

7
24



**INMUNOPROFILAXIS CONTRA INFECCIONES POR
Eimeria tenella y Salmonella enteritidis MEDIANTE EL
USO DE LINFOCINAS**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México

Para la obtención del título de:
Médico Veterinario Zootecnista

P O R

JULIO CESAR ALFARO CAMACHO

ASESORES:

- MVZ. MC. PhD GUILLERMO TELLEZ ISAIAS.
- MVZ. MC GARY GARCIA ESPINOZA.
- MVZ. MC ROSA ANA WONG GONZALEZ.
- DVM. PhD MICHAEL HENRRY KOGUT.

MEXICO, D. F.

1997



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"HUELLAS EN LA ARENA - ESTOY SIEMPRE CONTIGO"

Una noche tuve un sueño. Soñé que caminaba a lo largo de la playa con el Señor y, a través del firmamento aparecieron como destellos escenas de mi vida. En cada escena, notaba dos pares de pisadas en la arena. Unas eran mías y las otras eran del Señor. Cuando la última escena de mi vida apareció ante mí, miré hacia atrás para ver las pisadas y, para mi sorpresa, noté que varias veces, a lo largo del camino de mi vida, sólo había un par de huellas. Y noté también que esto ocurría en los momentos más difíciles y tristes de mi vida. Pregunté al Señor acerca de esto: " Señor, ¿Tú dijiste que una vez que hubiera decidido seguirte, Tú caminarías a mi lado durante todo el camino. Pero he notado que, durante los momentos más aciagos de mi vida, solamente hay un par de pisadas en la arena. Yo no comprendo por qué te fuiste de mi lado cuando más te necesitaba".

El Señor contestó:

"Mi amado hijo, Yo nunca te abandoné durante tu época de prueba y dolor. Cuando tu veías únicamente un par de huellas, era porque Yo te llevaba cargando.

Ahora, ¿Me necesitas? Estoy aquí contigo. No puedes verme, sin embargo Soy la luz que te permite ver. No puedes oírme, sin embargo hablo a través de tu voz. No puedes sentirme, sin embargo soy el poder que trabaja en tus manos.

Estoy trabajando en ti, aunque desconozcas Mis senderos. Estoy trabajando, aunque no reconozcas Mis obras.

No Soy una visión o un sueño extraño. No Soy un misterio.

Sólo en el silencio absoluto, más allá del "yo" que aparentas ser, puedes conocerme, y entonces sólo como un sentimiento y como fe.

Sin embargo, Estoy aquí contigo. Sin embargo, te oigo,

Sin embargo, te contesto.

Cuando Me necesitas, estoy contigo

Aunque Me niegues, estoy contigo.

En los momentos en que más solo crees encontrarte, Yo estoy contigo.

Aún en tus temores, estoy contigo.

Aún en tu dolor, estoy contigo

Estoy contigo cuando oras y cuando no oras.

Estoy en ti, y tu estás en Mí.

Sólo en tu mente puedes sentirte separado de Mí, pues sólo en tu mente están las brumas de "lo tuyo" y "lo mío". Sin embargo tan sólo con tu mente puedes conocerme y sentirme.

Vacía tu corazón de temores ignorantes.

Cuando quites el "yo" de en medio, estoy contigo.

De ti mismo no puedes hacer nada, pero Yo todo lo puedo.

Yo estoy en todo.

Aunque no puedas ver el bien, el bien está allí, pues Yo estoy allí.

Estoy allí porque tengo que estarlo, porque Yo Soy.

Sólo en Mí tiene el mundo significado; sólo de Mí toma el mundo forma; sólo en Mí el mundo sigue adelante.

Soy la ley en la cual descansa el movimiento de las estrellas y el crecimiento de toda célula viva.

Soy el amor que es el cumplimiento de la ley. Soy seguridad. Soy paz. Soy unificación. Soy la ley por la cual vives. Soy el amor en que puedes confiar. Soy tu seguridad. Soy tu paz. Soy uno contigo. Yo Soy.

Aunque falles en encontrarme, Yo nunca dejo de encontrarte. Aunque tu fe en Mí es insegura, Mí fe en ti nunca flaquea.

Porque te conozco, porque te amo.

Mí bien amado, estoy aquí contigo. "

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS.

A lo más grande y sagrado que existe para mí en la vida, único amor en que puedo confiar, mi paz y seguridad: para Ti, *SEÑOR, DIOS MÍO*, por Ti, sólo por Ti.

A *MIS PADRES* Margarito Alfaro Flores y Concepción Camacho de Alfaro, por abrigar mi cuerpo y mi alma con amor y ternura, por hacerme inmensamente feliz cuando están a mi lado; porque me han amado siempre a pesar del sacrificio que les represento, dos personas que Dios me ha dado como mayor bendición en mi vida, y que para mí son lo más sagrado en este mundo. Gracias por no conducirme por el camino cómodo y fácil. Los amo, padres, ustedes son mi mayor y única motivación, se merecen mucho más que esto que ahora les ofrezco.

A *MIS HERMANOS* Mago, Martha, Lupe, Cande y Elenita por crear un ambiente de felicidad a nuestro alrededor, por enseñarme a enfrentar los problemas de la vida, por enseñarme a jugar y a poner el corazón en el trabajo, por aceptarme como soy y soportar mis "berrinches"; por pensar en mi bienestar, compartir mis problemas y satisfacciones desde que éramos niños y por ser ejemplo vivo de nobleza, sencillez y lucha; soy sólo leve reflejo de ustedes. Los quiero muchísimo, me siento más que orgulloso de cada uno de ustedes.

A mis queridos *SOBRINOS*: Laura, Belem, Isabel, Lalito, Carlitos, Carla, Alfreddin y Marco Antonio, niños traviesos a los que amo por igual. Gracias por ser mis compañeritos más pequeños de juegos y por recordarme que alguna vez también fui niño. Los quiero mucho, chamacos. A Bertha, Lalo, Paty y Alfredo, personas todas admirables; mis respetos y agradecimiento para ustedes

"De entre todos los hombres, yo he recibido la mejor bendición con mi familia"

Al Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, que me está brindando la oportunidad de forjarme como profesional y especialista en producción avícola y servir de esta forma a mi país.

A Ud., *Dr. Guillermo Téllez Isaías*, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo y encaminarme hacia lo que seré en un futuro, por tenerme tanta paciencia y disponibilidad para transmitirme sus conocimientos. Gracias por apoyarme siempre que lo he necesitado. Mi ejemplo a seguir como Dr., pero sobre todo, mi amigo, eso es Usted. Muchísimas, pero muchísimas gracias.

A *Gary García Espinoza*, un gran, pero gran doctor, que más que un asesor es un amigo. Gracias por guiarme no sólo en la elaboración de ésta tesis, sino por mostrarme la panorámica de todo un mundo de investigación.

A *Rosa Ana Wong González*: gracias por todo tu apoyo y tus enseñanzas; muy importante y valiosa fue tu ayuda para mí. Este trabajo no sólo es mío, sino también tuyo. Con admiración y respeto para mi linda asesora.

A la *Dra. María Elena Rubio*: porque fue precisamente por Ud. que inicié mi gusto por la producción avícola. ¿Recuerda la deuda que tengo con Ud.? Espero corresponderle en algo con este trabajo. Gracias mil por haberse fijado en mí y haberme invitado a ingresar al Departamento.

A la *Dra. Pilar Castañeda*: por su enorme disponibilidad que siempre ha mostrado para enseñarnos. Muchas gracias por su apoyo, Dra.

A la *Dra Magdalena Escorceta*: gracias por toda tu ayuda, *Magda*, nunca lo olvidaré. Con toda la admiración y respeto que una persona como tú puede merecer.

A mis compañeros y amigos que siempre me han ayudado y por los que siento un afecto especial:

Judith Jáuregui, Felipa Galindo, Angélica Dorantes, Rosario Ramos, Laura Aviña, Eva Hernández, Eva Betford, Blanca Bautista, Daniel Marrufo, Edgar Peña, Armando AlcaJesús Cabriales, José González, Nestor Ledezma, Juan Carlos del Río, Omar, Marco Juárez, Luisa Calderón, Cecilia Cortéz y Donaji García.

A mis amigos de la Especialidad *Griselda Ponce Ponce* (admirable amiga), *Reyes Paz Codillo* y *Fernando Díaz*. Gracias por la ayuda que me han brindado, pero sobre todo, por ser muy buenos amigos. Espero que esto que estamos viviendo juntos no lo olviden jamás.

Y de manera muy, pero muy especial a una linda niña, toda dulzura, temura y alegría con la que he vivido de los momentos más felices en mi vida. Me refiero a ti, *Lilia Castellanos Novoa*, amiga de toda la vida. Gracias por tu amistad leal, sincera y desinteresada. Gracias por tu afecto y comprensión. Gracias por responder siempre que te he necesitado. Te dedico esta tesis, querida amiga, ¡AMIGA DEL ALMA!

;;MUCHAS GRACIAS!!

JULIO CESAR ALZARÓ CATALANOS

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS.....	III
TABLA DE CONTENIDO.....	VI
INDICE DE CUADROS.....	VII
RESUMEN.....	I
Capítulo I. Revisión bibliográfica	
Coccidiosis aviar.....	3
Salmonelosis aviar.....	6
Las citocinas y sus interrelaciones.....	10
Capítulo II. Introducción.....	14
Capítulo III. Evaluación de la protección inespecífica conferida por linfocinas obtenidas de aves inmunizadas contra <i>Salmonella enteritidis</i> ante un desafío con <i>Eimeria tenella</i> en pollos de engorda.	
Introducción.....	17
Material y métodos.....	18
Resultados.....	22
Discusión.....	22
Capítulo IV. Evaluación de la protección inespecífica conferida por linfocinas obtenidas de aves inmunizadas contra <i>Eimeria tenella</i> ante un desafío con <i>Salmonella enteritidis</i> en pollos de engorda.	
Introducción.....	28
Material y métodos.....	30
Resultados.....	32
Discusión.....	33
Capítulo V. Evaluación de la protección inespecífica conferida por linfocinas obtenidas de aves inmunizadas contra <i>Eimeria tenella</i> o <i>Salmonella enteritidis</i> ante desafíos por <i>Eimeria tenella</i> en pollos de engorda previamente inmunizados.	
Introducción.....	39
Material y métodos.....	41
Resultados.....	44
Discusión.....	45
Capítulo VI. Conclusiones.....	55
Literatura citada.....	56

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Evaluación del efecto profiláctico del SE-ILK ante un desafío por <i>Eimeria tenella</i> mediante la severidad de lesiones cecales microscópicas en pollos de 23 días de edad.....	25
Cuadro 2. Evaluación del efecto profiláctico del SE-ILK ante un desafío por <i>Eimeria tenella</i> mediante la severidad de lesiones cecales macroscópicas en pollos de 23 días de edad.....	26
Cuadro 3. Evaluación del efecto profiláctico del SE-ILK ante un desafío por <i>Eimeria tenella</i> mediante el conteo de ooquistes cecales en pollos de 23 días de edad.....	27
Cuadro 4. Evaluación del efecto profiláctico del ET-ILK ante un desafío con 10^5 ufc/ml de <i>Salmonella enteritidis</i> mediante la recuperación de la bacteria a partir de cultivo bacteriológico.....	38
Cuadro 5. Evaluación del efecto profiláctico del ET-ILK y SE-ILK ante un desafío por <i>Eimeria tenella</i> mediante la severidad de lesiones cecales macroscópicas en pollos de 21 días de edad.....	52
Cuadro 6. Evaluación del efecto profiláctico del ET-ILK y SE-ILK ante un desafío por <i>Eimeria tenella</i> mediante la severidad de lesiones cecales macroscópicas en pollos de 21 días de edad.....	53
Cuadro 7. Evaluación del efecto profiláctico del ET-ILK y SE-ILK ante un desafío por <i>Eimeria tenella</i> mediante la ganancia diaria de peso y peso final en pollos de 21 días de edad.....	54

RESUMEN

ALFARO CAMACHO JULIO CÉSAR. INMUNOPROFILAXIS CONTRA INFECCIONES POR *Eimeria tenella* y *Salmonella enteritidis* MEDIANTE EL USO DE LINFOCINAS. (Bajo la asesoría de: MVZ, MC, PhD Guillermo Téllez Isaias; MVZ, MC, Gary García Espinoza; MVZ, MC, Rosa Ana Wong González y DVM, PhD Michael H. Kogut).

Se realizaron tres investigaciones independientes para evaluar la protección inespecífica conferida por las linfocinas procedentes de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* (SE-ILK) o *Eimeria tenella* (ET-ILK) en pollos de engorda infectados experimentalmente con *E. tenella* y *S. enteritidis*, respectivamente. Estudio 1: Se trataron profilácticamente 45 pollos de engorda de 2 semanas de edad con un producto soluble de linfocitos T contra *S. enteritidis*, estimulados con Concanavalina-A (SE-ILK), para investigar los efectos profilácticos sobre el grado de lesión cecal y número de ooquistes en heces, causados por *E. tenella*. Los pollos fueron asignados de manera aleatoria dentro de tres grupos: a) Grupo experimental: las aves fueron inyectadas intraperitonealmente a los 14 días de edad con 0.5 ml/ave de las SE-ILK y posteriormente fueron desafiadas oralmente con 10,000 ooquistes esporulados de *E. tenella* 2 días posteriores a la administración de SE-ILK; b) Grupo positivo y c) Grupo negativo. Las aves de todos los grupos fueron sacrificadas a los 7 días post-desafío, para la evaluación de severidad de lesiones cecales macroscópicas, microscópicas y número de ooquistes en heces. Los resultados del tratamiento profiláctico con SE-ILK mostraron una disminución en el grado de lesión de 3+ (Grupo positivo) a 2+ (Grupo experimental), así como una disminución significativa en la reducción del número de ooquistes en heces comparado con el grupo positivo ($P < 0.05$). Estudio 2: Se investigó el efecto del tratamiento profiláctico de 40 pollos de engorda con los productos solubles de linfocitos T estimulados con Concanavalina-A procedentes de aves infectadas por *E. tenella* (ET-ILK), sobre la invasión de los órganos por *S. enteritidis*. Al primer día de edad, los pollos del grupo experimental fueron inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml/ave de ET-ILK. Treinta minutos después de la inyección de linfocinas, las aves fueron desafiadas con 10^8 ufc/ml de *S. enteritidis*, vía oral. Todas las aves fueron sacrificadas a las 24 horas post-desafío y se realizó cultivo bacteriológico a partir de hígado y bazo. El tratamiento profiláctico de los pollos con las ET-ILK redujo significativamente ($P < 0.005$ y $P < 0.001$) la invasión de órganos por *S. enteritidis*. Estudio 3: Se evaluó el efecto inmunoprolifáctico de los sobrenadantes obtenidos de linfocitos T de aves inmunizadas con *E. tenella* (ET-ILK) o *S. enteritidis* (SE-ILK) y estimulados con Concanavalina-A, en la ganancia de peso y disminución de lesiones cecales a los 21 días contra una infección por *E. tenella* a los 14 días de edad. Pollos de engorda de un día de edad fueron aleatoriamente divididos en 5 grupos de los cuales, 2 de ellos fueron inmunizados al primer día de edad con una dosis de 30,000 ooquistes esporulados/ave y simultáneamente recibieron por vía intraperitoneal: a) SE-ILK o b) ET-ILK. Un tercer grupo fue tratado únicamente con SE-ILK. Se incluyó un cuarto grupo no tratado-desafío (testigo positivo). A los 14 días post-inyección de linfocinas, todas las aves fueron desafiadas vía oral con 15,000 ooquistes esporulados de *E. tenella*. Las aves fueron pesadas 7 días post-desafío para la medición de la ganancia de peso y sacrificadas ese mismo día para la evaluación de severidad de lesiones cecales macroscópicas. Se observaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre los promedios de lesiones que presentaron los grupos primoinmunizados (3.1 y 3.4 respectivamente) con los promedios del grupo tratado sólo con SE-ILK y del grupo positivo (3.8 en ambos), mostrándose una disminución en la severidad de lesiones cecales en los grupos inmunizados y tratados con linfocinas. Sin embargo, no existieron diferencias significativas al comparar la ganancia de peso de los grupos inmunizados-tratados con linfocinas y el testigo positivo, lo cual pudo deberse a factores de estrés y manejo a los que fueron sometidos los pollos. Los resultados de estos trabajos demuestran que la administración profiláctica de linfocinas, preparadas a partir de

LT activados con Concanavalina-A y procedentes de pollos infectados con *E. Tenella* o *S. enteritidis*, inducen protección a pollos de engorda al desencadenar una reacción inmune inespecífica, ante una infección por otro o el mismo agente etiológico.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. COCCIDIOSIS AVIAR

Una de las enfermedades parasitarias más importantes en la historia de la industria avícola mundial ha sido la Coccidiosis Aviar, debido a las grandes pérdidas económicas que ha ocasionado desde hace 30 años. Es causada por un parásito protozoario del género *Eimeria* sp. que se caracteriza por ser intracelular obligado, hospedador específico, con un ciclo de vida limitado, que induce en el hospedador pérdida de peso, retraso en el crecimiento, despigmentación y mortalidad variable,^{46, 56} siendo las aves de entre 4 y 6 semanas de vida las principalmente afectadas.⁵⁷ La coccidiosis en las parvadas comerciales de pollos de engorda es el resultado de las prácticas de crianza intensivas y en confinamiento características de las operaciones avícolas actuales.¹⁴

En México, una de las especies de coccidia difundida y que se presenta en mayor porcentaje dentro de la industria avícola del pollo de engorda es *Eimeria tenella*,⁵⁷ la cual se caracteriza principalmente por causar lesiones en ciegos, además de ocasionar pérdida de peso, alta morbilidad y mortalidad entre otros signos.^{2, 56} Los ooquistes inmaduros de *E. tenella* se encuentran protegidos por una cubierta externa gruesa y consisten de una sola célula que inicia el proceso de esporulación para generar la etapa infectante aproximadamente en 48 horas. Los ooquistes infectantes contienen cuatro esporocistos, los cuales a su vez comprenden dos esporozoitos. Cuando los ooquistes son ingeridos, la pared de los mismos se rompe en la molleja y los esporozoitos se liberan de los esporocistos por la acción de la quimiotripsina y sales biliares en el intestino delgado. Los esporozoitos entran a las células epiteliales, donde comienzan su desarrollo.⁸ *E. tenella* parasita únicamente las células localizadas en el subepitelio del ciego durante la fase de esquizontes de segunda generación (etapa más patógena) los cuales, al madurar, inician la

ruptura de los enterocitos al cuarto día del período de prepatencia (PP), presentándose el máximo daño tisular con la consecuente aparición de hemorragias macroscópicas y una evidente melena; hacia el sexto día del PP se inicia la liberación de ooquistes, la cual, después del séptimo día del PP comienza a declinar.^{2, 46, 56} Aún durante la maduración de los esquizontes de primera generación, es posible observar pequeños focos de epitelio desnudo. En el cuarto día post-infección, los esquizontes están maduros y las hemorragias son aparentes. Los ciegos por lo general se encuentran agrandados y distendidos con coágulos de sangre y porciones de mucosa cecal en la luz. Entre los días 6 y 7 el centro de los ciegos presenta exudado caseoso con coágulos. La pared de los ciegos por lo general está muy engrosada debido al edema e infiltración, más tarde al tejido cicatrizante.⁸ Los daños causados además de la destrucción de tejidos, se pueden observar en efectos importantes sobre la digestión, absorción y metabolismo de los nutrientes, que a su vez se traducen en rendimientos por debajo del potencial esperado en el pollo de engorda.³⁰ Las aves recién nacidas, algunas veces no son del todo susceptibles a la infección debido a la insuficiencia de quimiotripsina y sales biliares para ocasionar la excitación. Los brotes se observan con poca frecuencia en parvadas de aves menores de 4 semanas de edad.⁸ Una característica importante de *E. tenella* es el ser poco inmunogénica, lo que la hace un constante problema en las granjas, requiriendo un mayor número de exposiciones a ooquistes, para inducir una respuesta eficaz en el pollo.^{2, 43, 79}

Control de la Coccidiosis.

