

Actividad del interferón proveniente de linfocitos esplénicos de pollo de engorda durante la infección experimental primaria con *Eimeria tenella*

Marco Antonio Juárez Estrada*
Xochitl Hernández Velasco*
Guillermo Tellez Isaias*

Abstract

Two studies were carried out to evaluate the interferon (IFN) secretion pattern during primed experimental infection with *Eimeria tenella*. In the first experiment, the primary response of splenic lymphocytes T (LT) was evaluated in 20 day old broiler chickens (Hubbard x Hubbard) challenged with 1×10^4 *E. tenella* sporulated oocysts. Nylon wool columns were used to isolate LT in four spleen pools on days 1, 3, 5, 7 and 9 post-infection (pi). In the second experiment, the primary response was also evaluated in LT isolated from individual spleens using Ficoll Hypaque gradients. Challenged and control bird spleen pools were prepared separately. In order to detect the presence of IFN, viruses of Newcastle disease and infectious bursal disease were used in antiviral assays. In the first experiment on day 5 pi, IFN levels in the challenged group reached a different peak in contrast to the control group, it decreased on day 7 pi, and was increased again on day 9 pi ($P < 0.05$). Outputs of the second experiment resembled the first one but reached higher levels. The IFN secretion pattern of in vitro stimulated LT after challenge with *E. tenella* was different to the secretion pattern of in vitro stimulated LT without challenge with *E. tenella*. Antiviral assays detected qualitatively and quantitatively avian IFN secreted by in vitro stimulated LT. IFN secretion patterns detected with different LT isolation techniques after the primary infection had a similar performance.

KEY WORDS: BROILER, INTERFERON, T LYMPHOCYTES, CELLULAR IMMUNITY, *Eimeria tenella*, ANTIVIRAL ASSAYS.

Resumen

Con la finalidad de evaluar el interferón (IFN) secretado durante la infección experimental primaria con *Eimeria tenella* se realizaron dos estudios. En el primero se evaluó la respuesta primaria en linfocitos T (LT) esplénicos de 40 pollos de engorda (Hubbard x Hubbard) de 20 días de edad, desafiados con 1×10^4 ooquistes esporulados de *E. tenella*. Los LT se aislaron a partir de cuatro bazos en dos mezclas celulares con la técnica de columnas de fibra de nailón a los días 1, 3, 5, 7 y 9 posinoculación (pi). En el segundo experimento de respuesta primaria, el aislamiento de los LT se efectuó con la técnica de Ficoll Hypaque con cultivos celulares esplénicos individuales provenientes de 30 aves. En cada uno de los dos experimentos se utilizó la mitad de aves del grupo desafiado como aves testigo sin desafiar. Para evidenciar el IFN presente cada día pi se empleó un ensayo antiviral con el virus de la enfermedad de Newcastle y la infección de la bolsa de Fabricio. En el primer experimento se observó que el IFN del grupo desafiado alcanzó un pico al día 5 pi que difirió ($P < 0.05$) del grupo testigo, bajó ligeramente al día 7 pi ($P < 0.05$) y se incrementó al día 9 pi ($P < 0.05$). En el segundo experimento, se determinó un comportamiento similar al primero, pero con títulos más altos. El patrón de liberación de IFN de los LT estimulados in vitro después del desafío con *E. tenella* es diferente al patrón de liberación de los LT estimulados in vitro pero sin el desafío con *E. tenella*. Los ensayos antivirales utilizados detectaron cualitativa y cuantitativamente el IFN aviar secretado por LT estimulados in vitro. Los patrones de liberación de IFN detectado con las dos técnicas de aislamiento de LT después de la infección primaria con *E. tenella* se comportaron de manera semejante.

PALABRAS CLAVE: POLLO DE ENGORDA, INTERFERÓN, LINFOCITOS T, INMUNIDAD CELULAR, *Eimeria tenella*, ENSAYO ANTIVIRAL.

Recibido el 22 de octubre de 1998 y aceptado el 11 de enero de 1999.

