrimiento al 10% con 1.5 mm de grosor y al 4% concentrador, según el manual técnico de Bio-Rad, para fraccionar las proteínas obtenidas a partir de los ooquistes esporulados

#### 1.1 A Gel de corrimiento al 10%

- a) 4.1 ml de agua destilada
- b) 3.3 ml de solución de monómeros (acrilamida/bisacrilamida)
- c) 2.5 ml de buffer Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)
- d) 100 µl de SDS (Dodecyl sulfato de sodio)
- e) 50 µl de APS (Persulfato de amonio)
- f) 5 µl de Temed

#### 1.2 A Gel concentrador al 4%

- g) 3.05 ml de agua destilada
- h) 0.65 ml de solución de monómeros (acrilamida/bisacrilamida)
- i) 1.25 ml de buffer Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)
- j) 100 µl de SDS (Dodecyl sulfato de sodio)
- k) 50 µl de APS (Persulfato de amonio)
- l) 10 µl de Temed

## 1.0 B Gel para las IgY de huevo (Supracox) y séricas

Se preparó un gel de corrimiento al 10% con 1.0 mm de grosor y al 4% concentrador, según el manual técnico de Bio-Rad, para fraccionar las IgY obtenidas a partir de yema y de suero.

- Los geles se prepararon en placas de cristal de 16 cm x 18 cm previamente lavados con una solución de detergente suave, secado y desengrasado con una solución de etanol al 70%, colocadas en el soporte para geles de Bio-Rad.
- El espaciador de los mismos era de 1.5 mm (1 A) y 1.0 mm respectivamente (1 B)
- Se agregó agua destilada para asegurar que no había fugas en los cristales y se esperó 15 minutos
- Transcurrido el tiempo, se escurrió el agua y se secó con papel filtro, añadiéndose el gel de corrimiento al 10% inmediatamente después de la adición de Temed y Persulfato de amonio al mismo, dando golpes ligeros en el soporte, así como la adición de agua destilada, cuidadosamente, para lograr la uniformidad de la zona superior del gel.
- Una vez polimerizado, se añadió el gel concentrador al 4% y el peine con 10 pozos y se guardó cuando polimerizó, a 4°C.

### 1.1 Solución buffer Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)

27.23 g de Trizma base

80 ml agua destilada

\* Se ajusta el pH a 8.8 con una solución de HCL 6N y se lleva a 150 ml con agua destilada.

Se almacena la solución a 4° C

### 1.2 Solución buffer Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)

6 g de Tris HCl

60 ml agua destilada

\* Se ajusta el pH a 6.8 con una solución de HCL 6N y se lleva a 100 ml con agua destilada.

Se almacena la solución a 4° C

### 1.3 SDS al 10%

10 g de SDS

90 ml de agua destilada

\* Se disuelven cuidadosamente para no hacer espuma y se afora a 100 ml con agua destilada. Se almacena la solución a temperatura ambiente protegiéndola de la luz.

### 1.4 Solución al 10% de APS (Persulfato d amonio)

100 mg de APS

1 ml de agua destilada

#### 1.5 Solución de monómeros (acrilamida/bisacrilamida)

29.2 g de acrilamida

0.8 g bisacrilamida

100 ml de agua destilada

\* Se disuelven inicialmente la acrilamida y bisacrilamida en 60 ml de agua. Una vez disueltos perfectamente ambos reactivos, se afora a 100 ml con agua destilada

La solución preparada se almacena a 4° C en la oscuridad por un tiempo máximo de 30 días.

#### 1.6 Buffer de la muestra

3.55 ml agua destilada

1.25 ml Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)

2.5 ml de glicerol

2.0 ml SDS al 10%

0.2 ml de azul de bromofenol

\* Se añaden 50 µl/ml de β-mercaptoetanol antes de su uso para evitar evaporación de la muestra.

La solución se debe guardar a temperatura ambiente pues cristaliza a 4° C

La muestra a analizar debe diluirse en buffer de muestra, por lo menos 1:2

### 1.7 Buffer de corrimiento 10x

30.3 g de Tris base

144 g de glicina

10 g de SDS

\* Se disuelve todo en agua destilada c.b.p. 1,000 ml. No se ajusta el pH ni con ácido ni con base. Se almacena a 4° C. Si precipita se debe atemperar a temperatura ambiente.