La presentación de coccidiosis en las granjas ha traído consigo la subsecuente adecuación de medidas para su prevención y control, como la elaboración de vacunas y fármacos de síntesis química y fermentación biológica.^{46, 47}

Sin embargo, los anticoccidianos de ambos grupos presentan limitantes debido a que no existe un fármaco que elimine a todas las especies existentes en el pollo y su aplicación ha provocado el desarrollo de resistencia por parte de las coccidias.^{46, 47} La aparición de nuevas drogas anticoccidianas en un futuro próximo se observa muy poco probable debido

a la enorme inversión que se requiere para desarrollarlas y a la desmotivación que existe en las empresas debido a la saturación que existe en el mercado de productos genéricos de mala calidad.⁵

Por otro lado, las vacunas vivas son utilizadas principalmente en gallinas reproductoras y pollas de remplazo para postura; sin embargo, las vacunas tienen un uso limitado en el pollo de engorda por presentar varias cepas de coccidias, lo cual puede favorecer la introducción de nuevas cepas a la granja, aumentan el riesgo de crear un brote clínico y, dependiendo del tipo de vacuna, las aves pueden quedar susceptibles contra una especie de *Eimeria*.^{54, 55} Así mismo, las vacunas contienen coccidias vivas cuya patogenicidad no ha sido eliminada por completo. Es importante tener en cuenta que las coccidias más patógenas son las menos inmunogénicas, por lo que casi siempre se requiere de más de una exposición para generar un grado de inmunidad importante. En el caso de pollo de engorda, el objetivo de la vacunación debería ser la obtención del más elevado nivel de parámetros productivos; sin embargo, ésta produce un efecto negativo en el crecimiento del pollo a la cuarta semana, lo cual puede generar problemas de desuniformidad.⁵ Otra limitante que presentan las vacunas es su aplicación en la parvada, la cual depende de las características ambientales de la caseta y de la presencia de enfermedades inmunosupresoras entre las aves.^{5, 54, 55}

Mecanismo de inmunidad contra Coccidiosis Aviar.

La respuesta celular juega un papel muy importante en el control de enfermedades intracelulares por protozoarios, donde los linfocitos T (LT) son fundamentales para el control de la multiplicación del parásito.⁷² En el caso de la Coccidiosis Aviar está involucrado un complejo conjunto de poblaciones celulares y citocinas en el desarrollo de una inmunidad protectora. Los LT cooperadores (TCD4+) parecen ser la primera población celular involucrada durante la respuesta inmune, los cuales promueven la diferenciación de linfocitos B (LB) a células plasmáticas productoras de anticuerpos, así como la actividad supresora y citotóxica de otros LT, el incremento de actividad de las

células asesinas (Natural Killer, NK), la activación de macrófagos y el desarrollo de mastocitos.⁴⁰ Los LT citotóxicos (TCD8+) pueden ser activados por las células TCD4+, desarrollando funciones supresoras y citotóxicas; de este modo el huésped infectado por coccidias puede incrementar una respuesta a la infección parasitaria.⁴⁰

Otro tipo de población celular que interviene en los mecanismos de inmunidad son los macrófagos, los cuales participan en la iniciación de una respuesta inmune específica por el procesamiento y presentación del antígeno a los LT, los cuales a su vez confieren protección contra *E. tenella* por la secreción de linfocinas. Los macrófagos también pueden secretar componentes citotóxicos, así como citocinas que estimulen a otras células inmunes. Estos macrófagos juegan un papel importante en la inmunidad pero requieren de activación previa por exposición a citocinas o al parásito.⁴⁰

2. SALMONELOSIS AVIAR.

La Salmonelosis Aviar es otra de las enfermedades que se presenta con frecuencia en la avicultura comercial de México. Las Infecciones Paratifoideas producidas por *Salmonella enteritidis* en aves se consideran como una fuente potencial de contaminación de alimentos para el hombre; su control ha adquirido gran importancia para la industria de la avicultura mundial debido a los serios problemas de salud pública que se han registrado en los últimos años, por el incremento significativo de gastroenteritis en humanos ocasionada por el consumo de huevo y carne provenientes de parvadas comerciales infectadas.^{15, 37, 69} Con excepción de los países escandinavos y algunas áreas de operación localizadas, las Infecciones Paratifoideas son comunes en aves productoras de carne o huevo. Las infecciones humanas con *S. enteritidis* se han registrado como el mayor problema en varios países europeos, ocasionando del 50 al 87% del total de casos reportados por infecciones gastroentéricas.²⁰ En México, los casos de salmonelosis registrados en humanos durante 1987 ascendieron a 68,423 y para 1991 se incrementó a 105,104.⁸⁶ Quizá el principal problema en la industria avícola es que *S. enteritidis* se asocia a una contaminación del

huevo debido a la transmisión vertical, trayendo como consecuencia grandes pérdidas económicas a este sector.^{19, 80}

El género *Salmonella sp* pertenece al grupo de bacterias Gram-negativas incluídas dentro de la familia *Enterobacteriaceae* y se caracterizan por ser microorganismos intracelulares facultativos. Este género consta de más de 2,200 serotipos definidos antigénicamente, de los cuales, los de interés en la industria avícola se pueden dividir en dos grupos, el de las salmonelas inmóviles representado por *S. gallinarum*, responsable de la Tifoidea Aviar, y *Salmonella pullorum* causante de Pulorosis. Al segundo grupo pertenecen las salmonelas móviles, como *Salmonella enteritidis* y *Salmonella thyphymurium*, las cuales producen Infecciones Paratifoideas.⁶⁵

La infección por *Salmonella* en el ave ocurre en el intestino grueso, probablemente debido a la poca motilidad, pH alcalino y falta de enzimas digestivas.¹² La adherencia y subsecuente invasión de *Salmonella* en la mucosa intestinal constituyen eventos clave en las infecciones ocasionadas por esta bacteria intracelular.⁴ El mecanismo por el cual la bacteria penetra la mucosa epitelial todavía no está bien definido; sin embargo, hay evidencias de que la bacteria y la célula hospedadora poseen factores de importancia en el proceso de penetración bacteriana.⁶ Algunos serotipos de *Salmonella*, como *S. gallinarum* o *S. enteritidis* tienen la capacidad de penetrar el tracto digestivo de las aves y, a través del torrente sanguíneo, invadir los órganos internos produciendo alteraciones patológicas. La bacteria puede ser aislada a partir de órganos internos, siendo el hígado y bazo los órganos de elección para el cultivo.²¹

Las Infecciones Paratifoideas ocasionan grandes pérdidas por muertes en todas las especies de aves jóvenes (menores de 2 semanas), con las más altas pérdidas entre el día 6 y 10; la infección rara vez provoca mortalidad en aves de más de un mes de edad. Los signos incluyen un estado progresivo de somnolencia, evidente por una tendencia a quedarse en una posición con la cabeza hacia abajo, ojos cerrados, alas caídas y plumas erizadas; anorexia marcada y aumento en la ingestión de agua; diarrea acuosa y profusa con

pastocidad en la cloaca y tendencia de las aves a amontonarse cerca de la fuente de calor. Es frecuente encontrar ceguera y conjuntivitis en pollitos. Las aves adultas en general no presentan signos de infección. Las lesiones que se observan más a menudo son emaciación, hígado congestionado y bazo con líneas hemorrágicas o focos necróticos puntados, riñones congestionados y pericarditis. Sin embargo, las lesiones en pulmones y corazón no son tan frecuentes como en la Pulorosis.⁸

Control de la Salmonelosis Aviar.

A pesar de los programas que se han adecuado en todo el mundo de erradicación, bioseguridad, vacunación, desinfección y medicación contra este microorganismo, esta enfermedad continúa atacando la industria avícola representando un gran impacto sanitario y económico a esta actividad pecuaria. Por tal motivo, es necesario que esta industria cuente con métodos eficaces permitiendo la prevención de la enfermedad.³⁷

La vacunación tradicional contra *Salmonella* induce un bajo porcentaje de protección al exponerse las aves vacunadas a cepas virulentas de campo además de generar un efecto adverso en la subsecuente producción de huevo. A pesar de la eficiencia de una vacuna, se requiere de 7 a 10 días para la estimulación de la respuesta inmune adquirida e inducir protección.^{28, 64}

El uso de probióticos, carbohidratos, ácidos orgánicos y hasta de huevo pulverizado conteniendo anticuerpos en el alimento, puede ayudar en la reducción de riesgo en los pollitos. Sin embargo, esto no previene la infección.⁶⁴ Por otra parte, el uso de antibióticos en forma preventiva o en tratamiento contra infecciones por *Salmonella* presenta varias desventajas como incremento en la susceptibilidad del hospedador, en la virulencia y resistencia del microorganismo.²⁹

Respuesta inmune e inflamatoria contra *Salmonella* sp.

En el control de enfermedades por microorganismos intracelulares, como es el caso de la Salmonelosis Aviar, la inmunidad específica por LT juega un papel importante, ya que éstos secretan citocinas, las cuales participan en múltiples eventos de la respuesta inmune, como son: proliferación celular (expansión clonal de LT y LB), diferenciación de LB, activación de macrófagos y procesos de inflamación, sólo por mencionar algunas actividades.^{1, 49, 50, 68}

El hecho de que un microorganismo sea intracelular implica una coexistencia entre la bacteria y la célula hospedadora, ocasionando daño en ésta última. Esta característica provoca consecuencias directas en el tipo de respuesta inmune a desarrollarse, ya que su localización dentro de la célula protege a la bacteria de la inmunidad humoral.⁷¹ La respuesta inmune protectora contra bacterias intracelulares como *Salmonella*, es por lo tanto una respuesta mediada por células. Esta inmunidad celular consiste en diferentes reacciones: primero, la fagocitosis y destrucción de los microorganismos por los fagocitos mononucleares activados por citocinas que han sido liberadas principalmente por LT y otras células, como por ejemplo células NK. El Interferón-gamma (INF γ) ocupa un sitio de suma importancia en la activación de monocitos y macrófagos, ya que aumenta la fagocitosis. Posteriormente, los antígenos proteicos de la *Salmonella* son procesados y presentados por los macrófagos a los linfocitos TCD8+ y TCD4+ ; son los linfocitos TCD4+ los que responden liberando Interleucinas (IL), las cuales modulan la respuesta inmune. Se distinguen dos tipos de linfocitos TCD4+; los Th1, responsables de la secreción de IL-2 e INF γ , entre otras linfocinas; y los Th2, que secretan IL-4, IL-5 e IL-10, las cuales son linfocinas que participan en la respuesta inmune humoral. La respuesta de Th1 se traduce en una respuesta inmune celular, promoviendo la activación de macrófagos y por lo tanto la eliminación de *Salmonella*.^{1, 68, 72}

La invasión de la mucosa intestinal por *S. enteritidis* inicia el reclutamiento de grandes cantidades de células polimorfonucleares (PMN) en el sitio de la inflamación de la lámina

propia.^{10, 87} El movimiento de las células PMN de la sangre periférica hacia el tejido dañado es un aspecto fundamental de la inflamación aguda y es también característica de la fase aguda de la infección por bacterias intracelulares facultativas. De hecho, esta es la fase inicial previa al arribo de los macrófagos en grandes cantidades.^{16, 87} La función de estos PMN es probablemente eliminar con rapidéz a los agentes invasores a fin de prevenir que continúe la infección.²⁶ La migración de las células inflamatorias al sitio de infección juega un papel importante en el incremento significativo de la protección. Los heterófilos aviares constituyen el primer mecanismo de defensa contra las bacterias, las cuales son fagocitadas y pueden ser lisadas por el pH ácido y por las enzimas proteolíticas de los lisosomas.³³ Así mismo, los mecanismos lisantes dependientes del oxígeno son importantes para matar a las bacterias.⁶² Sin embargo, los LT son a menudo necesarios para la completa expresión de la inmunidad mediada por fagocitos, por una serie de eventos celulares controlados por una variedad de polipéptidos mediadores o citocinas, que sirven de instrumento tanto para la iniciación como para la resolución de una respuesta inmune.²² La presencia de una red funcional de citocinas durante la expresión de esta resistencia es fundamental para la iniciación y propagación de la respuesta inflamatoria protectora.³³

3. LAS CITOCINAS Y SUS INTERRELACIONES.

Los monocitos, macrófagos, heterófilos y linfocitos son parte de los componentes celulares de la respuesta inmune en las aves. El desarrollo de una respuesta inmune efectiva implica complejas interacciones entre células hematopoyéticas, linfoides e inflamatorias. Dichas interacciones están mediadas por proteínas solubles de bajo peso molecular y/o glucoproteínas, conocidas genéricamente con el nombre de citocinas. Las citocinas son un grupo de glucoproteínas reguladoras secretadas por linfocitos, macrófagos y otras células inmunitarias y no inmunitarias involucradas en la respuesta inmune y actúan sobre células blanco que poseen receptores en la membrana, los cuales son específicos para una citocina dada. Entre sus funciones regulatorias se incluyen el control de la respuesta inmune celular y humoral, inflamación, fiebre, quimiotáxis, respuesta de fase aguda, regresión de tumores, hamatopoyésis y muchas otras.³³

Las citocinas son moléculas pleiotrópicas, lo que significa que una misma citocina puede inducir diferentes efectos biológicos cuando interacciona con receptores específicos de distintas células blanco, o en una misma célula en diferentes estados de diferenciación, tales como reconocimiento, diferenciación, proliferación y reclutamiento celular. Las citocinas también son redundantes, lo que quiere decir que varias citocinas pueden inducir el mismo fenómeno en una determinada célula siempre y cuando ésta tenga sobre su superficie los receptores específicos para interactuar con ellas. La unión de una citocina a un receptor específico de una célula blanco induce una señal dentro de la célula que da como resultado cambios en la activación de la misma y expresión de varios genes. En respuesta a estímulos particulares, las subpoblaciones individuales de células inmunes poseen la capacidad de activar genes específicos que codifican para citocinas, lo cual puede dar como resultado la secreción de más de estas moléculas. Es importante subrayar que las células y las poblaciones celulares varían en su expresión de receptores de citocinas individuales y, por lo tanto, difieren en su capacidad de responder a las señales de citocinas específicas.³³

In vivo, las citocinas trabajan de forma concertada y combinaciones de ellas pueden tener efectos sinérgicos en un tipo celular y antagónicos en otros, lo cual hace que la red de interacciones entre las distintas moléculas sea muy difícil de analizar. La vida media de las citocinas *in vivo* es muy corta, en promedio 30 minutos; en condiciones normales, la cantidad de citocinas que se produce es muy pequeña; así mismo, el número de receptores específicos en las células que responden es limitado (10-10'000 receptores/célula). Sin embargo, la actividad específica de las citocinas es muy elevada (106-108 unidades/mg de proteína); esto aunado a la elevada afinidad de los receptores específicos ($K_d=1011$ M) sobre la superficie de las células efectoras, las transforma en poderosos mecanismos de la resistencia específica e inespecífica. Bajo condiciones normales la cantidad de citocinas producida es pequeña y con una vida media corta, lo que garantiza que sólo las células aledañas sean afectadas por estos factores. Con esto se evita la activación indiscriminada de otras células que, de ser activadas, serían responsables del daño, como se observa en algunas patologías. En la mayoría de los casos, las citocinas se han identificado por su efecto en los sistemas biológicos, lo cual ha

servido para denominar a las citocinas y ha sentado las bases para su detección y cuantificación mediante bioensayos.³³

Redes de citocinas.