*Departamento de producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

Introducción

La coccidiosis aviar es la enfermedad parasitaria de mayor importancia económica, es producida por un protozooario intestinal perteneciente al género *Eimeria*. En México, la especie más problemática es *E. tenella*, debido a que causa lesiones en ciegos, pérdida de peso, retraso en el crecimiento y ocasionalmente la muerte.^{1,2} El impacto de la coccidiosis está determinado por la patogenicidad de la cepa, baja inmunogenicidad y susceptibilidad de las aves.^{1,2,3,4}

La protección inmune humoral tiene menor importancia que la protección inmune celular.^{5,6} Se ha observado que las aves bursectomizadas desarrollan una respuesta inmune normal hacia las coccidias, lo que no sucede en aves timectomizadas que presentan incremento en la severidad de las lesiones, destacando la mayor participación en la respuesta de protección de los linfocitos T (LT) que de los linfocitos B (LB).⁷

Se ha observado que las células esplénicas y linfocitos sanguíneos de aves inmunes a *Eimeria* spp transfieren resistencia a aves no inmunes.^{8,9} Además, la proliferación *in vitro* de LT se ve aumentada en respuesta a la infección con *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. maxima*.^{10,11,12}

Los estudios efectuados en mamíferos han mostrado que la inmunidad contra diferentes protozoarios intracelulares es regulada por LT y requiere la producción de citocinas como el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).¹³

El IFN- γ ha mostrado su importancia en la defensa contra la infección por leishmania,¹⁴ plasmodium¹⁵ y toxoplasma.¹⁶ El IFN- γ se encuentra también implicado en el control de las infecciones por *Eimeria*.¹⁷ El IFN- γ recombinante de bovino inhibe la invasión de esporozoitos de *E. tenella* y *E. bovis* a un cultivo celular de riñón bovino.¹⁸⁻²⁰ En un modelo de investigación murino, la depleción específica de IFN- γ endógeno provocó una exacerbación de lesiones en la infección primaria con *E. vermiformis*.²¹ En pollo de engorda, las células esplénicas de aves inmunizadas contra *E. tenella* o *E. maxima* muestran una producción específica de IFN.^{12,22} Recientemente, en algunas especies aviares ha sido evidente la existencia de IFN de ambos tipos I y II, los cuales han mostrado capacidad de inhibición viral.²³⁻²⁵

Sin embargo, el IFN- γ aviar al igual que su contraparte en mamíferos, puede ser distinguido del IFN- $\alpha\beta$ por su capacidad adicional para activar en macrófagos la producción de óxido nítrico.²⁴⁻²⁶ El IFN- γ actúa como inmunorregulador de citocinas, tiene actividad antiviral y antitumoral. Cuando se encuentra simultáneamente con TNF- α manifiesta un poderoso sinergismo en actividad citolítica.^{22,27,28,29,30}

Algunos autores han observado que el sobrenadante (SN) de LT estimulados *in vitro* con concaavalina-A (con-A) tiene un efecto antiviral atribuible al IFN.^{31,32} Las células esplénicas incrementan la liberación de IFN- γ después

de una infección con coccidias.^{12,32,33} Sin embargo, no se ha determinado de manera precisa el perfil de secreción de IFN- γ después del desafío con *E. tenella*.

El IFN- γ se ha descrito como una de las citocinas más importantes de la inflamación y la respuesta inmune celular durante la infección con *E. tenella*, por lo que es importante conocer su importancia en este tipo de infecciones,^{6,17,19,20,34,35} determinando la cantidad y tiempo de permanencia en el ave.^{20,22,30,35,36} Con *E. acervulina* se ha estudiado únicamente al día seis *post* y con *E. tenella* únicamente en LT de sangre periférica.³³ En el presente estudio se investigó la actividad de los LT esplénicos días después de la infección con *E. tenella*, para determinar su producción de IFN en respuesta a la estimulación *in vitro* con Con-A. La actividad de IFN en los SN fue medida por el grado de inhibición en la réplica de los virus de la enfermedad de Newcastle (VENC) y del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

Material y Métodos

Animales de experimentación

Se recibieron 105 pollos de engorda Hubbard x Hubbard* de un día de edad, los que fueron agrupados aleatoriamente en baterías de 5 niveles (1 X 1.5 m) con calefacción eléctrica en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se les suministró agua y alimento *ad libitum* con 22% de PC y 2900 Kcal de energía metabolizable/kg sin anticoccidiano.