Buffer de corrimiento 1x

50 ml de buffer de corrimiento 10x

450 ml de agua destilada

### 1.8 Buffer de lisis

25 mM Hepes (pH 7.5)

0.1% Triton X-100

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

150 mM NaCl

## 2. Otros reactivos

2.0 Formol al 10% bufferado para fijación de muestras para histología:

100 ml formol (al 38-40%)

900 ml agua destilada

5.2 gr. fosfato monosódico dihidratado

6.5 gr. Fosfato disódico anhidrido

### 3.0 Tinciones

Las tinciones utilizadas para los geles fueron:

#### 3.1 Tinción de azul de Coomassie

##### Solución de tinción

2.5 g Azul de Coomassie

450 ml metanol

100 ml ácido acético glacial

Agua c.b.p. a 1 l con agua destilada

\* Esta solución se puede recuperar y reusar nuevamente si se filtra y se mezcla con la solución de Coomassie

##### Solución desteñidora para Coomassie

25 ml agua destilada (50%)

20 ml metanol (40%)

5 ml de ácido acético (10%)

#### 3.2 Tinción de plata

##### Fijación

25 ml de metanol

6 ml de ácido acético

25 µl de formaldehido al 37%

Agua destilada c.b.p 50 ml

Lavado (metanol al 50%)

50 ml de metanol

Agua c.b.p. 100 ml

Oxidación

0.02 g de tiosulfito de sódio

Água destilada c.b.p 100 ml

Impregnación

0.2 g de nitrato de plata

0.075 ml de formaldehido al 37%

Agua destilada c.b.p. 100 ml

Desarrollo

6 g de carbonato de sódio

0.4 mg de tiosulfato de sódio

0.05 ml de formaldehdo al 37%

Água destilada c.b.p. 100 ml

4.0. Transferencia de antígenos.

La transferencia se hizo del gel a membranas de nitrocelulosa

#### 4.1 Buffer de transferencia

200 ml de metanol

3.03 g Tris

14.4 g glicina

Agua destilada c.b.p. 1 litro

- Se disuelve todo en 800 ml de agua destilada, se ajusta el pH y se añade el metanol y se afora a 1,000 ml.

Los siguientes buffers se preparan según el manual técnico para el kitt comercial CDP-Star:

#### 4.2 TBS 10x (pH 7.6)

24.2 g de Tris base 0.2 M

80 g de NaCl 1.3 M

1,000 ml agua destilada

- \* Se disuelve el Tris y el NaCl en 800 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.6 con HCl y se afora con agua destilada a 1 litro.

#### 4.3 Buffer de bloqueo

3 ml de TBS 10x

0.06 g de nitroblock-I (caseína) 0.2%

30 µl de Tween-20 0.1%

27 ml de agua destilada

\* Se colocan 3 ml de TBS 10x en 27 ml de agua destilada en platina caliente y se agrega el nitroblock-I sin dejar hervir. Se agita hasta disolverlo y se deja enfriar por completo. Una vez frío, se agraga el Tween-20.

#### 4.4 Buffer de lavado

10 ml de TBS 10x

100 ml agua destilada

100 µl Tween-10

#### 4.5 Buffer de ensayo

1 ml Assay Buffer 10x (200 mM Tris buffer 9.8 + 10 mM MgCl<sub>2</sub>)