La idea de las redes de citocinas se ha desarrollado a través de investigaciones sobre las interacciones que existen entre las poblaciones de células inmunes y no inmunes. Evidencias cada vez más abundantes, han demostrado la complejidad de esta cascada de citocinas. Sin embargo, estas interrelaciones funcionales entre citocinas se pueden describir, básicamente, como la respuesta directa de una población de células (células primarias) a estímulos específicos mediante la producción de una citocina particular para ejercer efectos distintos sobre otra población de células (células blanco, o células objetivo). Las células blanco responden mediante la producción de citocinas que sirven ya sea como señales de retroalimentación para las células primarias, o bien para iniciar una cascada de eventos, afectando a una serie nueva y distinta de células blanco.³³

El papel funcional de las citocinas y de sus interrelaciones funcionales, es crítico para la defensa del huésped y se puede clasificar en tres categorías de la respuesta inmune del huésped: 1) *activación, crecimiento y diferenciación de linfocitos*, lo cual ocurre en respuesta al reconocimiento de un antígeno específico por los linfocitos T; 2) *hematopoyesis*, la cual estimula el crecimiento y la diferenciación de las células blastos de la médula ósea, para transformarse en leucocitos maduros; 3) *inflamación*, que está involucrada en la movilización de los leucocitos hacia los sitios de la infección o de la lesión tisular. En el pollo se sabe que ocurren estas tres categorías de la respuesta inmune, aún cuando los mecanismos operativos básicos mediadores de ellas, todavía no están claros. Se han utilizando citocinas de aves como estimulantes de una respuesta inflamatoria vigorosa en pollos jóvenes, que da como resultado la resistencia de estas aves a infecciones sistémicas por bacterias del género *Salmonella*.³³

La premisa mayor de la inflamación es el reclutamiento de las células efectoras, como son los monocitos y los leucocitos PMN, en los sitios de infección o lesión tisular. Los PMN son las células inflamatorias que predominan inicialmente en los sitios de reclutamiento para llevar a cabo la inflamación (de 4 a 12 horas), particularmente en el caso de infecciones bacterianas. La extravasación y el secuestro de células PMN en el sitio de la inflamación, dependen de una compleja serie de eventos:

1. La generación local controlada de las citocinas de la respuesta temprana, como por ejemplo el Factor de Necrosis Tumoral- α (FNT α) y IL-1, que conducen a la activación de las células endoteliales y a la expresión superficial de las moléculas de adhesión de los PMN, derivadas de las células endoteliales; como por ejemplo las selectinas E y P y la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1, por sus siglas en inglés). Estas moléculas de adhesión son receptores generados por las membranas lumbales de las células endoteliales que recubren internamente a los vasos sanguíneos.
2. Producción local de citocinas quimiotácticas para activar los PMN (como por ejemplo la IL-8).
3. En la sangre periférica, la activación de los PMN y la expresión de las moléculas de adhesión derivadas de éstos; por ejemplo: el CD11b/CD18, ligante para el ICAM-1, y la selectina-L, ligante para las selectinas E y P.
4. Adherencia de las células PMN y de las células endoteliales a través de los ligantes respectivos.
5. Diapedesis y migración de PMN a través de la barrera de células endoteliales al sitio inflamado a través de gradientes quimiotácticos en el tejido local.

Después de haber llegado al sitio inflamado, los PMN activados pueden responder a los estímulos mediante fagocitosis y muerte, y mediante la liberación de citocinas adicionales. A medida que continúa el proceso inflamatorio agudo, después de esta etapa de iniciación, la evocación de la memoria de los leucocitos se torna dinámica con la composición celular del infiltrado inflamatorio, cambiando a una población celular en la que predominan las células mononucleares.³³

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

La avicultura es una de las áreas de producción pecuaria más importantes y también de las más susceptibles a pérdidas económicas por problemas sanitarios. En este aspecto, los protozoarios del género *Eimeria sp.* son de los agentes etiológicos que mayores pérdidas ocasionan a esta industria, así como las bacterias del género *Salmonella sp.*, las cuales además representan graves problemas de salud pública.^{58, 65, 66} Actualmente, el control de *S. enteritidis* y *E. tenella* es considerado como una de las mayores prioridades en la industria avícola.⁸⁴ Por lo tanto, es necesario que la avicultura cuente con métodos aplicables para la reducción de estas infecciones.^{24, 77}

Una alternativa para solucionar los problemas que representan la coccidiosis y salmonelosis en aves explotadas comercialmente es la manipulación adecuada del sistema inmunocompetente.⁷⁷ Para ello, una opción puede ser la utilización de linfocinas (immunelymphokines, ILK), las cuales son proteínas sintetizadas por LT que actúan como mediadores solubles en la respuesta inmune específica e inespecífica.^{48, 82, 88} Una importante ventaja de las linfocinas como inmunorreguladores de la respuesta inflamatoria del hospedador por encima del tratamiento con vacunas es la rápida respuesta protectora mostrada en un período de 24 horas después de su aplicación.⁸² Se ha reportado que la administración exógena de linfocinas inicia la secreción y activación de otras citocinas, acelerando la respuesta inmune del hospedador infectado por microorganismos intracelulares.¹³ Algunos estudios han documentado la administración profiláctica experimental de citocinas derivadas de macrófagos o LT para el tratamiento de infecciones producidas por diversos microorganismos intracelulares. La terapia profiláctica con estas citocinas puede potencializar las ramificaciones específicas e inespecíficas de la respuesta inmune del huésped, inhibir el desarrollo microbiano, acelerar la respuesta protectora y reducir significativamente la severidad de las infecciones.^{22, 34, 35, 67}

Recientes investigaciones han demostrado que la administración intraperitoneal (i.p.) de linfocinas provenientes de aves inmunes a *E. tenella* (*E. tenella*-Immune-lymphokines, ET-ILK), y linfocinas provenientes de aves inmunes a *S. enteritidis* (*S. enteritidis*-Immune-lymphokines, SE-ILK), confieren protección a pollos de engorda ante desafíos homólogos.^{32, 48, 82} De la misma forma, la aplicación del sobrenadante de LT, provenientes de aves inmunizadas contra *Salmonella gallinarum* (*S. gallinarum*-Immune-lymphokines, SG-ILK), ha demostrado conferir protección ante desafíos con la misma bacteria. Al igual que estos, varios estudios más han probado el efecto protector de sobrenadantes crudos de linfocinas administrados a pollos de engorda ante desafíos homólogos.^{32, 48, 82} Sin embargo, en el caso de la administración i.p. de SE-ILK se ha visto que también puede conferir protección contra *S. gallinarum*.^{88, 89} Estudios previos realizados por Téllez y colaboradores han demostrado protección cruzada conferida por SE-ILK en infecciones causadas por *Salmonella typhimurium* y *S. gallinarum* en pollos Leghorn.⁸² Trabajos similares llevados a cabo por Ray y colaboradores también han demostrado protección cruzada conferida por SE-ILK en infecciones causadas por *S. typhimurium* en pollos Leghorn.⁷⁰

Esto sugiere que existe una protección inespecífica conferida mediante la administración de linfocinas. Así mismo, estos hallazgos indican que el mecanismo de resistencia del hospedador a *Salmonella* en aves puede ser menos dependiente de una respuesta específica hacia el antígeno, pero más eficaz al iniciar una respuesta temprana del hospedador durante la infección. Es así como se ha reportado que la protección inespecífica contra la infección por microorganismos intracelulares como *Salmonella* y *Eimeria*, está asociada con la potencialización de la respuesta inflamatoria del hospedador por las inmunolinfocinas.⁸² Esta protección se ha asociado con un incremento concomitante de leucocitos PMN en sangre periférica⁴⁹ y con un importante aumento en el grosor de la lámina propia en ciegos e intestino, en donde se observa una marcada infiltración de células inflamatorias.⁸² Sin embargo, los LT son a menudo necesarios para la completa expresión de la inmunidad mediada por fagocitos, por una serie de eventos celulares controlados por una variedad de

proteínas mediadoras o citocinas, que sirven de instrumento tanto para la iniciación como para la resolución de una respuesta inmune.³³

Existe un mecanismo inmunológico mediado por la inmunidad celular, donde la presencia de células presentadoras de antígeno establecen contacto con los LT cooperadores, por lo que producen IL-2 la cual activa y mantiene la proliferación de los LT citotóxicos. Sin embargo, existen otras linfocinas como INF γ y FNT α , entre otras, que tienen diversas funciones relacionadas con citotoxicidad y reacciones inflamatorias locales en contra de virus, parásitos y bacterias intracelulares.^{8, 38, 39, 72, 81, 83}

Resulta interesante determinar si la aplicación de sobrenadantes de linfocinas específicas para *S. enteritidis* o *E. tenella* pueden activar, desencadenar y potencializar este mecanismo inmunológico y producir una reacción inmune inespecífica ante desafíos por otros microorganismos en pollos de engorda. El principal objetivo de esta investigación fue probar la existencia de una inmunidad de tipo inespecífica desencadenada por extractos crudos de linfocinas (SE-ILK y ET-ILK), ante una infección por otro agente etiológico (*E. tenella* y *S. enteritidis*, respectivamente); así como examinar el efecto que tienen estos sobrenadantes sobre el mecanismo de la respuesta inmune al administrarlos en pollos de engorda previamente inmunizados y posteriormente desafiados con *E. tenella*, buscando de nuevo la potencialización de una respuesta inmune inespecífica, además de la formación de una respuesta inmune de memoria.

El presente trabajo consta de tres estudios distintos, los cuales, aunque independientes entre sí, están enfocados a probar la existencia de una reacción inmune inespecífica mediada por linfocinas. Los estudios han sido presentados por separado para un mejor entendimiento y mayor valor didáctico.

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN INESPECÍFICA CONFERIDA POR LINFOCINAS OBTENIDAS DE AVES INMUNIZADAS CONTRA *Salmonella* *enteritidis* ANTE UN DESAFÍO CON *Eimeria tenella* EN POLLOS DE ENGORDA.

INTRODUCCIÓN

Se ha informado que las células de bazo están implicadas en la inmunidad celular, dentro de infecciones por microorganismos intracelulares³¹ y que específicamente los LT de humano actúan contra la *Salmonella* en el hombre.³⁷ Otros estudios han demostrado el aumento de la resistencia hacia las infecciones intracelulares por *Salmonella*, al administrar un extracto crudo de células de bazo provenientes de ratones inmunes contra la tifoidea murina.³ Se han hecho investigaciones acerca del efecto profiláctico de las linfocinas contenidas en sobrenadantes obtenidos de cultivos celulares de LT provenientes de aves inmunes contra *S. enteritidis* (denominadas SE-ILK), que han disminuido la invasión a órganos por *S. enteritidis* en pollitos de un día de edad,⁴⁸ *in ovo*,⁵⁰ a los 18 días de edad⁸² y también contra desafíos por *S. gallinarum* en pollitos de un día de edad.⁸⁸

Considerando que las investigaciones aún no han mostrado evidencia de que exista o no inmunidad cruzada entre las distintas serovariedades de *Salmonella* arriba mencionadas, se cree que las linfocinas secretadas por los LT tienen actividad inespecífica, tal y como se ha descrito en mamíferos, donde se conoce que el mecanismo inmunológico mediado por las células es iniciado por las células presentadoras de antígeno a través de su complejo mayor de histocompatibilidad, que lo presentan al receptor de los linfocitos TCD4+, los cuales orientan la formación de subpoblaciones celulares de LT, con la consecuente liberación de linfocinas como la IL-2, IL-3, IL-5, INF γ y FNT α , entre otras.^{73, 83}

Estas linfocinas tienen diversas funciones relacionadas con citotoxicidad y reacciones inflamatorias locales en contra de virus, parásitos y bacterias intracelulares en los mamíferos.^{58, 73, 83} Para mostrar que las SE-ILK tienen la propiedad de conferir protección inespecífica, se decidió administrarlas a pollitos susceptibles contra *E. tenella* y posteriormente desafiados con una dosis elevada de *E. tenella*. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la protección conferida por SE-ILK al disminuir el grado de lesiones cecales macroscópicas y microscópicas, así como evaluar el número de ooquistes cecales por ave recuperados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material infectante.

Se utilizó la cepa MOR-80-QRO de *E. tenella*, donada por el Dr. Reynaldo Moreno (D.P.A.: Aves, F.M.V.Z., U.N.A.M.), la cual fue empleada en la prueba de desafío. Los ooquistes fueron cosechados, esporulados y almacenados como se describe previamente.⁴²

Así mismo, se empleó una cepa de *S. enteritidis* fagotipo 13 obtenida del National Veterinary Services Laboratory (NVSL), Ames, Iowa, seleccionada por la resistencia a Novobiocina y Ácido Nalidixico (NO-AN). Esta cepa fue utilizada para la inmunización de las aves en la obtención de SE-ILK.

Inmunización de las aves con *S. enteritidis* para la obtención de SE-ILK.

Para la obtención de las linfocinas de aves hiperinmunizadas, se utilizaron pollos de engorda Arbor Acres x Arbor Acres de 2 semanas de edad. El inóculo para la inmunización con *S. enteritidis* fue preparado con solución salina fosfatada estéril (PBS), ajustado a una concentración de 10^9 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml mediante espectrofotometría y diluido con PBS para obtener una dosis final de 10^8 ufc/ml. Las aves fueron inoculadas vía oral, aplicándose dosis iguales de refuerzo a los 7, 14, 21 y 28 días después. Diez días después de la última inmunización, las aves fueron sacrificadas para la obtención de los bazos.

Preparación de linfocinas.

Las SE-ILK fueron elaboradas a partir de los bazos de las aves inmunizadas con *S. enteritidis* por medio de la técnica de Kogut y colaboradores, descrita a continuación.

a) Preparación de la suspensión de células esplénicas.

Diez días después del proceso de inmunización, se colectaron asépticamente los bazos de las aves inmunizadas con *S. enteritidis*. Los bazos se pasaron a través de una criba del número 50, de acero inoxidable para tejidos, utilizando medio RPMI 1640 adicionado con 100 u/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina (P-E). Las células esplénicas fueron centrifugadas a 2,500 rpm, durante 10 minutos a 4° C, resuspendidas en agua destilada estéril fría para lisar los eritrocitos; se diluyó a 1:25 en medio frío RPMI 1640 y se recentrifugó a 2'500 rpm/10 minutos a 4° C. Se realizó una sola suspensión celular ($5-7 \times 10^6$ células/ml) en medio RPMI 1640 libre de suero, suplementado con L-glutamina (mM), piruvato de sodio (1 mM) y P-E.

b) Aislamiento de linfocitos T.

La suspensión celular a partir de bazo preparada con anterioridad, se pasó a través de columnas de lana de nylon mediante el método descrito por Julius *et al.*, adaptado por Kogut y Slajchert para la purificación de LT.³² Las columnas fueron preparadas con lana de nylon húmeda, a razón de 3.5 g, introduciéndola sin compactarla, en jeringas de 35 ml esterilizadas por autoclave. Las columnas se preincubaron con medio RPMI 1640 tibio adicionado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB), a 41° C por una hora en una incubadora con 5 % de CO₂. Las células se aplicaron a las columnas con 10 ml de medio RPMI 1640. Hecho lo anterior se incubaron a 41°C durante una hora en una incubadora con 5 % de CO₂. Las células no adherentes a la lana de nylon fueron eluidas de la columna con medio RPMI 1640 tibio. La viabilidad de las células eluidas se determinó mediante tinción con azul de tripan al 0.1 % y se ajustó la densidad celular a la concentración de 2×10^6 células viables/ml con medio RPMI 1640 libre de suero más P-E. Diez ml de células no adherentes a la lana de nylon se incubaron en placas de petri, de 100 x 15 ml, durante 2 horas a 41° C, en una incubadora con 5 % de CO₂, para eliminar a los macrófagos. Las células no adherentes (L T) se lavaron de las

cajas de petri, se verificó su viabilidad tñiéndolas con azul de tripán al 0.1 % y se ajustaron a las diversas densidades celulares con medio RPMI 1640 libre de suero, las cuales se utilizaron para la preparación de las linfocinas.

c) Preparación de las linfocinas.

Las linfocinas se obtuvieron mediante la incubación de LT purificados (1×10^7 células/ml), en medio RPMI 1640 adicionado con 7.5 $\mu\text{g/ml}$ de Concanavalina-A, en cajas de petri para cultivo tisular durante 48 horas, a 41° C en una incubadora con 5 % de CO₂. Después de la incubación, el sobrenadante se colectó y centrifugó a 2'000 rpm/15 minutos para remover todas las células; se le adicionó methyl α -mannopyranosida (40 $\mu\text{g/ml}$) para inactivar residuos de Concanavalina-A. Se concentraron los sobrenadantes de 10 a 12 veces mediante ultrafiltración, empleando membranas YM-10 (10 kilodaltons). El material retenido se pasó a través de un filtro (0.45 μ); el sobrenadante resultante (SE-ILK) fue guardado en refrigeración a -20° C hasta que se utilizó.

Desafío con *E. tenella*.

Para realizar la evaluación del grado de lesiones cecales macroscópicas y microscópicas, así como cuantificación del número de ooquistes cecales recuperados, se utilizó una dosis única de desafío al día 16 de edad, de 10,000 ooquistes esporulados/0.25 ml/pollo.

Aves de experimentación.