Inóculo parasitario

Para la inmunización y desafío se utilizó una cepa de *E. tenella* de mediana patogenicidad, procedente de una granja de pollo de engorda ubicada en el estado de Querétaro, México. La cepa se purificó a través de la metodología descrita por Stephan *et al.*³⁷ Los ooquistes fueron cosechados, esporulados y almacenados como lo describen Long *et al.*¹

Inóculo viral

Para las pruebas de evaluación del IFN sobre la inhibición de muerte celular se utilizaron dos virus diferentes. La cepa velogénica viscerotrópica (Chimalhuacán) del VENC fue cosechada en embrión de pollo, se purificó en fibroblastos de embrión de pollo (FEP) y se inoculó a un título de 100 DICC 50%/0.1 ml de acuerdo con la técnica descrita por Shat y Purchase.³⁸ Se utilizó también la cepa vacunal de virulencia intermedia (Lukert) del VIBF, la cual se cosechó a partir de FEP y se inoculó a un título de 100 DICC 50%/0.05ml.³⁸

* Incubadora comercial (Cuernavaca, Morelos, México)

Cultivo celular de FEP

Los FEP se obtuvieron de acuerdo con la técnica de Shat y Purchase,³⁸ a partir de embriones libres de patógenos específicos (LPE). La concentración final se ajustó a 1.5×10^5 células/mL. Se agregaron 100 μ l/pozo de esta suspensión a una placa de 96 pozos (Nunc F96) y se dejaron incubar a 37.5°C y 5% de CO₂ hasta el establecimiento del monoestrato celular.^{31,32,39,40}

Diseño experimental del primer estudio (técnica de purificación por columnas de fibra de nailon)

Las aves se dividieron en dos grupos, el grupo experimental desafiado con *E. tenella* compuesto de 40 aves y el grupo testigo de 20 aves sin desafiar. Al día 20 de edad el grupo experimental fue desafiado con una dosis de 1×10^4 ooquistes de *E. tenella*/1ml/ave, el grupo testigo recibió únicamente 1ml/tampón amortiguado/ave. A los días 1, 3, 5, 7 y 9 pi, ocho aves del grupo experimental y cuatro del grupo testigo se sacrificaron por dislocación cervical. Posteriormente, para realizar cultivos celulares, los bazos de las aves desafiadas se colectaron en dos grupos de cuatro y los bazos de las aves testigo en un grupo de cuatro. La purificación de LT se realizó con columnas de fibra de nailon y se obtuvieron los SN de cada grupo. El contenido de IFN de los SN obtenidos se estimó utilizando con los ensayos antivirales.

Obtención de SN de los cultivos de linfocitos purificados con la técnica de columnas de fibra de nailon

La obtención de células de bazo, aislamiento de LT, producción y preparación de citocinas, se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Kogut y Slajchert,³⁰ y Tellez *et al.*⁴¹, con la modificación de que los bazos de las aves después de colectarlos y macerarlos asépticamente se pasaron a través de bolsas de tela de organza (4 x 4 cm) utilizando solución balanceada de Hank's (HBSS).** Se efectuó una sola suspensión celular (6×10^6 células/mL) en medio RPMI 1640 suplementado.^{30,42}

Aislamiento de linfocitos T

El aislamiento de LT se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Kogut y Slajchert.³⁰ La suspensión celular se ajustó a 5×10^6 células viables/ml con un máximo de 5% de macrófagos en medio RPMI 1640 sin suero.