9 ml agua destilada

#### 4.6 Solución sustrato

3 ml CDP-Star

150 µl enhancer (Nitroblock-II) o potenciador

#### 5.0 Colocación de las muestras en los geles

##### 5.1 Antígenos e IgY de huevo y sérica

Para la electroforesis, se sacaron los geles del refrigerador y se atemperaron. Se les retiró el peine y se procedió a lavar bien los pozos con agua destilada

mediante una micropipeta. Las muestras “p” y pellet “real” para el gel al 10% con 1.5 mm de separador y de IgY de huevo y sérica para el gel al 10% con 1.0 mm de separador se resuspendieron con buffer de muestra y se inactivaron a 95° C por 4 minutos. Posteriormente fueron depositadas en cada pozo del gel con una jeringa Hamilton, teniendo cuidado de colocar también un marcador de peso molecular conocido como referencia, en éste caso se utilizó el “page ruler prestained proteína ladder” de laboratorios Fermentas, con rango de 170 a 10 KDa, así como sueros de aves positivas, negativas a *Eimeria tenella* verificados mediante pruebas de microneutralización en placa como controles positivos. Para los geles de IgY, se colocaron también muestras de IgY comercial de laboratorios Sigma, con un 95% de pureza, así como IgG<sub>1</sub> de origen humano y bovino, amablemente donados por los Dres. Judith González Christen y Sergio Rodríguez Camarillo respectivamente. Los pozos en donde no se colocaron muestra fueron llenados con buffer de muestra también, con objeto de lograr un corrimiento uniforme. La cantidad máxima aproximada a depositar por pozo fué de 66 µl para geles de 10 pozos con 1.5 mm de separador y de 44 µl para geles de 10 pozos con 1.0 mm de separador.

6.0 Una vez colocadas las muestras en el gel, estos se pusieron en la cámara de electroforesis colocando el ánodo y el cátodo de acuerdo al color correspondiente marcado en la tapa de la cámara de Bio-Rad (rojo o negro).

Se llenó la cámara con buffer de corrimiento 1x y se procedió al corrimiento electroforético por aproximadamente 1 hora a 1 ½ a 110 voltios, hasta que la línea de corrida estaba a unos 5 mm del borde inferior del cristal del gel.

7.0 Paso siguiente, se colocó un gel para tinción con Coomassie o plata, y el otro para transferencia electroforética.

### **Protocolo para la tinción de geles con Coomassie**

7.1 Para teñir el gel con Coomassie:

- Una vez terminada la corrida electroforética, se corta cuidadosamente el gel concentrador con los pozos, dejando únicamente el gel de corrimiento. Esto puede hacerse con un bisturí o con la espátula de plástico propia del equipo Bio-Rad.
- Se procede a dejar el gel en un recipiente de plástico con la tinción de Coomassie, (50 ml) toda la noche a temperatura ambiente moviendo constantemente el gel.
- Al día siguiente, se sumerge en 50 ml de solución desteñidora, cambiándola frecuentemente hasta obtener un gel prácticamente transparente, solo con bandas azules coloreadas.

- La tinción de Coomassie puede reutilizarse, así como la solución desteñida, ésta última filtrándose con un embudo con papel filtro con carbón activado con objeto de detener en él, el colorante.

## **Protocolo para la tinción de geles con plata**

### 7.2 Para teñir el gel con plata:

Esta es un método mucho más sensible que detecta cantidades menores de proteína en las muestras.

- Una vez terminada la corrida electroforética, se procede a retirar el gel concentrador con los pozos dosificadores. Esto mediante un bisturí o con la espátula integrada en el equipo de electroforesis de Bio-Rad.
- Se sumerge la muestra en un recipiente de plástico perfectamente limpio y enjuagado con agua destilada con solución fijadora por 1 hora si el gel es de 1.5 mm de grosor o media hora si es más delgado.
- Transcurrido el tiempo de fijación, se lava la muestra con agua destilada, realizando por lo menos dos lavados de 5 minutos cada uno o más,
- Posteriormente con metanol al 50% (solución de lavado), también por lo menos 2 a 3 lavados de 10 a 20 minutos según el grosor del gel (a mayor grosor, mayor número de lavados y mayor cantidad de tiempo requerido para los mismos).
- Se repite el lavado con agua destilada, pero esta vez tres lavados cortos de 20 segundos.