Se usaron pollos de engorda Arbor Acres x Arbor Acres de un día de edad, procedentes de una incubadora comercial, los cuales se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum* dentro de baterías eléctricas ubicadas en las unidades de aislamiento del DPA: Aves de la F.M.V.Z., U.N.A.M. El alimento proporcionado consistió en una ración balanceada comercial sin anticoccidiano.

Diseño experimental.

Se emplearon 135 pollitos de 1 día de edad, alcazorizados en 3 grupos, cada uno con 3 repeticiones de 15 pollos. Los grupos estuvieron formados de la siguiente manera:

Grupo	Designación	Tratamiento	Desafo con <i>E. tenella</i> . No. ooquistes/ave
1	Testigo (-)	Sin tratamiento	0
2	Tratado	SE-ILK	10,000
3	Testigo (+)	Sin tratamiento	10,000

A los 14 días de edad, a las aves del grupo tratado se les inyectó 0.5 ml de linfocinas vía i.p.; a los 2 días post-inyección se administró una dosis única/ave de 10,000 ooquistes esporulados vía oral. Todas las aves fueron sacrificadas a los 23 días de edad y se procedió a determinar el grado de lesiones cecales microscópicas y macroscópicas según la escala de Johnson y Reid,³¹ así como cuantificar la cantidad de coccidias presentes en los ciegos a los 7 días post-infección por el método de McMaster y se expresó como el número total de ooquistes recuperados/ave.

Análisis estadístico.

La evaluación de la diferencia del número de ooquistes recuperados de ciegos entre los tres grupos, se obtuvo mediante un análisis de varianza.⁴⁵ Las diferencias significativas de las lesiones cecales microscópicas y macroscópicas entre grupos fueron determinadas mediante la prueba de Ji-cuadrada.⁹¹

RESULTADOS

Evaluación del grado de lesiones cecales microscópicas, macroscópicas y cuantificación del número de ooquistes recuperados.

Estudio histopatológico.

A los 7 días posteriores al desafío con *E. tenella*, se observó una inflamación cecal severa con exudado seroso, en 4 de 6 laminillas del grupo inoculado con SE-ILK y una inflamación moderada en 1 de 6 laminillas. Los ciegos del grupo testigo positivo, que no recibieron las SE-ILK presentaron inflamación muy severa, con necrosis e infiltración linfocitaria en 5 de 6 laminillas, y una inflamación moderada en 1 de 6 laminillas. En el testigo negativo sólo se observó tejido cecal normal (Cuadro 1).

Lesiones cecales macroscópicas.

El grupo inoculado con las SE-ILK reflejó una tiflitis con equimosis, hemorragias moderadas y exudado seroso, correspondiente al grado de lesión de 2+. El grupo testigo positivo mostró lesiones de tiflitis hemorrágica severa, exudado mucoso con fibrina y necrosis del epitelio, que corresponden al grado de lesión 3 (Cuadro 2).

Recuperación de ooquistes.

Se observó una disminución en la recuperación de ooquistes/gr del grupo de aves inoculado con SE-ILK en relación con el grupo testigo positivo ($P < 0.05$) a los 7 días post-desafío. El grupo testigo negativo no presentó ningún oocisto (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, las SE-ILK fueron capaces de conferir protección parcial a pollos de 14 días, ante una dosis de desafío con 10,000 ooquistes esporulados de una cepa patógena de *E. tenella*. El grupo inoculado con las SE-ILK reflejó una tiflitis con equimosis, hemorragias moderadas y exudado seroso, correspondiente al grado de lesión de 2+. El

grupo testigo positivo mostró lesiones de tiflitis hemorrágica severa, exudado mucoso con fibrina y necrosis del epitelio, que refleja la patogenicidad de *E. tenella* con lesiones características de la cepa utilizada.^{31, 46, 53, 56, 57, 75} En tanto que la histopatología muestra una característica diferente e importante de las laminillas del grupo inoculado con SE-ILK, tal como la presencia de exudado seroso en el epitelio cecal con infiltración de PMN, los cuales reflejan la etapa inicial del proceso inflamatorio, mientras que la histopatología del grupo que no recibió la protección de SE-ILK, presentó escasos PMN, abundantes linfocitos, fibrina y necrosis que corresponde a la etapa severa y crónica de la inflamación.^{9, 85}

Sin embargo, en cuanto a la recuperación de oocistos cecales, existe una disminución estadística y numérica en el grupo protegido por las SE-ILK con respecto al testigo positivo, lo que sugiere un efecto favorable por parte de las SE-ILK, aunque clínicamente se deba tomar con cautela. Un sólo esporozoito que logre cubrir la fase de esquizogonia y la fase sexual, podrá originar a macrogametos y microgametos, los cuales producirán a su vez cientos de miles de oocistos.⁵³

Los efectos protectivos que se presentaron en este estudio, tales como la disminución en la recuperación de la cepa de *E. tenella* por parte de las aves que recibieron protección con el SE-ILK, la disminución del grado de severidad de las lesiones macroscópicas, el aceleramiento del proceso inflamatorio observado a la histopatología y la disminución parcial del número de oocistos, hace suponer que el sobrenadante de LT estimulados con Concanavalina-A, específicas contra *S. enteritidis*, coadyuvan inespecíficamente a la respuesta inmunológica ante la presencia de una dosis elevada de *E. tenella*. Se supone que las linfocinas presentes en el SE-ILK estimulan a los linfocitos TCD4+, TCD8+, macrófagos y granulocitos debido a que en los mamíferos las citocinas liberadas por los LT activos, inducen proliferación de LT, regulan la inflamación local y estimulan el crecimiento y diferenciación de los leucocitos inmaduros.^{41, 68, 73, 74, 83} Sin embargo, es necesario realizar estudios sobre las linfocinas presentes en el sobrenadante de las SE-ILK,

haciendo estudios independientes para conocer cual es el mecanismo de las linfocinas involucradas en la inmunidad aviar, así como evaluar a diferentes dosis de desafío.

Cuadro 1
EVALUACIÓN DEL EFECTO PROFILÁCTICO DE SE-ILK ANTE UN DESAFÍO POR *Eimeria tenella* MEDIANTE LA SEVERIDAD DE LESIONES CECALES MICROSCÓPICAS EN POLLOS DE 23 DÍAS DE EDAD.^a

HISTOPATOLOGÍA DE CIEGOS POR SEVERIDAD DE INFLAMACIÓN^c

Tratamiento^d	Número de aves sin lesiones sobre total^b	Número de aves con lesiones 1+ sobre total^b	Número de aves con lesiones 2+ sobre total^b	Número de aves con lesiones 3+ sobre total^b	Número de aves con lesiones 4+ sobre total^b
Testigo negativo	6/6 (100)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Testigo positivo	0/6 (0)	0/6 (0)	1/6 (16.6)	0/6 (0)	5/6 (83.3)
SE-ILK	0/6 (0)	0/6 (0)	1/6 (16.6)	4/6 (66.6)	1/6 (16.6)*

^a Los pollos fueron inyectados i.p. con 0.5 ml de SE-ILK al día 14 de edad. Dos días después de la inyección todas las aves fueron desafiadas con 10,000 ooquistes esporulados de *E. tenella*. Los pollos fueron sacrificados 7 días post-desafío para evaluación histopatológica de lesiones cecales. Se observó una reducción significativa del número de pollos con severidad de lesiones 4+, tratados con SE-ILK en comparación con el grupo testigo positivo.

^b Valores expresados como número de aves con o sin lesiones sobre un total de 6 muestras cecales por grupo (%).

^c 0 = Sin inflamación
 1+ = Inflamación leve
 2+ = Inflamación moderada
 3+ = Inflamación severa
 4+ = Inflamación muy severa

^d Testigo negativo: grupo experimental no tratado-no desafiado.
 Testigo positivo: grupo experimental no tratado-desafiado.
 SE-ILK: grupo experimental inoculado con linfocinas de aves inmunes a *S. enteritidis* y desafiado con 10,000 ooquistes esporulados de *E. tenella*

*Significativamente diferente del grupo testigo positivo ($P < 0.025$), mediante la prueba de Ji-cuadrada.

Cuadro 2
EVALUACIÓN DEL EFECTO PROFILÁCTICO DEL SE-ILK ANTE UN DESAFÍO POR *Eimeria tenella* MEDIANTE LA SEVERIDAD DE LESIONES CECALES MACROSCÓPICAS EN POLLOS DE 23 DÍAS DE EDAD.^a

EVALUACIÓN DE LESIONES POR SEVERIDAD DE INFLAMACIÓN

Tratamiento ^c	Número de aves sin lesiones sobre total ^b	Número de aves con lesiones 1+ sobre total ^b	Número de aves con lesiones 2+ sobre total ^b	Número de aves con lesiones 3+ sobre total ^b	Número de aves con lesiones 4+ sobre total ^b
Testigo negativo	45/45 (100)	0/45 (0)	0/45 (0)	0/45 (0)	0/45 (0)
Testigo positivo	0/45 (0)	0/45 (0)	0/45 (0)	45/45 (100)	0/45 (0)
SE-ILK	0/45 (0)	0/45 (0)	43/45 (95.5)	2/45 (4.5)	0/45 (0)*

^a Los pollos fueron inyectados i.p. con 0.5 ml de SE-ILK al día 14 de edad. Dos días después de la inyección, todas las aves fueron desafiadas con 10,000 oocistos esporulados de *E. tenella*. Los pollos fueron sacrificados 7 días post-desafío para la evaluación de lesiones cecales. Se observó una reducción significativa del número de pollos con severidad de lesiones 4+, tratados con SE-ILK en comparación con el grupo testigo positivo.

^b Valores expresados como número de aves con o sin lesiones sobre el total de aves evaluadas (%).

^c Testigo negativo: grupo experimental no tratado-no desafiado.

Testigo positivo: grupo experimental no tratado-desafiado.

SE-ILK: grupo experimental inoculado con linfocinas de aves inmunes a *S. enteritidis* y desafiado con 10,000 oocistos esporulados de *E. tenella*.

*Significativamente diferente del grupo testigo positivo (P < 0.025), mediante la prueba de Ji-cuadrada.

Cuadro 3
EVALUACIÓN DEL EFECTO PROFILÁCTICO DEL SE-ILK ANTE UN DESAFÍO POR *Eimeria tenella*, MEDIANTE EL CONTEO DE OOCISTAS CECALES EN POLLOS DE 23 DÍAS DE EDAD.^a

	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	COMBINADO
Tratamiento *	Oocistas / g heces ^b	Oocistas / g heces ^b	Oocistas / g heces ^b	Oocistas / g heces ^b
Testigo negativo	0 A	0 A	0 A	0 A
Testigo positivo	73,800 ± 625 B	72,400 ± 634 B	73,000 ± 590 B	73,666 ± 611 B
SE-ILK	62,400 ± 588 C	61,800 ± 610 C	61,200 ± 614 C	61,800 ± 600 C

^aLos pollos fueron inyectados i.p. con 0.5 ml de SE-ILK al día 14 de edad. Dos días después de la inyección, todas las aves fueron desafiadas con 10,000 oocistas esporuladas de *E. tenella*. La recuperación y conteo de oocistas se realizó a los 7 días post-desafío. Se observó una reducción significativa del número de oocistas recuperados a partir de pollos tratados con SE-ILK, en comparación con el grupo testigo positivo.

^bLos valores de los tratamientos están expresados en media ± desviación estándar y los de diferente literal indican diferencias estadísticas significativas mediante la prueba de Tukey (P < 0.05).

* Testigo negativo: grupo experimental no tratado-no desafiado.

* Testigo positivo: grupo experimental no tratado-desafiado.

* SE-ILK: grupo experimental inoculado con infocinas de aves inmunes a *S. enteritidis* y desafiado con 10,000 oociste esporuladas de *E. tenella*.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN INESPECÍFICA CONFERIDA POR LINFOCINAS OBTENIDAS DE AVES INMUNIZADAS CONTRA *Eimeria tenella* ANTE UN DESAFÍO CON *Salmonella enteritidis* EN POLLOS DE ENGORDA.

INTRODUCCIÓN

El control de *S. enteritidis* ha sido considerado como una de las mayores prioridades dentro de la industria avícola.⁸⁴ Las Infecciones Paratifoideas se asocian frecuentemente con enfermedades en humanos y en muchas especies animales; rara vez causan mortalidad alta o lesiones agudas en aves.^{20, 27} La implementación exitosa de programas de erradicación similares a los que se utilizan contra *S. pullorum* y *S. gallinarum* es prácticamente imposible, tomando en consideración la multitud de huéspedes susceptibles a la infección por *S. enteritidis* productora de Paratifoidea. Por lo tanto, es necesario que la avicultura cuente con métodos aplicables para la reducción de estas infecciones.⁸²

Aun cuando la vacunación tradicional de las aves contra *Salmonella* se ha realizado sólo con aceptación comercial y éxito limitado⁶¹ la manipulación apropiada del aparato inmunocompetente de las aves puede contribuir a la solución de problemas por salmonelosis en aves explotadas comercialmente.^{48, 82} Una opción puede ser la utilización de linfocinas, las cuales actúan como mediadores solubles en la respuesta inmune específica e inespecífica.^{48, 82, 88}

Algunos estudios han documentado la administración profiláctica experimental de citocinas derivadas ya sea de macrófagos o LT para el tratamiento de infecciones producidas por diversas salmonelas en pollos de engorda. La terapia profiláctica con estas citocinas puede potencializar las ramificaciones inespecíficas y específicas de la respuesta inmune del huésped, inhibir el desarrollo microbiano, acelerar la respuesta protectora y reducir

significativamente la severidad de infecciones por *Salmonella*.^{22, 34, 35, 67} Anteriormente se demostró que es posible conferir un incremento en la resistencia contra la infectividad de *S. enteritidis* en órganos mediante la administración profiláctica de linfocinas procedentes de pollos inmunizados contra *S. enteritidis* (SE-ILK).⁸² Al igual que este, varios estudios más han probado el efecto protector de sobrenadantes crudos de linfocinas en pollos ante desafíos homólogos.

Sin embargo, es posible que la protección profiláctica conferida por las linfocinas no se limite a la reducción en la infectividad de algún microorganismo específico, sino de otros antigénicamente distintos. Esta aseveración se basa en estudios realizados por Wong,⁸⁹ donde se encontró que linfocinas producidas por LT de aves inmunizadas con *S. enteritidis* causante de la Paratifoidea Aviar, confirieron protección ante un desafío con *S. gallinarum* en pollos jóvenes. Los resultados obtenidos en dichos estudios demuestran que las SE-ILK pueden inducir protección cruzada entre especies de *Salmonella* a pesar de sus diferencias antigénicas.⁸⁹ Estos hallazgos sugieren que el mecanismo de resistencia del hospedador a *Salmonella* en aves puede ser menos dependiente de una respuesta específica hacia el antígeno, pero más eficaz al iniciar una respuesta temprana del hospedador durante la infección. Es así como se ha reportado que la potencialización de la respuesta inflamatoria del hospedador por las SE-ILK, está asociada con la protección inespecífica contra la infección por Paratifoidea en aves.⁸² Estudios similares llevados a cabo por Ray y colaboradores han demostrado previamente protección cruzada conferida por SE-ILK en infecciones causadas por *S. typhimurium* en pollos Leghorn.⁷⁰

Actualmente, la protección conferida a pollos de engorda por extractos crudos de linfocinas específicas para un determinado microorganismo, ha quedado demostrada.^{32, 48, 49, 82} Ahora resulta importante determinar si la administración profiláctica del sobrenadante que contiene linfocinas de aves hiperinmunizadas con *E. tenella* (ET-ILK), parásito protozoario intracelular,^{53, 56, 57} tiene algún efecto protector al desencadenar una reacción inmune celular inespecífica contra la infección producida por una cepa patógena de *S. enteritidis*, bacteria intracelular facultativa,⁶⁵ en pollos de engorda. El objetivo del presente estudio fue evaluar

la protección inespecífica conferida por las linfocinas procedentes de aves inmunizadas contra *E. tenella*, por medio de la disminución en la invasión a órganos por *S. enteritidis* en pollos de engorda de un día de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material infectante.

Se empleó una cepa de *S. enteritidis* fagotipo 13 obtenida del National Veterinary Services Laboratory (NVSL) Ames, Iowa, seleccionada por la resistencia a NO-AN. Esta cepa fue utilizada para la prueba de desafío.

Así mismo, se utilizó la cepa MOR-80-QRO de *E. tenella*, donada por el Dr. Moreno Díaz (Departamento de Producción Animal: Aves, F.M.V.Z., U.N.A.M.), la cual fue empleada para la inmunización de las aves en la elaboración de ET-ILK. Los ooquistes fueron cosechados, esporulados y almacenados como se describe previamente.⁴²

Inmunización de las aves con *E. tenella* para la obtención de ET-ILK.

Se emplearon pollos de engorda Arbor Acres x Arbor Acres de 4 semanas de edad; las aves fueron inoculadas vía oral con *E. tenella* durante 14 días consecutivos, con una dosis de 1,000 ooquistes/ave/día, lo cual induce una inmunidad sólida en los pollos. Después de 10 días de la última dosis, las aves fueron sacrificadas para la obtención de bazos.

Preparación de linfocinas.

Las ET-ILK fueron elaboradas a partir de bazos de las aves inmunizadas con *E. tenella* por medio de la técnica de Kogut y colaboradores, descrita en el estudio anterior.

Desafío con *S. enteritidis*.

Para el desafío de las aves se utilizó una cepa de *S. enteritidis* seleccionada por su resistencia a NO-AN, la cual se cultivó en caldo infusión cerebro corazón (CICC) durante 18 horas a 37°C en una estufa de incubación. Este medio de cultivo contenía 25 µg/ml de

NO y 20 µg/ml de AN para inhibir el crecimiento de otras bacterias. El inóculo para el desafío fue preparado en PBS estéril. La concentración del inóculo fue determinada mediante espectrofotometría a razón de 10^9 ufc/ml, a partir de la cual se realizaron diluciones en forma seriada en PBS, para obtener una concentración de 10^5 ufc/ml. La concentración de células viables del inóculo se confirmó mediante conteo de colonias en cajas con agar verde brillante (AVB).

Aves de experimentación.

Se usaron pollos de engorda Arbor Acres x Arbor Acres de un día de edad, procedentes de una incubadora comercial, los cuales se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum* dentro de baterías eléctricas ubicadas en las unidades de aislamiento del DPA: Aves de la F.M.V.Z., U.N.A.M. El alimento proporcionado consistió en una ración balanceada comercial con anticoccidiano.

Diseño experimental.

Se utilizaron 120 pollitos de 1 día de edad, los cuales se asignaron de manera aleatoria en tres grupos:

Grupo	Designación	Tratamiento	Desafío con <i>S. enteritidis</i>
1	Tratado	ET-ILK	10^5 UFC/ml
2	Testigo (+)	Sin tratamiento	10^5 UFC/ml
3	Testigo (-)	Sin tratamiento	0

Los grupos constaron de 40 pollos, cada uno con 2 réplicas de 20 aves. Las aves del grupo tratado fueron inyectadas con 0.5 ml/pollo de ET-ILK, vía i.p.; a los 30 minutos post-inyección se desafió con *S. enteritidis* a una dosis de 0.25 ml/pollo con una concentración de 10^9 ufc/ml, vía oral. Todas las aves se sacrificaron 24 horas después del desafío; tanto el hígado como el bazo, así como las tonsilas cecales fueron colectados asépticamente y cultivados de acuerdo al Plan Nacional de Mejoramiento Avícola (NPIP). El hígado y el bazo se trabajó como una muestra combinada. Los órganos fueron incubados por 24 horas a 37°C en caldo tetrionato. Después se procedió a cultivar en placas de AVB con NO-AN, las cuales fueron incubadas por 24 horas a 37°C y examinadas para determinar la presencia de colonias típicas de *S. enteritidis*.

Análisis estadístico.

Se utilizó la prueba de Ji-cuadrada para determinar las diferencias significativas en la invasión a órganos por *S. enteritidis* entre los distintos grupos tratados.⁹¹

RESULTADOS

Evaluación de la invasión a órganos por *S. enteritidis*.

La administración i.p. de ET-ILK fue capaz de reducir la infección de órganos en pollos desafiados con *S. enteritidis*, en más de un 50% (Cuadro 4). De los grupos que fueron desafiados, el tratado con ET-ILK mostró una reducción significativa en el número de pollos positivos al cultivo de *S. enteritidis* a partir de muestras de hígado-bazo en comparación con el grupo testigo, lo cual fue posible observar en las 2 réplicas ($P < 0.001$ y $P < 0.005$ respectivamente).

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la recuperación de la bacteria a partir de tonsilas cecales ($P > 0.05$) del grupo tratado con ET-ILK al compararlo con el grupo testigo positivo (Cuadro 4).

DISCUSIÓN

Con anterioridad se han venido realizando trabajos en la elaboración y aplicación de sobrenadantes de LT provenientes de aves inmunes contra *S. enteritidis* (SE-ILK) y *S. gallinarum* (SG-ILK), los cuales han demostrado conferir protección a pollos de engorda susceptibles ante los desafíos bacterianos,^{32, 48, 49, 50, 82} pero al parecer este sobrenadante protege de manera inespecífica, ya que se ha observado inmunidad cruzada. La terapia profiláctica con citocinas derivadas de macrófagos y LT para la prevención de infecciones producidas por *Salmonella*, puede potencializar una respuesta inmune inespecífica del huésped al inhibir el desarrollo microbiano, acelerar la respuesta protectora y reducir significativamente la severidad de la infección.^{22, 34, 35, 67}

El objetivo de la presente investigación fue determinar si la administración i.p. de linfocinas aviáres puede regular una respuesta de tipo inespecífico del huésped contra un desafío experimental con *S. enteritidis*. Los resultados demuestran que el tratamiento profiláctico de pollos con ET-ILK puede conferir protección inespecífica contra la invasión de órganos por *S. enteritidis*, según queda en evidencia mediante una reducción significativa ($P < 0.005$), ($P < 0.001$) en la cantidad de órganos positivos a *S. enteritidis* al día post-infección.

La protección inespecífica que se presentó es posible que se haya debido a: a) un incremento concomitante de leucocitos PMN en la sangre periférica,⁴⁹ b) aumento en el grosor de la lámina propia intestinal, debido a infiltración de estas células inflamatorias,⁸² c) la presencia y papel funcional de la IL-2 e INF γ en el ET-ILK,¹⁸ d) la posible presencia de algún factor estimulador de colonias, tal como el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (FEC-GM) en el sobrenadante de linfocinas empleado, así como su papel en la respuesta inflamatoria,⁴⁸ y e) la generación local de citocinas de respuesta inflamatoria temprana, como por ejemplo el FNT α y la IL-1, así como la producción local de citocinas quimiotácticas para activar los PMN, como IL-8.³³

La característica histológica más común de la salmonelosis en intestino de aves es el reclutamiento de grandes cantidades de heterófilos en la lámina propia a partir de la proliferación de estos PMN en sangre periférica. Hallazgos recientes han demostrado la conexión que existe entre los heterófilos de aves y la resistencia temprana a infecciones por salmonelas; los heterófilos son críticos para el desarrollo de una respuesta inflamatoria efectiva contra la invasión inicial de los órganos por salmonelas y contra la patogenia subsecuente de la enfermedad en los pollos.^{33, 82} Durante estos últimos años se han proporcionado evidencias que relacionan la resistencia de las aves con la capacidad de *Salmonella* de infectar órganos, a través de la respuesta inflamatoria heterófila inducida por citocinas. Se ha establecido una asociación entre la administración profiláctica de citocinas procedentes de los LT de pollos inmunizados contra *S. enteritidis* y la acumulación de heterófilos inflamatorios en el sitio de la invasión bacteriana en el intestino y la expresión de resistencia a las infecciones sistémicas por esta bacteria.³³ De los puntos anteriormente mencionados se puede destacar lo siguiente:

- a) Investigaciones realizadas previamente indican que los sobrenadantes de LT estimulados con Concanavalina-A, derivados de pollos adultos inmunes a *S. enteritidis* (SE-ILK), cuando fueron administrados i.p. a pollos de un día de edad antes del desafío con *S. enteritidis*, confirieron protección en 24 horas contra la invasión de órganos por *S. enteritidis*. Esta resistencia mediada por inmunolinfocinas estuvo asociada con un incremento concomitante de leucocitos PMN en sangre periférica que alcanzó su máximo 4 horas después del desafío.⁴⁹ Los heterófilos de pollo y pavo son capaces de matar a *S. enteritidis* en la circulación dentro de los 30 minutos posteriores al contacto inicial con la bacteria (Stabler y Kogut, datos no publicados), lo cual explica la resistencia a la invasión de órganos por *Salmonella* observada en este experimento 24 horas después de la infección inicial. Kogut reporta que cuando se administran linfocinas provenientes de aves inmunes a *E. tenella* (ET-ILK) por vía i.p. es provocada una respuesta inflamatoria que se caracteriza por migración de células inflamatorias de la sangre periférica hacia el sitio de infección.³²

- b) Estudios llevados a cabo por Téllez y colaboradores,⁴² mostraron que la administración i.p. de SE-ILK fue capaz de reducir, en forma consistente, la infección de órganos en pollos desafiados con *S. enteritidis*. Esta resistencia estuvo asociada con un incremento en el grosor de la lámina propia, debido a una marcada infiltración de células inflamatorias. De manera similar, en el presente estudio se observó un incremento en la resistencia a la infectividad de *S. enteritidis* en los órganos, conferida por el sobrenadante ET-ILK tal y como sucede cuando se administran SE-ILK. Es probable que el movimiento de las células PMN de la sangre periférica hacia el sitio de infección haya jugado un papel importante en el incremento de la protección observada en este experimento.
- c) La protección conferida por ET-ILK ante una infección por *S. enteritidis* puede tener su origen en el hecho de que en este sobrenadante, al igual que en SE-ILK, se encuentran presentes dos linfocinas importantes: IL-2 e INF γ .¹⁸ Gómez y colaboradores²³ demostraron la presencia de IL-2 e INF γ en un extracto crudo obtenido de LT (SE-ILK) en forma indirecta en bioensayos y radioinmunoensayos al observar un incremento en la expresión de moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de esplenocitos de pollo, lo cual sugiere que la protección biológica observada en el presente trabajo pudo deberse a la presencia de por lo menos estas dos linfocinas, que han resultado ser comunes en ambos sobrenadantes. En particular, la presencia de IL-2 e INF γ resulta de gran importancia, ya que producen un aumento en la actividad de fagocitos activados, los cuales controlarían la multiplicación intracelular de la *Salmonella*; al mismo tiempo, los macrófagos activados secretarían IL-12, interleucina directamente involucrada en la inducción de una respuesta de linfocitos Th1, los cuales son responsables de la secreción de IL-2 e INF γ , es decir, en la respuesta inmune celular. Se ha reportado que IL-2 e INF γ actúan sinérgicamente incrementando la actividad celular; incluso se ha observado un efecto cooperativo a la inyección de TNF- α e INF γ incrementando *in vivo* la actividad bactericida contra *Salmonella*.⁶⁰
- d) En estudios realizados por McGruder,⁴⁸ una marcada granulocitofilia en sangre periférica fue observada a la cuarta hora posterior a la inyección de SE-ILK. El factor

responsable de este incremento granulocítico no ha sido identificado. De acuerdo a la protección contra la invasión a órganos por *Salmonella* observada en este y otros estudios, es posible suponer la presencia de algún componente que pueda ser factor estimulador de colonias, tales como el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (FEC-G), FEC-GM o algún factor estimulador de colonias múltiple.⁵² Se sabe que estas tres citocinas inducen un incremento en el número de PMN en sangre periférica, sobre todo el FEC-GM, el cual propicia la diferenciación hacia granulocitos y fagocitos mononucleares e inicia el crecimiento y diferenciación de todas las líneas celulares.^{25, 52.}

⁷⁸ La posible presencia de FEC-GM en ambos sobrenadantes (ET-ILK y SE-ILK) resultaría de suma importancia, ya que explicaría el reclutamiento y la infiltración de grandes cantidades de heterófilos, macrófagos y monocitos que se presentan generalmente en los sitios de infección de *Salmonella*, sin importar si dichos sobrenadantes son específicos o no a este agente.

- e) Se tiene sólida evidencia de que el FNT α es producido después de la administración de ET-ILK y del desafío con salmonelas, lo cual resulta sumamente significativo porque el FNT α es una citocina de respuesta temprana necesaria para la inducción de la inflamación aguda. Así mismo, se ha demostrado en otros estudios que en el ambiente local está presente una proteína quimiotáctica similar a la IL-8. Esta proteína es responsable de la quimiotaxis de los heterófilos al sitio de invasión bacteriana.³³

Diversos trabajos realizados previamente permiten determinar que en el extracto crudo de linfocinas ET-ILK probablemente esté presente un factor estimulador de heterófilos PMN en el que pueda estar involucrado el FEC-GM y un factor activador de PMN, regulado posiblemente por IFN γ , actuando en sinergia con las interleucinas IL-1, IL-2 e IL-8. Por lo anterior, la presencia de una red funcional de citocinas durante la expresión de esta resistencia es fundamental para la iniciación y propagación de la respuesta inflamatoria.³³ Sin embargo, aún así es difícil determinar, caracterizar y cuantificar la naturaleza de las linfocinas que posiblemente se encuentren presentes en este sobrenadante y que han

conferido protección ante un desafío por *S. enteritidis* aún sin ser específicas contra dicha bacteria.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las ET-ILK tienen un efecto protector contra la invasión a órganos por *S. enteritidis*, pero no evitan la colonización a nivel intestinal, ya que no existió reducción significativa en la recuperación de la bacteria ($P > 0.05$) a partir de muestras de tonsilas cecales de pollos tratados con linfocinas.

En resumen, es probable que el decremento observado en el presente estudio en la invasión a órganos por *S. enteritidis* a las 24 horas de infección, haya sido debido al inicio de una cascada de citocinas después de la administración de linfocinas inespecíficas obtenidas de aves hiperinmunizadas contra *E. tenella*, dando como resultado la inducción de una respuesta inflamatoria heterofílica, quedando así demostrada la reacción inmune inespecífica. Actualmente se están realizando estudios adicionales para purificar e identificar las linfocinas efectoras tanto en sobrenadantes ET-ILK como en SE-ILK. Sería valioso considerar la posibilidad de realizar un estudio sobre la especificidad inducida por las linfocinas, junto con una investigación sistemática para conocer mejor los mecanismos mediante los cuales las linfocinas ejercen su acción.

Cuadro 4
**EVALUACIÓN DEL EFECTO PROFILÁCTICO DEL ET-ILK ANTE UN DESAFÍO CON 10^5 UFC/ml DE *Salmonella enteritidis*,
 MEDIANTE LA RECUPERACIÓN DE LA BACTERIA A PARTIR DE CULTIVO BACTERIOLÓGICO.^a**

TRATAMIENTO ^c	TESTIGO NEGATIVO		TESTIGO POSITIVO		ET-ILK	
Réplica	Hígado-Bazo ^b	Tonsilas cecales ^b	Hígado-Bazo ^b	Tonsilas cecales ^b	Hígado-Bazo ^b	Tonsilas cecales ^b
1	0/20 (0%)	0/20 (0%)	14/20 (70%)	16/20 (80%)	2/18 ** (11.1%)	11/18 (61.1%)
2	0/20 (0%)	0/20 (0%)	16/20 (80%)	20/20 (100%)	5/17 * (29.4%)	15/17 (88.2%)
Acumulativo	0/40 (0%)	0/40 (0%)	30/40 (75%)	36/40 (90%)	7/35 ** (20%)	26/35 (74.2%)

^a Los pollos fueron inyectados i.p. con 0.5 ml de ET-ILK al día de edad. Treinta minutos después de la inyección, todas las aves fueron desafiadas con 10^5 ufc/ml de *S. enteritidis*. Los pollos fueron sacrificados y cultivados 1 día post-desafío. Se observó una reducción significativa del número de pollos positivos al cultivo de *S. enteritidis*, tratados con ET-ILK, en comparación con el grupo testigo positivo.

^b Los valores de los tratamientos están expresados como número de aves positivas a *S. enteritidis* sobre el total de aves evaluadas (%). Los astenscos indican que el valor es significativamente diferente entre el grupo tratado y el testigo positivo: * (P < 0.005), ** (P < 0.001). Evaluado mediante la prueba de Ji-cuadrada.

^c Testigo negativo: grupo experimental no tratado-no desafiado.

Testigo positivo: grupo experimental no tratado-desafiado.

ET-ILK: grupo experimental inoculado con linfocinas de aves inmunes a *E. tenella* y desafiado con 10^5 ufc/ml de *S. enteritidis*.

CAPÍTULO V

EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN INESPECÍFICA CONFERIDA POR LINFOCINAS OBTENIDAS DE AVES INMUNIZADAS CONTRA *Eimeria tenella* o *Salmonella enteritidis* ANTE DESAFÍOS POR *Eimeria tenella* EN POLLOS DE ENGORDA PREVIAMENTE INMUNIZADOS.