- Se oxida la muestra incluyéndola en un recipiente perfectamente limpio, con tiosulfato de sodio durante un minuto. Es importante la exactitud en este paso.
- Se lava perfectamente la muestra con agua destilada, realizando tres lavados de 20 segundos cada uno.
- Se impregna el gel en un recipiente con el nitrato de plata, por 15 minutos en la obscuridad.
- Transcurrido éste tiempo, se lava el gel dos veces con agua destilada por 20 segundos.
- El desarrollo se logra sumergiendo el gel en solución con carbonato de sodio, lo suficiente para que se observen bandas de color amarillo-café y el gel se tiña ligeramente del mismo color.
- Se lava inmediatamente con agua destilada dos veces durante un minuto.
- Para detener la reacción, el gel se sumerge en solución de fijación.
- Por último, el gel se lava con agua destilada.
- Si se desea conservar, puede sumergirse nuevamente en solución fijadora o secarse, deshidratarse y colocarse en papel celofán dulce o papel especial Bio-Rad para secar geles.

## 8.0 Transferencia

8.1 Terminado el corrimiento electroforético, se corta el gel concentrador con los pozos.

8.2 Previamente se cortan dos pedazos de papel filtro y la membrana de nitrocelulosa, del mismo tamaño que el gel a transferir y se sumergen junto con dos fibras, en buffer de transferencia de 15 minutos a una hora.

8.3 Se coloca, sobre el cassette de plástico con el lado gris hacia abajo, una fibra, un papel filtro, el gel a transferir, nuevamente el otro papel filtro, y por ultimo la segunda fibra. Con un rodillo especial para ello o con un tubo de ensaye, se cuida de quitar bien las burbujas que pudieran quedar atrapadas entre el papel filtro, el gel y la membrana, pues pueden interferir con la transferencia. Se cierra el cassette con la mica blanca hacia arriba.

8.4 Se coloca el cassette en el soporte para la cámara de transferencia Bio-Rad, cuidando que el extremo gris quede en la parte posterior, coincidiendo con la parte negra de la cámara, y la parte blanca hacia el frente, ya que la transferencia se realizará de la parte de atrás (gel), hacia la parte de adelante (a membrana).

8.5 Se coloca el recipiente con refrigerante en la cámara de transferencia para evitar que la temperatura se eleve demasiado, y se rellena en su totalidad con el buffer de transferencia. La transferencia debe llevarse a 4° C.

8.6 Se coloca la tapa cuidando que el ánodo y el cátodo coincidan y se comienza la transferencia por una hora a 100 voltios y 350 miliamperes

## 9.0 Revelado

9.1 En cuanto se termina la transferencia, se enjuaga la membrana de nitrocelulosa con TBS

9.2 Se coloca la membrana en un recipiente con solución de bloqueo, por lo menos 10 ml por membrana durante 1 hora a temperatura ambiente.

9.3 Transcurrido éste tiempo, se retira de la solución de bloqueo y se incuba una hora con el anticuerpo primario previamente diluido en buffer de bloqueo (de 5 a 10 ml por membrana)

9.4 Se saca de la solución de anticuerpo primario y se lava perfectamente con solución de lavado por 5 minutos, repitiendo por lo menos una vez más la operación (20 ml para los lavados).

9.5 Se diluye el segundo anticuerpo o conjugado en buffer de bloqueo y se incuba por una hora más a temperatura ambiente.

9.6 Nuevamente se lava la membrana 3 veces por 5 minutos con buffer de lavado.

9.7 Se coloca la membrana en un recipiente conteniendo una dilución de buffer de ensayo, el cual consiste en 200 mM Tris pH 9.8 y  $MgCl_2$  como buffer para la

enzima fosfatasa alcalina conjugada al segundo anticuerpo. Los iones de Magnesio sirven como activadores de la actividad de la fosfatasa. Se lava en éste buffer 2 veces por 2 minutos.

9.8 Se escurre y seca ligeramente la membrana con una toallita de papel, cuidando que no se seque demasiado y se coloca en un recipiente con 3ml de solución sustrato consistente en 4 nitrofenilfosfato y 150µl de potenciador. Se incuba por 5 minutos

9.9 Se escurre el exceso de líquido y se procede a leer en la campana de Biorad, utilizando el programa Quality-one, con filtro para quimioluminiscencia con tiempos de exposición de entre 5 y 30 minutos.