INTRODUCCIÓN

La supervivencia de los protozoarios en animales inmunocompetentes ha llevado a concluir que los parásitos que tienen éxito son, por lo general, poco inmunogénicos y que en su adaptación a una existencia parasitaria han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir en presencia de una respuesta inmune. Sin embargo, al igual que otros microorganismos, los protozoarios intracelulares pueden estimular la inmunidad mediada por células.⁸³

En algunas enfermedades causadas por protozoarios, sobre todo en las producidas por coccidias, los mecanismos de inmunidad protectora no están claros todavía. En un estudio reciente se demostró un mayor nivel de linfocitos TCD8+ en el intestino de pollos inmunes contra *Eimeria*.³⁸ Se ha demostrado que es posible inducir a los linfocitos TCD8+ por las proteínas producidas por los esporozoitos y sobre todo, por los merozoítos, que representan la principal fase del ciclo de vida en donde se encuentran antígenos para la producción de inmunidad. Esto sugiere que la citotoxicidad resultante de estas células juega un papel importante en la inmunidad protectora; éstas se encargan de matar células infectadas con parásitos intracelulares. El fenómeno de lisis probablemente está mediado por la producción de linfocinas tales como el INF γ , la IL-2 y otras.³⁶ La IL-2 de acuerdo con lo reportado por Myers y colaboradores³⁹ posee un efecto de proliferación de LT en la respuesta inmune desencadenada por el microorganismo intracelular. En particular, la presencia de INF γ es de gran importancia, se ha demostrado que es el activador más

importante de macrófagos, induciendo la síntesis de enzimas que van a mediar el estallido respiratorio permitiendo a estos fagocitos profesionales eliminar los microorganismos fagocitados. Existe una inducción en la expresión de moléculas clase II del MHC en macrófagos, así como un aumento en la expresión de moléculas clase I por efecto del INF γ en pollos; así mismo, esta linfocina activa a los macrófagos, los cuales secretan a su vez IL-12, interleucina directamente involucrada en la inducción de una respuesta de linfocitos Th1, los cuales son los responsables de la secreción de IL-2 e INF γ , traducida a una respuesta inmune celular.²³

Las respuestas inmunes contra la infección primaria por coccidias son principalmente de tipo inespecífico, en las cuales se encuentran participando células NK, macrófagos, LB y LT.³⁹ La citotoxicidad de las células NK actúa a través de la producción de citocinas, como por ejemplo el INF γ . Se trata de células mononucleares distintas de LT, LB y macrófagos y en el pollo forman parte de los linfocitos intraepiteliales. Se ha observado que estas células lisantes naturales que existen entre los linfocitos intraepiteliales incrementan su actividad por encima de lo normal, coincidiendo con la eliminación del parásito en infecciones secundarias.³⁸ A diferencia de las infecciones primarias, las principales células efectoras en infecciones secundarias son los LT; en el pollo y en el caso específico de las infecciones por *E. tenella*, estas células T son probablemente subpoblaciones de linfocitos intraepiteliales que se encuentran en los sacos ciegos.³⁶ Así mismo, se ha observado que los macrófagos ejercen una fagocitosis más intensa de los esporozoítos y los esporocistos en presencia de suero inmune,⁶³ o en casos de infecciones secundarias. A diferencia de lo que ocurre en la infección primaria, la secundaria induce respuestas inmunes anamnésticas, o respuestas inmunes específicas.³⁶ Los principios de la inmunización se basan en dos aspectos clave de la inmunidad adaptativa: especificidad y memoria. Las células de memoria permiten al sistema inmunitario desarrollar una respuesta mucho más potente en el segundo encuentro con el mismo antígeno. Esta respuesta secundaria es más rápida en aparecer y más efectiva que la respuesta primaria.⁷² La inmunización de los pollitos realizada en esta investigación tiene como objetivos acelerar, aumentar y prolongar la respuesta inmune ante una segunda infección, al aumentar la actividad fagocítica de los

macrófagos e inducir una inmunidad anamnésica.³⁶ Así mismo, el objetivo de la aplicación de las linfocinas previo a la inmunización de los pollos con oocistos fue estimular y acelerar la reacción de células inmunitarias y no inmunitarias del huésped ante la presencia antigénica de la coccidia, favoreciendo de esta manera la aparición de una respuesta inmune celular y la creación de memoria inmunológica, suficiente para resistir y controlar una segunda infección con el mismo agente.

Por lo anterior es posible inferir que la administración profiláctica de linfocinas SE-ILK o ET-ILK es capaz de conferir protección a pollos de engorda inmunizados contra *E. tenella*, ante un desafío posterior con el mismo parásito, al desencadenar una reacción inmune celular y acelerar la formación de memoria inmunológica. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la protección inespecífica conferida por las linfocinas contenidas en ambos sobrenadantes al disminuir la severidad de las lesiones cecales macroscópicas, así como evaluar el efecto sobre la ganancia de peso, ante un desafío con *E. tenella* en pollos previamente inmunizados a este agente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material infectante.

Se utilizó la cepa MOR-80-QRO de *E. tenella*, donada por el Dr. Reynaldo Moreno (D.P.A.: Aves, F.M.V.Z., U.N.A.M.), la cual fue empleada en la prueba de desafío. Los ooquistes fueron cosechados, esporulados y almacenados como se describe previamente.⁴²

Así mismo, se empleó una cepa de *S. enteritidis* fagotipo 13 obtenida del National Veterinary Services Laboratory (NVSL), Ames, Iowa, seleccionada por la resistencia a NO-AN. Ambos agentes (*E. tenella* y *S. enteritidis*) fueron utilizados para la inmunización de las aves en la obtención de ET-ILK y SE-ILK respectivamente.

Inmunización de las aves con *E. tenella* para la obtención de ET-ILK.

Se emplearon pollos de engorda Arbor Acres x Arbor Acres de 4 semanas de edad; las aves fueron inoculadas vía oral con *E. tenella* durante 14 días consecutivos con una dosis de 1,000 ooquistes/ave/día, lo cual induce una inmunidad sólida en los pollos. Después de 10 días de la última dosis las aves fueron sacrificadas para la obtención de bazos.

Inmunización de las aves con *S. enteritidis* para la obtención de SE-ILK.

Para la obtención de las linfocinas de aves hiperinmunizadas, se utilizaron pollos de engorda Arbor Acres x Arbor Acres de 2 semanas de edad. El inóculo para la inmunización con *S. enteritidis* fue preparado con PBS, ajustado a una concentración de 10^9 ufc/ml mediante espectrofotometría y diluido con PBS para obtener una dosis final de 10^8 ufc/ml. Las aves fueron inoculadas vía oral, aplicándose dosis iguales de refuerzo a los 7, 14, 21 y 28 días después. Diez días después de la última inmunización, las aves fueron sacrificadas para la obtención de bazos.

Preparación de linfocinas.

Las ET-ILK y SE-ILK fueron elaboradas a partir de bazos de aves inmunizadas con *E. tenella* o *S. enteritidis* por medio de la técnica de Kogut y colaboradores, descrita anteriormente (Capítulo III).

Primoimmunización de los pollos.

La dosis empleada en la primoimmunización de los pollitos al día de edad fue de 30,000 ooquistes/0.25 ml/pollo.

Desafío con *E. tenella*.

Para la evaluación de la ganancia de peso y severidad de lesiones cecales macroscópicas, la dosis de desafío fue de 15,000 ooquistes esporulados/0.25 ml/pollo, aplicada al día 14 de edad.

Aves de experimentación.

Se usaron pollos de engorda Arbor Acres x Arbor Acres de un día de edad procedentes de una incubadora comercial, los cuales se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum* dentro de baterías eléctricas ubicadas en las unidades de aislamiento del DPA: Aves, de la F.M.V.Z., U.N.A.M. El alimento proporcionado consistió en una ración balanceada comercial sin anticoccidiano.

Diseño experimental.

Se utilizaron 250 pollitos de 1 día de edad, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos con 3 réplicas de 16 ó 17 aves cada una. El diseño experimental quedó conformado de la siguiente manera:

Grupo	Primoinmunización con <i>E. tenella</i> . No. ooquistes /ave	Tratamiento	Desafío con <i>E. tenella</i> . No. ooquistes/ave
1	0	Sin tratamiento	0
2	0	Sin tratamiento	15,000
3	30,000	SE-ILK	15,000
4	0	SE-ILK	15,000
5	30,000	ET-ILK	15,000

Todas las aves fueron pesadas al primer día de edad y a los pollos de los grupos tratados se les inyectó 0.5 ml de linfocinas vía i.p. Media hora después, los pollos se

primoinmunizaron con una dosis de 30,000 ooquistes esporulados/pollo vía oral. A los 14 días post-inmunización se desafió con una dosis de 15,000 ooquistes esporulados/pollo vía oral. Todas las aves fueron pesadas a los 21 días de edad para obtener la ganancia de peso y posteriormente fueron sacrificadas para evaluar el grado de lesiones cecales macroscópicas según la escala de Johnson y Reid.³¹

Análisis estadístico.

Las diferencias significativas de los pesos resultantes y las lesiones cecales macroscópicas entre los distintos grupos tratados fueron determinadas mediante un análisis de varianza siguiendo los Procedimientos de Modelos Lineales Generales, utilizando el programa de análisis estadístico SAS. La significancia fue determinada mediante la prueba de Duncan.⁴⁵

RESULTADOS

Evaluación de severidad de lesiones cecales macroscópicas y ganancia de peso al 7º día post-desafío con *E.tenella*.

Lesiones cecales macroscópicas

Respecto a las lesiones cecales, los pollos del grupo testigo positivo presentaron la media de lesiones más alta (cuadro 5), siendo de los grupos con cuadros de lesiones más severos, con aves que presentaron lesiones de grado 3+ (13/50) y 4+ (34/50) (Cuadro 6). El grupo que recibió tratamiento únicamente con SE-ILK tuvo un promedio de lesiones cecales muy alto, similar al del grupo testigo positivo (Cuadro 5); el número de aves con lesiones 4+ fue el más alto entre los diferentes tratamientos, con 40/47 aves, por lo cual se infiere que las linfocinas no confirieron protección aplicadas en forma única ante un desafío por *E. tenella* 14 días más tarde (Cuadro 6). Sin embargo, en los grupos de pollos inmunizados con oocistos inmediatamente después de la aplicación de las linfocinas (grupos 3 y 5), es posible apreciar que estas últimas confirieron protección a las aves ante el desafío con

15,000 ooquistes esporulados, ya que ambos grupos presentaron los promedios de lesiones cecales más bajos (Cuadro 5), así como el número de lesiones 3+ y 4+ (Cuadro 6).

En términos generales, las aves de todos los grupos, excepto del testigo negativo, mostraron grados de lesiones de 3+ y 4+, debido a que fueron comunes los pollos que presentaron grandes cantidades de sangre líquida o en forma de cordón en los ciegos y paredes cecales engrosadas (grado 3+), así como ciegos distendidos con sangre semi o coagulada, o mezclada con cordones caseosos y paredes cecales adelgazadas (grado 4+). No se observó ningún cambio en el grupo testigo negativo (Cuadros 2 y 3).

Ganancia de peso

Las aves de los grupos primoinmunizados al día de edad con 30,000 ooquistes esporulados (grupos 3 y 5) presentaron los promedios más bajos en cuanto a peso final y ganancia de peso 7 días post-desafío, comparados con los grupos testigo negativo y SE-ILK, incluyendo el grupo testigo positivo. Las aves tratadas sólo con SE-ILK mostraron los mejores promedios en cuanto a peso final y ganancia de peso, sólomente debajo de los obtenidos por el grupo testigo negativo (Cuadro 7).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó un incremento en la resistencia a la infectividad de *E. tenella*, conferida por las linfocinas presentes en SE-ILK y ET-ILK, por medio de disminución en la severidad de lesiones cecales macroscópicas, en pollos previamente inmunizados con *E. tenella*. Es posible que el efecto protector inespecífico proporcionado por ambos sobrenadantes, reflejado en la disminución de lesiones cecales, tenga su origen en los siguientes puntos:

- 1) Se ha demostrado que los LT de aves inmunizadas con *E. tenella* producen *in vitro* IL-2 e INF γ a través de la estimulación con mitógenos como la Concanavalina-A.^{17, 76, 59} Así mismo, se han detectado IL-2 e INF γ de pollo en SE-ILK, lo cual sugiere que la

protección biológica proporcionada de manera inespecífica por estos dos sobrenadantes y observada en el presente estudio por medio de la disminución de lesiones cecales macroscópicas, podría deberse a la presencia de estas linfocinas en ambos sobrenadantes. La IL-2 de acuerdo con lo reportado con Myers y colaboradores⁵⁹ posee un efecto de proliferación de LT en la respuesta inmune desencadenada por *E. tenella* o *S. enteritidis*. En particular, la presencia de INF γ en SE-ILK y ET-ILK es de gran importancia, ya que se ha demostrado que es el activador más importante de macrófagos, induciendo la síntesis de enzimas que van a mediar el estallido respiratorio permitiendo a estos fagocitos profesionales eliminar a los microorganismos fagocitados.²³

- 2) Aún cuando se desconocen en su mayoría las citocinas involucradas en la protección que confieren estos sobrenadantes, es posible pensar que en ambos (tanto ET-ILK como SE-ILK) se encuentren presentes algunas de ellas, tales como IL-2 e INF γ , u otras aun no caracterizadas, tal vez no las mismas pero con mecanismos similares para desencadenar una acción protectora en el pollo.
- 3) Como se ha descrito anteriormente, las citocinas que liberan los linfocitos Th1 son principalmente IL-2, IL-3, INF γ y FEC-GM1 pero se sabe que también pueden secretar FNT α a pesar de ser liberado principalmente por los macrófagos.^{1, 90} Cada una de ellas tiene funciones específicas al adherirse a su célula blanco; por ejemplo, la IL-2 estimula el crecimiento de LT, células NK y LB; la IL-3 estimula el crecimiento y diferenciación de todos los tipos celulares; el INF γ activa a los macrófagos, células NK y células endoteliales, así como el incremento de las moléculas del MHC I y II de todas las células; el FEC-GM propicia la diferenciación hacia granulocitos y fagocitos mononucleares e inicia el crecimiento y diferenciación de todas las líneas celulares; la posible presencia de FEC-GM en ambos sobrenadantes (ET-ILK y SE-ILK) resultaría de suma importancia, ya que explicaría el reclutamiento y la infiltración de grandes cantidades de heterófilos, macrófagos y monocitos que se presentan generalmente en los sitios de infección de las coccidias y salmonela, sin importar si dichos sobrenadantes

son específicos o no a estos agentes; el FNT α activa principalmente a los heterófilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares y contribuye a la quimiotaxis de leucocitos al sitio de la inflamación.^{1, 68}

- 4) No hay que descartar la posibilidad de que los heterófilos también podrían tener importancia en el control de coccidias y que la posible presencia del FEC-GM esté involucrada, como en el caso del control de *Salmonella* por SE-ILK.¹⁸

Lo anterior hace suponer que el efecto protector por parte del ET-ILK y SE-ILK, que aunque de manera ligera se observó por medio de la disminución de las lesiones, se deba a la conjunción de las funciones de cada una de las linfocinas anteriores. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la existencia de protección inespecífica conferida por ambos sobrenadantes en pollos ante un desafío por otro microorganismo. Sin embargo, aunque la protección resulta ser estadística y numéricamente significativa, clínicamente fue muy ligera; la severidad de las lesiones cecales disminuyó levemente, incluso continuó siendo alta aún en los grupos con promedios de lesiones más bajos.

Cabe mencionar que la disminución en el grado de lesiones cecales se presentó en los pollos primoimmunizados y estimulados conjuntamente con linfocinas, tanto SE-ILK como ET-ILK, lo cual no ocurrió en el grupo de aves no inmunizadas que únicamente recibieron el tratamiento de linfocinas SE-ILK. Las lesiones de los pollos de este último grupo fueron similares al de las aves del grupo testigo positivo.

El objetivo de la primoimmunización de los pollitos al día de edad con una dosis de 30,000 ooquistes/pollo, fue el acelerar, aumentar y prolongar la respuesta inmune ante una segunda infección (desafío con 15,000 ooquistes/ave), al incrementar la actividad fagocítica de los macrófagos e inducir una inmunidad de memoria (inmunidad anamnésica).³⁶ Así mismo, el objetivo de la aplicación de linfocinas 30 minutos antes de la inmunización de los pollos con oocistos, fue estimular y acelerar la reacción de las células inmunitarias y no inmunitarias del huésped ante la presencia antigénica de la coccidia, favoreciendo de esta manera la rápida aparición de una respuesta inmune celular y la creación de memoria

inmunológica, suficiente para resistir y controlar un segundo encuentro con el mismo antígeno 14 días después. Los principios de la inmunización se basan en dos aspectos clave de la inmunidad adaptativa: especificidad y memoria. Las células de memoria permiten al sistema inmunitario desarrollar una respuesta mucho más potente en el segundo encuentro con el mismo antígeno. Esta respuesta secundaria es, a la vez, más rápida en aparecer y más efectiva que la respuesta primaria.⁷² Sin embargo, en el presente trabajo esto no fue muy evidente, lo cual es posible explicar si se toma en cuenta que las coccidias más patógenas (tanto *E. tenella* como *E. acervulina*) son las menos inmunogénicas.^{2, 43, 79}

Cuando los oocistos son ingeridos por un ave, la pared de los mismos se rompe en la molleja y los esporozoitos se liberan de los esporocistos por la acción de la quimi tripsina y sales biliares en intestino delgado. Las aves recién nacidas algunas veces no son del todo susceptibles a la infección debido a la insuficiencia de quimi tripsina y sales biliares en el intestino para ocasionar la excitación.⁸ Aún cuando se llegaran a liberar los esporozoitos, los enterocitos resultan ser inmaduros al día de edad, lo cual limita en cierta forma la infección. Esta inmadurez del tracto digestivo del pollito debió ser factor para que la inmunización realizada al día de edad no tuviera efecto importante en la formación de memoria inmunológica.

El hecho de que el sistema inmune del pollito sea inmaduro al día de edad podría disminuir el efecto de las linfoquinas aplicadas sobre las células inmunes, células hasta entonces incapaces de responder a estímulos producidos por linfoquinas. Con respecto a esto, Lowenthal⁴⁴ encontró que los LT de pollitos de un día de edad son fenotípicamente maduros y capaces de ligar mitógenos tal como lo hacen los LT de aves maduras. Sin embargo, estas células fueron funcionalmente inmaduras debido a su incapacidad para proliferar o producir citocinas seguido a un estímulo inmune. Este investigador explica que las células presentes en el bazo de pollitos de un día de edad, seguramente producen un inhibidor soluble que evita la proliferación de LT. El mismo autor observó que la producción de este inhibidor decrece dramáticamente al día 2 de edad, lo cual coincide con un incremento en la habilidad de los LT para responder a una estimulación inmune. Estos resultados sugieren

que el periodo en el cual los LT no responden a la inmunoestimulación, es debido a una inmadurez funcional de los LT y la producción de un inhibidor soluble.⁷ Dicha información coincide con los resultados obtenidos en este trabajo. La ausencia de una respuesta de memoria importante mediada por la administración conjunta de SE-ILK o ET-ILK y oocistes de *E. tenella*, puede deberse a la inmadurez de los LT de pollitos de un día de edad; es por esta razón que al inocular las linfocinas, estas posiblemente sufrieran una desnaturalización antes de encontrar una célula blanco para desencadenar la cascada de eventos involucrados en una respuesta celular.

En el grupo de pollos no inmunizados que sólo recibieron tratamiento con SE-ILK al día de edad, es probable que los LT fueran estimulados, pero la ausencia del antígeno en el organismo capaz de mantener activo al sistema inmune no permitiera la producción y presencia de citocinas en el medio extracelular¹⁸ y por consiguiente el desarrollo de una respuesta inmune, así como la formación de memoria inmunológica que protegiera contra la coccidia al momento del desafío. La liberación de citocinas de su célula origen depende de que tanto ésta como la célula receptora sean estimuladas; si no existe antígeno alguno, no se producirá dicha estimulación. Es importante considerar el tiempo de protección obtenido por la inyección de citocinas en el cual se incrementa la resistencia en las aves ante infecciones por coccidias. El tiempo que transcurrió desde que se aplicaron las SE-ILK hasta que se realizó el desafío (14 días) pudo ser un factor importante por el cual este sobrenadante de linfocinas no confiriera protección. Kogut y colaboradores³² reportaron protección por parte de ET-ILK cuando fue administrado 30 minutos, 12, 24, 36 y 48 horas antes del desafío con *E. tenella*. En estudios realizados por García,¹⁸ el efecto profiláctico del ET-ILK mostró ser de corta duración ya que se observaron los efectos benéficos por un tiempo máximo de 5 días posteriores a su administración. Este periodo podría deberse a la vida fisiológica tan corta de las citocinas.¹⁸ Así mismo, investigaciones realizadas por Téllez³² demostraron que a los 6 días posteriores al tratamiento con SE-ILK en pollos de engorda, éstos fueron protegidos contra la invasión de órganos ante un desafío por *S. enteritidis*. Wong³⁰ reportó que los sobrenadantes de SE-ILK y SG-ILK disminuyeron

la invasión a órganos y mortalidad causada por la infección de *S. gallinarum* 10 días después de su aplicación (tiempo máximo de protección).

Como ya se ha citado, en estudios realizados recientemente se han identificado IL-2 e INF γ tanto en SE-ILK²³ como en ET-ILK.¹⁸ Es posible que debido a la presencia de estas linfocinas en ambos sobrenadantes, las SE-ILK hayan sido capaces de proteger contra una infección por *E. tenella* al disminuir la severidad de lesiones cecales. Sin embargo, el hecho que confirieran mayor protección que las ET-ILK, tratándose de un desafío no homólogo, puede resultar desconcertante. Los resultados indican una mayor protección conferida por SE-ILK que por ET-ILK. La explicación de esto puede tener su origen en una característica particularmente importante de *E. tenella*, como es el hecho de ser poco inmunogénica.^{2, 43, 79} Además, es importante considerar que el sitio de infección de este parásito se limita únicamente al epitelio de los sacos ciegos, es decir, se encuentra "poco expuesto" al sistema inmune, a diferencia de *S. enteritidis*, la cual resulta ser mucho más antigénica al ser una bacteria sistémica. Probablemente, al hiperinmunizar a los pollos para la obtención de las ET-ILK con *E. tenella*, al ser menos inmunogénica que *Salmonella*, el sistema inmune de las aves genera poco esfuerzo, lo que propicia que los LT sintetizen linfocinas pero en menor cantidad que las que se producen cuando reaccionan ante *Salmonella*; esto permite suponer que las linfocinas se encuentran en menor concentración en el sobrenadante de ET-ILK.

Otro de los propósitos de la presente investigación fue evaluar el efecto profiláctico inespecífico de SE-ILK y ET-ILK mediante la ganancia de peso en pollos previamente inmunizados ante un desafío por *E. tenella*. Las aves de los grupos primoinmunizados presentaron los promedios más bajos en cuanto a ganancia de peso en comparación con los otros grupos experimentales, incluyendo al grupo testigo positivo; sin embargo, es necesario tener en cuenta que la inoculación de oocistos siempre tendrá un efecto detrimental en la ganancia de peso debido a la patogenicidad de la coccidia y a las condiciones de estrés a que es sujeta el ave por la manipulación. Un pollo infectado con coccidias jamás alcanzará el peso final adecuado y mucho menos después de nuevas

infecciones. En cambio, los pollos que sólo fueron tratados con SE-ILK, al no ser inmunizados al día de edad, no padecieron el estrés que representa la inoculación de los oocistos, ni los efectos detrimentales en ganancia de peso en forma tan marcada como en los pollos primoinmunizados. Esta resulta ser la explicación más viable, debido a que dentro de la ligera protección que confirieron las ET-ILK y SE-ILK, fueron precisamente las aves de los grupos primoinmunizados las que presentaron lesiones cecales menos severas.

En resumen, en este estudio se comprobó la existencia de una respuesta inmune inespecífica mediada por las linfocinas presentes en los sobrenadantes SE-ILK y ET-ILK, administradas en pollos de engorda inmunizados y posteriormente desafiados con una cepa de *E. tenella* al disminuir el grado de lesiones cecales. La disminución en ganancia de peso de las aves probablemente se debió más a las situaciones de manejo y estrés a que fueron sometidas las aves, que a la ausencia de una inmunidad protectora inespecífica.

Cuadro 5
EVALUACIÓN DEL EFECTO PROFILÁCTICO DEL ET-ILK Y SE-ILK ANTE UN
DESAFÍO POR *Eimeria tenella* MEDIANTE LA SEVERIDAD DE LESIONES CECALES
MACROSCÓPICAS EN POLLOS DE 21 DÍAS DE EDAD.^a

TRATAMIENTO *	MEDIA ± DS ^b
Testigo negativo	0.00 D
Testigo positivo	3.88 ± 0.31 A
SE-ILK + PIC	3.13 ± 1.19 C
SE-ILK	3.84 ± 0.42 A
ET-ILK + PIC	3.46 ± 0.94 B

^a Los pollos fueron inyectados i.p. con 0.5 ml de SE-ILK o ET-ILK al día de edad. Treinta minutos después, las aves de los grupos 3 y 5 fueron inmunizadas contra *E. tenella*. A los 14 días post-inyección todas las aves fueron desafiadas con *E. tenella*. Los pollos fueron sacrificados 7 días post-desafío para la evaluación de lesiones cecales por medio de la escala de Johnson y Reid. Se observó una reducción significativa en la media de lesiones cecales de pollos inmunizados y tratados con SE-ILK y ET-ILK, en comparación con el grupo testigo positivo y el grupo tratado sólo con SE-ILK.

^b Los valores de los tratamientos están expresados en media ± desviación estándar y los de diferente literal indican diferencias estadísticas significativas mediante la prueba de Duncan ($P < 0.05$).

- * Testigo negativo: grupo experimental no tratado-no desafiado.
- * Testigo positivo: grupo experimental no tratado-desafiado.
- * SE-ILK + PIC: grupo experimental inoculado con linfocinas de aves inmunes a *S. enteritidis*, primoinmunizado y desafiado con 30,000 y 15,000 oocistos esporulados de *E. tenella* respectivamente.
- * SE-ILK: grupo experimental inoculado con linfocinas de aves inmunes a *S. enteritidis* y desafiado con 15,000 oocistos esporulados de *E. Tenella*.
- * ET-ILK + PIC: grupo experimental inoculado con linfocinas de aves inmunes a *E. tenella*, primoinmunizado y desafiado con 30,000 y 15,000 oocistos esporulados de *E. tenella* respectivamente.

Cuadro 6
EVALUACIÓN DEL EFECTO PROFILÁCTICO DEL ET-ILK Y SE-ILK ANTE UN DESAFÍO POR *Eimeria tenella* MEDIANTE LA SEVERIDAD DE LAS LESIONES CECALES MACROSCÓPICAS EN POLLOS DE 21 DÍAS DE EDAD.^a

<i>Tratamiento*</i>	<i>Número de aves sin lesiones sobre total (%)^b</i>	<i>Número de aves con lesiones 1+ sobre total (%)^b</i>	<i>Número de aves con lesiones 2+ sobre total (%)^b</i>	<i>Número de aves con lesiones 3+ sobre total (%)^b</i>	<i>Número de aves con lesiones 4+ sobre total (%)^b</i>
Testigo negativo	50/50 (100)	0/50 (0)	0/50 (0)	0/50 (0)	0/50 (0)
Testigo positivo	0/50 (0)	0/50 (0)	3/50 (6)	13/50 (26)	34/50 (68)
SE-ILK + PIC	1/46 (2.17)	5/46 (10.86)	2/46 (4.34)	10/46 (21.73)	28/46 (60.86)
SE-ILK	0/47 (0)	0/47 (0)	1/47 (2.12)	6/47 (12.76)	40/47 (85.1)
SE-ILK + PIC	1/45 (2.22)	3/45 (6.66)	2/45 (4.44)	9/45 (20)	30/45 (66.66)

^aLos pollos fueron inyectados i.p. con 0.5 ml de SE-ILK o ET-ILK al día de edad. Treinta minutos después, las aves de los grupos 3 y 5 fueron inmunizadas contra *E. tenella*. A los 14 días post-inyección, todas las aves fueron desafiadas con *E. tenella*. Los pollos fueron sacrificados 7 días post-desafío para la evaluación de lesiones cecales.

^bCada valor representa el número de aves con o sin lesiones sobre el total (%).

* Testigo negativo: grupo experimental no tratado-no desafiado.

* Testigo positivo: grupo experimental no tratado- desafiado.

* SE-ILK + PIC: grupo experimental inoculado con linfocinas de aves inmunes a *S. enteritidis*, primoinmunizado y desafiado con 30,000 y 10,000 ooquistes esporulados de *E. tenella* respectivamente.

* SE-ILK: grupo experimental inoculado con linfocinas de aves inmunes a *S. enteritidis* y desafiado con 15,000 ooquistes esporulados de *E. tenella*.

* ET-ILK: grupo experimental inoculado con linfocinas de aves inmunes a *E. tenella*, primoinmunizado y desafiado con 30,000 y 10,000 ooquistes esporulados de *E. tenella* respectivamente.

Cuadro 7
EVALUACIÓN DEL EFECTO PROFILÁCTICO DEL ET-ILK Y SE-ILK MEDIANTE LA GANANCIA DIARIA DE PESO Y PESO FINAL EN POLLOS DE 21 DÍAS DE EDAD.^a

TRATAMIENTO ^a	PESO INICIAL ^b	PESO FINAL ^b	GANANCIA DE PESO ^b
Testigo negativo	18.79 ± 2.42 BC	285.44 ± 45.42 A	13.32 ± 2.29 A
Testigo positivo	19.89 ± 3.48 AB	258.40 ± 40.12 B	11.92 ± 1.98 B
SE-ILK + PIC	19.23 ± 3.01 B	253.84 ± 58.27 B	11.72 ± 2.89 BC
SE-ILK	20.86 ± 4.24 A	262.77 ± 47.84 B	12.10 ± 2.35 B
ET-ILK + PIC	17.52 ± 3.39 C	232.04 ± 63.99 C	10.71 ± 3.20 C

^a Los pollos fueron inyectados i.p. con 0.5 ml de SE-ILK o ET-ILK al día de edad. Treinta minutos después, las aves de los grupos 3 y 5 fueron inmunizadas contra *E. tenella*. A los 14 días post-inyección todas las aves fueron desafiadas con *E. tenella*. Los pollos fueron pesados 7 días post-desafío.

^b Los valores de los tratamientos están expresados en media ± desviación estándar y los de diferente literal indican diferencias estadísticas significativas mediante la prueba de Duncan ($P < 0.05$).

* Testigo negativo: grupo experimental no tratado-no desafiado.

* Testigo positivo: grupo experimental no tratado-desafiado.

* SE-ILK + PIC: grupo experimental inoculado con linfocinas de aves inmunes a *S. enteritidis*, primoinmunizado y desafiado con 30,000 y 15,000 ooquistes esporulados de *E. tenella* respectivamente.

* SE-ILK: grupo experimental inoculado con linfocinas de aves inmunes a *S. enteritidis* y desafiado con 15,000 ooquistes esporulados de *E. tenella*.

* ET-ILK + PIC: grupo experimental inoculado con linfocinas de aves inmunes a *E. tenella*, primoinmunizado y desafiado con 30,000 y 15,000 ooquistes esporulados de *E. tenella* respectivamente.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

El extracto crudo del sobrenadante obtenido a partir de LT de aves inmunizadas con *S. enteritidis* (SE-ILK) confirió protección ante desafíos con oocistos esporulados de *E. tenella* en pollos de engorda. al disminuir el grado de lesiones cecales y la recuperación de oocistos cecales.

El extracto crudo del sobrenadante obtenido a partir de LT de aves inmunizadas con *E. tenella* (ET-ILK) , aunque no impidió la colonización de *S. enteritidis* a nivel de tonsilas cecales, sí disminuyó la invasión a órganos causada por la infección de la bacteria en pollos de engorda de un día de edad.

La protección conferida por extractos crudos de sobrenadantes obtenidos a partir de LT de aves inmunizadas con *S. enteritidis* (SE-ILK) y *E. tenella* (ET-ILK) fue tan sólo ligera y prácticamente nula ante desafíos con *E. tenella* en pollos de engorda previamente inmunizados, al predominar lesiones cecales de grado 3+ y 4+, así como bajas ganancias de peso en las aves.

A pesar que no se observó un efecto protector importante contra la infección por *E. tenella* en pollos previamente inmunizados, el uso de linfocinas específicas y no específicas de especie constituye una herramienta importante dentro de la inmunoprolifaxis de las infecciones por *S. enteritidis*, *E. tenella* y posiblemente contra otros patógenos intracelulares, al quedar de manifiesto la protección inespecífica en las tres investigaciones realizadas.

Las linfocinas y citocinas en general son específicas de receptor celular, no de célula ni de especie antigénica.

LITERATURA CITADA

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J.S.: Celular and Molecular Immunology. 2nd ed. *Saunders press*. Philadelphia, U.S.A., 1994.
2. Bafundo, K. W.: Aplicación práctica de vacunas con ooquistes vivos en la avicultura comercial. Memorias del VIII Seminario Internacional de Patología Aviar. Universidad de Athens. Athens, Georgia, 1994. 258-296. *Universidad de Athens*, Athens, Georgia (1994).
3. Blanden, R. V., McKanses, G. B. and Collins, F. M.: Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid. *J. Exp. Med.* 124: 585-600 (1966).
4. Bohnhoff, M., Miller, C. P. and Martin, W. R.: Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. Factors which interfere with the initiation of infection by oral inoculation. *J. Exp. Med.* 120: 805-816 (1964).
5. Borges, G. M.: Panorama general de la coccidiosis en México. Memorias del Curso de Actualización Sobre Coccidiosis Aviar, ANECA. México, D.F., 1994. 22-26. *ANECA*. México, D.F. (1994).
6. Brett, B. F., Heffron, F. and Falkow, S.: Epithelial cell surfaces induces *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. *P. Sci.* 341: 940-943 (1989).
7. Cabriales, J. J.: Inmunoprofilaxis mediante la administración *in ovo* de linfocinas provenientes de linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella*, ante un desafío en pollos de engorda de un día de edad. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1996.

8. Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., Reid, W. M. and Yoder, H. W.: Disease of Poultry. 9th ed. *Iowa State University Press*. Iowa, USA., 1991.
9. Cheville, F. N.: Patología Celular. 1a ed. *Acribia*. Zaragoza, España, 1980.
10. Chu, Y. and Dieter, R.: The chicken macrophage response to carbohydrate-based irritants: temporal changes in peritoneal cell population. *Devel. Comp. Immun.* 12: 109-118 (1988).
11. Cooper, G. L., Nicholas, R. A. and Bracewell, C. D.: Serological and bacteriological investigations of chickens from naturally infected with *Salmonella enteritidis*. *Vet. Rec.* 152: 567-572 (1989).
12. Corrier, E. D., Nisbet, J. D., Hollister, G. A., Beier, R. C., Scalan, M. C., Hargis, B. M. and DeLoach, R. J.: Resistance against *Salmonella enteritidis* cecal colonization in Leghorn chicks by vent lip application of cecal bacteria culture. *P. Sci.* 73: 648-652 (1994).
13. Czuprynski, C. J., Brown, J. F., Young, K. M., Cooley, A. J. and Kurtz, R. S.: Effects of murine recombinant interleukin-1 on the host response to bacterial infection. *J. of Immun.* 140: 962-968 (1988).
14. Eckman, M. K.: Elementos de decisión para el diseño de un programa anticoccidial. Memorias del Curso de Actualización sobre Coccidiosis Aviar, ANECA. México, D.F., 1994. 41-43. *ANECA*. México, DF. (1994).
15. Eckroade, R. J., Benson, C. E. and Kradel, D. C.: The *Salmonella enteritidis* situation in poultry. Proc. 92nd Animal Meeting of the U.S. Animal Health Association. Santa Bárbara, California, 1988. 344-346. *Animal Health Association*. Santa Bárbara, California (1988).

16. Elsbach, P.: Degradation of microorganisms by phagocytic cells. *Rev. Infect. Dis.* 2: 106-128 (1980).
17. Fredicksen, T. L. and Sharma, J. M.: Purification of avian T cell growth factor and immune Interferon using gel filtration high resolution chromatpgraphy. In: Avian Immunology. Edited by: Weber W. I. and Ewert D. L. 207-212. *Alan R. Liss.* New York., U.S.A., 1987.
18. García, E. G.: Inmunoprofiláxis y caracterización parcial de linfocinas en la protección de la coccidiosis aviar. Tesis de Maestría. *Fac de Med. Vet. Y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1995.
19. Gast, R. K. and Beard, C. W.: Detection of *Salmonella* serogroup D- specific antibodies in the yolks of eggs laid by hens infected with *Salmonella enteritidis*. *P. Sci.* 70: 1273-1276 (1991).
20. Gast, R. K.: Aplicación de modelos experimentales para comprender y detectar las infecciones por *Salmonella enteritidis* en pollos. Memorias del Curso de Actualización sobre el Control y la Prevención de la Infección por *Salmonella enteritidis*, ANECA. México, D.F., 1994. 1-6. ANECA. México, D.F. (1994).
21. Gillinham, S.: Algunos aspectos del control de *Salmonella enteritidis*. Memorias de la XVII Convención Anual ANECA. Puerto Vallarta, Jal., 1992. 83-94. ANECA. México, D.F. (1992).
22. Gollapudi, S. S., Gupta, H.T. and Pérez, A.: Use of lymphokines in treatment of experimental intracellular abdominal abscess caused by *Bacteroides fragilis*. *Infect. Immunol.* 56: 2269-2372 (1988).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

23. Gómez, V. G.: Identificación de linfocinas en sobrenadante de esplenocitos de pollo estimulados con Concanavalina-A. Tesis de Licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1995.
24. Gordon, R. F.: Enfermedades de las Aves. 1a ed. *El Manual Moderno.* México, D.F., 1980.
25. Grabstein, K. H.: Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science* 232: 506-508 (1986).
26. Han, H. and Kaufmann, H. E.: The role of cell-mediated immunity in bacterial infections. *Rev. Infect. Dis.* 3: 1221-1250 (1981).
27. Heneidi, Z. A.: Reglamentación sanitaria para el control de la Salmonelosis Aviar en México. Memorias del Curso de Actualización sobre *Salmonella enteritidis* y *Campylobacter* en las Aves Domésticas. ANECA. México, D.F., 1994. 8-18. ANECA. México, D.F. (1994).
28. Hormaeche, C. E., Joysey, H. S., Ishar, M. and Stocker, B. A.: Immunity conferred by *Aro-Salmonella* live vaccines. *Microbial Pathogen* 10: 149-158 (1991).
29. Humphrey, T. J., Mead, G. C. and Rowe, B.: Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. *Epidemiol. Infect.* 100: 175-184 (1988).
30. Ibarra, B. y Cortés, R.: Interacciones de las coccidias y los anticoccidiales en la nutrición del pollo de engorda. Memorias del Curso de Actualización sobre Coccidiosis Aviar, ANECA. México, D.F., 1994. 31-40. ANECA. México, D.F. (1994).
31. Johnson, J. and Reid, W. M.: Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.*, 28: 30-36 (1970).

- 32.Kogut, M. H. and Slajchert, T.: T-Lymphocytes confer protection in chickens against *Eimeria tenella* by production of lymphokines. *Immun. and Inf. Dis.* 2: 69-79 (1992).
- 33.Kogut, M. H., Moyers, R. B. y DeLoach, J. R.: Las citocinas y sus interrelaciones funcionales: potenciación de la respuesta inflamatoria en el control de infecciones sistémicas por *Salmonella* en las aves. Memorias del Curso de Actualización Avances en Inmunología Aviar, ANECA. México, D.F., 1996. 8-12. ANECA. México, D.F. (1996).
- 34.Kotlarsky, I., Pope, K.D. and Attridge, S. R.: The *in vitro* proliferative response of lymphoid cells of mice infected with *Salmonella enteritidis* 11RX. *Immunol. Cel. Biol.* 67:19-29 (1989).
- 35.La Posta, V., Ashely, M. P. and Kotlarski, I.: Characterization of the effector cells responsible for tumor resistance in *Salmonella enteritidis* 11RX immunized mice. *Aust. Exp. Biol. Med. Sci.* 60:23-39 (1982).
- 36.Lee, E. H.: La inmunidad contra la coccidiosis: por qué funcionan las vacunas vivas. Curso de Actualización sobre Coccidiosis Aviar, ANECA. México, D.F., 1994. 62-65. ANECA. México, D.F. (1994).
- 37.Lee, L.R.: The public health impact of *Salmonella enteritidis* infections in the United States. Proc. 93rd Annual Meeting of the U.S., Animal Health Association. Santa Bárbara, California, 1989. 548-549. *Animal Health Association*. Santa Bárbara, California (1989).
- 38.Lillehoj, H. S. and Bacon, L. D.: Increase of intestinal intraepithelial lymphocytes expressing CD8 antigen following challenge with *Eimeria acervulina*. *Avian Dis.* 35: 294-301 (1991).

19. Lillehoj, H. S.: Immune responses to coccidia parasites. Proceedings of the Vith. International Coccidiosis Conference. University of Guelph. Guelph, Ontario, 1993. 11-18. *University of Guelph*, Guelph, Ontario, Canada (1993).
40. Lillehoj, H. S. and Trout, J. M.: Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Path.* 22: 3-31 (1993).
41. Lillehoj, H. S., Allen, P. C. and Ruff, M. D.: Comparative studies of humoral and cellular immune responses in two inbred strain of chickens showing different susceptibility to coccidiosis. Proceedings of the Georgia Coccidiosis Conference. Research in Avian Coccidiosis. University of Athens. Athens, Georgia, 1995. 420-429. *University of Athens*, Athens, Georgia (1995).
42. Long, P. L., Millard, B. J., Joyner, L. P. and Northon, C. C.: A guide to laboratory techniques used in study and diagnosis of avian coccidiosis. *Fol. Vet. Lat.* VI: 201-217 (1976).
43. Long, P. L., Johnson, J., McKenzie, M. E., Perry, E., Crane, M. S. and Murray, P. K.: Immunization of young broiler chickens with low level infections of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* or *E. maxima*. *Avian Pathol.* 15:271-278 (1986).
44. Lowenthal, J. W., Connick, T. E., McWaters, P. G. and York, J. J.: Development of cell immune responsiveness in the chicken. *Immun. and cell biol.* 72: 115-123 (1994).
45. Luginbuke, R. C. and Schlotzhaver, S.D.: SAS/STAT Guide for Personal Computers. 6th ed. *SAS Institute Inc.*, Cary, North Carolina. 555-573, 1987.
46. Mc Dougal, R. L. and Reid, M. W.: Coccidiosis in: Disease of Poultry. Edited by Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., Reid, W. M. and Yoder Jr, H. W. 780-787. *Iowa State University Press*. Ames, Iowa, 1991.

47. McDougal, L.: Testigo de la coccidiosis en el siglo XXI. Memorias del VIII Seminario Internacional de Patología Aviar. Universidad de Athens. Athens, Georgia, 1994. 275-284. *Universidad de Athens*. Athens, Georgia (1994).
48. McGruder, D. E., Ray, P. M., Téllez, I. G., Kogut, H. M., Corrier, D. E., DeLoach, J. R. and Hargis, B. M.: *Salmonella enteritidis* (SE) leucocyte-stimulated soluble factors: effects on increased resistance to *Salmonella* organ invasion in day old Leghorn chicks. *P. Sci.* 72: 2264-2271 (1993).
49. McGruder, E. D., Kogut, M. H., Corrier, D.E., DeLoach, J. R. and Hargis, B. M.: Comparison of prophylactic efficacy of *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines against *Salmonella enteritidis* organ invasion in neonatal Leghorn chicks. *Avian dis.* 39: 21-27 (1995).
50. McGruder, E. D., Ramírez, G. A., Kogut, M. H., Moore, R. W., Corrier, D. E., DeLoach, J. R. and Hargis, B. M.: *In ovo* administration of *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines confers protection to neonatal chicks against *Salmonella enteritidis* organ infectivity. *P. Sci.* 74: 18-25 (1995).
51. McKansas, G. B. and Wing, E. J.: Cellular immunity. *Prog. Allergy*. 11: 89-140 (1967).
52. Metcalf, D., Bagley, G. R., Johnson, G. R., Nicola, N. A., López, A. F. and Williamson, D. J.: Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice. *Blood* 68: 46-57 (1986).
53. Moreno, D. R., Quiróz, R. H. y Mosqueda, T. A.: Patogenicidad de algunas cepas de *Elmeria* aisladas de pollos en México. *Vet. Méx.*, 2: 1-7 (1980).

54. Moreno, D. R.: Pruebas preliminares de inmunización contra la coccidiosis de las aves. Memorias de la IX Convención Nacional Anual ANECA. Guanajuato, Gto., 1984. 16-26. ANECA. México, D.F. (1984).
55. Moreno, D. R.: Desventajas del empleo de vacunas contra la coccidiosis de las gallinas. Memorias de la X Convención Nacional Anual ANECA. Acapulco, Gro, 1985. 639-644. ANECA. México, D.F. (1985).
56. Moreno, D. R.: Enfermedades Parasitarias de las Aves, Torno II. 2a ed. *Fac. Med. Vet. Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México*, México, D.F. 1989.
57. Moreno, D. R.: Endoparásitos más frecuentes en las gallinas: Coccidiosis. Memorias de la III Jornada Médico Avícola. *Fac. Med. Vet. Zoot, U.N.A.M.*, México, D.F., 1992. 146-148. *Fac. Med. Vet. Zoot, U.N.A.M.* México, D.F. (1992).
58. Mosqueda, T. A.: Medidas sanitarias para prevenir la Tifoidea Aviar. Memorias del VII Curso sobre el control y erradicación de la Pulorosis y Tifoidea Aviar. Comisión permanente para el control y erradicación de Pulorosis y Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L., México, 1987. 22-32. *Asociación de Profesionistas en Ciencias Avícolas del Noreste*. Monterrey, N.L., México (1987).
59. Myers, T. J., Lillehoj, H. S. and Fetterer, R. H.: Partial purification and characterization of chicken interleukin-2. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 34:97-114 (1992).
60. Nakano, Y., Onozuka, K., Terada, Y., Shinomiya, H. and Nakano, M.: Protective effect of recombinant tumor necrosis factor- α in murine salmonellosis. *Infect. Immun.* 144: 1935-1941 (1990).
61. Nagaraja, K.V., Kim, C. J., Kumar, M. C. and Pomeroy, B. S.: Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry. *P. Sci.* 72: 243-254 (1991).

62. North, R. J.: The concept of the activated macrophage. *J. Immunol.* 121: 806-809 (1978).
63. Onago, H. and Ishli, T.: Leukocyte migration in chickens immunized with *Eimeria tenella*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 42:354 (1980).
64. Opitz, H. M.: Efectividad de las vacunas contra *Salmonella enteritidis*. Memorias del Curso de Actualización sobre el Control y Prevención de la Infección por *Salmonella enteritidis*. ANECA. México, D.F., 1994. 55-59. ANECA. México, D.F. (1994).
65. Padrón, N. M.: Generalidades sobre Pulorosis y Tifoidea Aviar. Memorias del VII Curso sobre el control y erradicación de la Pulorosis y Tifoidea Aviar. Comisión permanente para el control y erradicación de Pulorosis y Tifoidea Aviar Monterrey, N.L., México, 1987. 13-21. *Asociación de Profesionistas en Ciencias Avícolas del Noreste*. Monterrey, N.L., México (1987).
66. Padrón, N. M.: Infecciones Paratifoideas en el pollo de engorda. *Avic. Prof.* 6:123-130 (1989).
67. Paul, C., Shalala, K. and Warren, M.: Adoptive transfer of murine host protection to salmonellosis with T-cells growth factor dependent, *Salmonella*-specific T-cells line. *Infect. Immun.* 48: 40-43 (1985).
68. Paul, W. E.: Fundamental Immunology. 3rd ed. *Raven Press*. New York, U.S.A., 1993.
69. Rampling, A., Upson, L., Ward, L., Anderson, J., Peters, E. and Rowe, B.: *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection of broiler chickens: a hazard to public health. *Lancet* 2: 436-438 (1989).

70. Ray, P. M., McGruder, E., Kogut, M. H. and Hargis, B. M.: The specificity of *Salmonella enteritidis* immunolymphokine and its protection against other *Salmonella* serovars in day-old Leghorn chicks. *J. of Immun.*, 150: 315-320 (1993).
71. Reek, G. N., Joseph, W., Becker, W., Cunningham, B. A., Gunther, G. R. and Wang, J. L.: Relationships between the structure and activities of Concanavalina-A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 234: 369-382 (1974).
72. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D.: Immunology. 3th ed. *Mosby Press*. London, England, 1993.
73. Rook, G.: Cell-mediated immune reactions. In: Immunology. Edited by: Roitt, I. and Male, D. 320-327. *Mosby Press*. London, England (1993).
74. Rose, M. E.: Immune responses to *Eimeria* infections. Proceedings of the Georgia Coccidiosis Conference. University of Athens. Athens, Georgia, 1995. 470-481. *University of Athens*, Athens, Georgia (1995).
75. Rubio, G.: Utilidad de las necropsias y score de lesiones en el diagnóstico de coccidiosis aviar. Memorias del Curso de Actualización sobre Coccidiosis Aviar, ANECA. México, D.F., 1994. 87-93. *ANECA*. México, D.F. (1994).
76. Sambhara, S. R. and Belden, E. L.: Bovine interleukine-2: Production and characterization. *Vet. Immun. Immunopathol.* 18:165-172 (1988).
77. Sharma, J. M.: Avances recientes en la inmunología aviar y la inmunomodulación. Memorias de la XIX Convención Nacional Anual ANECA. Puerto Vallarta, Jalisco, 1994. 297-300. *ANECA*. México, D.F. (1994).

78. Shinomiya, N. S., Tsuru, Y., Katsura, S. and Nomoto, K.: Enhanced resistance against *Listeria monocytogenes* achieved by pretreatment with granulocyte colony-stimulating factor. *Infect. Immun.* 59:4740-4743 (1991).
79. Stiff, M. L. and Bafundo, K. W.: Devolement of immunity in broilers continuously exposed to *Eimeria*. *Avian Dis.* 37: 295-301 (1993).
80. St. Louis, M. E., Morse, D. L., Potter, M. E. and Blake, B. A.: The emergence of grade A eggs a major source of *Salmonella enteritidis* infections. New Publications For the Control of Salmonellosis. *J. Am. Med. Assoc.* 259: 2103-2107 (1988).
81. Street, N. E. and Mosmann, T. R.: Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEBJ.* 5: 171-177 (1991).
82. Téllez, I. G., Kogut, H., Hargis, B.: Immunoprophylaxis of *Salmonella enteritidis* infection by lymphoquines in Leghorn chicks. *Avian Dis.* 37:1062-1070 (1993).
83. Tizard, I.: *Inmunología Veterinaria*, 3a ed. *Editorial Interamericana*. México, 1989.
84. Todd, C. D.: Poultry-associated foodborn disease-Its occurrence, cost, sources and prevention. *J. Food Prot.* 43: 129-139 (1980).
85. Trigo, T. F. y Mateos, P. A.: *Patología General Veterinaria*. 1a ed. *Fac. de Med. Vet y Zoot., U.N.A.M.*, México, D.F., 1986.
86. Waltman, W. D., Horne, A. M., Pickie, C. and Johnson, D. C.: Prevalence of *Salmonella enteritidis* in spent hens. *Avian Dis.*, 36: 252-255 (1992).
87. Wolfe, S. A., Tracey, D. E. and Henney, C. S.: Induction of natural killer cells by BCG. *Nature* 262: 584-586 (1976).


88. Wong, R. A., Téllez, I. G., Isibashi, A., Ortíz, N.V., Kogut, H. M., McGruder, D. E. y Hargis, B. M.: Evaluación de linfocinas obtenidas de aves inmunizadas con *Salmonella enteritidis* en la inmunoprofilaxis contra la infección de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda. Memorias de la XIX Convención Nacional Anual ANECA. Puerto Vallarta, Jalisco, 1994. 375-377. ANECA. México, D.F. (1994).
89. Wong, G. R.: Inmunoprofilaxis mediante linfocinas aplicadas *in ovo* y en pollos de engorda contra la infección por *Salmonella gallinarum*. Tesis de Maestría. *Fac. de Med. Vet y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1996).
90. Zhang, S., Lillehoj, H. S. and Ruff, M. D.: Chicken Tumor Necrosis Factor: *In vitro* production by macrophages stimulated with *Eimeria tenella* or bacterial lipopolysaccharide. *P. Sci.* 74: 1304-1310 (1995).
91. Zar, J.: Bioestadistical analysis, 2nd ed. *Prentice-Hall Inc.*, Englewood Cliffs, N.J., 351-384, 1984.

Porqué Señor, te pido trabajo,
y no tiempo de descanso,
porqué te pido problemas
y no soluciones para los que ya tengo,
porqué me preocupa tanto de mis cosas
y no delego responsabilidades a los que me rodean,
porqué te pido un camino con obstáculos
y no uno limpio y tranquilo,
porqué te pido tiempos difíciles,
porqué te ofrezco mi esfuerzo para demostrarte que
estoy agradecido, y no sólo me acuerdo de Ti
cuando estoy desesperado.

*Porqué cargo responsabilidades grandes y no miro
indiferente el paso de los días.
Porqué en mí, es en quien se notan los errores,
y no se perdonan con la facilidad de otros.
Porqué tengo que ir abriendo brecha, y no puedo
utilizar caminos ya trazados; yo no puedo dar respuesta
a todas mis dudas, pues sólo Tú las sabes, pero a pesar
de ésta y de muchas otras cosas jamás voy a intentar
salirme del camino que me tienes ya trazado y que voy
descubriendo día con día, así como tampoco voy a
eludir uno sólo de los problemas que me mandes.
Porque dentro de todas mis dudas, sé que este camino
es el único que me va a llevar a convertirme
en un HOMBRE.*

*Sé que es el camino más difícil,
pero es también el que más vale la pena, y el único
que se puede voltear a ver con orgullo
cuando se está ya al final de él.
Las únicas dos armas que tengo para tratar de cruzarlo
son la voluntad y la fe, la fe en Ti y en mí, se que si
las manipulo bien podré llegar al final.*

Veamos hasta donde puedo llegar . . .

 *Luis Alfonso Camacho*