** Sigma Chemical St Louis MO.

*** Ficoll Hypaque, Sigma Chemical St Louis MO.

Diseño experimental del segundo estudio (técnica de purificación por gradientes de Ficoll Hypaque)^{*}**

Al día 20 de edad el grupo experimental (30 aves) se desafió con una dosis de 1×10^4 ooquistes de *E. tenella*/1ml/ave y el grupo testigo (15 aves) recibió únicamente 1ml/tampón amortiguado/ave. A los días 1, 3, 5, 7 y 9 pi, se sacrificaron por dislocación cervical seis aves del grupo experimental y tres del grupo testigo. Los bazos se procesaron en forma individual y los cultivos esplénicos se sometieron a la metodología descrita para la obtención de SN por medio de la purificación de LT con gradientes de Ficoll Hypaque. La evaluación del contenido de IFN en los SN se efectuó con los ensayos antivirales.

Obtención de SN de los cultivos de linfocitos purificados con la técnica de gradientes de Ficoll Hypaque

La obtención de células esplénicas y preparación de citocinas se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Coligan *et al.*,⁴³ y Weiler y Von Bülow.^{44,45} Los bazos de las aves se colectaron y maceraron asépticamente en forma individual. Las células se pasaron a través de tela de organza utilizando HBSS.

Aislamiento de linfocitos T

La purificación de LT a partir de células esplénicas de una sola ave se efectuó con la técnica descrita por Coligan *et al.*,⁴³ y Weiler y Von Bülow.^{44,45} La suspensión celular de LT se ajustó individualmente (5×10^6 células/ml).^{30,42}

Preparación de las citocinas

Las citocinas se obtuvieron a partir de los LT purificados con las dos diferentes técnicas por medio de la metodología empleada por Kogut y Slajchert,³⁰ y Weiler y Von Bülow.^{44,45} Los SN obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su evaluación con los ensayos antivirales.^{30,32}

Ensayo antiviral

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Prowse y Pallister,¹² Breed *et al.*³³, y Rubinstein *et al.*⁴⁶

Evaluación del ensayo antiviral

La calificación para cada virus se efectuó cuando el testigo positivo de cada uno de ellos mostró efecto citopático específico (CPE) de acuerdo con lo descrito por Castañón³⁹ para el VENC, y por Shat y Purchase³⁸ para el VIBF. Las células con CPE fueron determinadas visualmente, según lo descrito por Dijkmans *et al.*,^{27,40} Martín *et al.*,³² y Rubinstein *et al.*⁴⁶ El título de IFN se

determinó con base a Logaritmo base 2 (\log_2), de acuerdo con la titulación del control positivo.^{12,32,40} Los resultados se presentan como título de IFN obtenido de la dilución \log_2 , en la que el SN específico mostró 100% de protección contra el virus. Para cada SN, los títulos se expresan como el promedio de tres réplicas de cultivo celular de FEP.^{12,31}

Análisis estadístico para ambos estudios

Todos los títulos de IFN \log_2 obtenidos de los ensayos antivirales, fueron transformados con raíz cuarta; para determinar diferencias entre grupos desafiados y sin desafiar, se empleó análisis de varianza (ANDEVA).⁴⁷ Para determinar diferencias entre las medias se utilizó la prueba de Dunnett a través del paquete estadístico SAS*[®] con una significancia estadística de $P < 0.05$.⁴⁸ Para determinar diferencias entre los títulos obtenidos de LT, purificados con columnas de fibra de nailon y los títulos obtenidos de LT, purificados con Ficoll Hypaque se utilizó un ANDEVA [VIBF (columnas) contra VIBF (Ficoll) y VENC (columnas) contra VENC (Ficoll)].⁴⁷ Para valorar diferencias entre las medias se utilizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$).⁴⁸ Para determinar diferencias de los títulos entre los diferentes días de muestreo pi para cada ensayo antiviral (VIBF y VENC), se utilizó ANDEVA.⁴⁷ La comparación múltiple de medias se efectuó con la prueba de Duncan ($P < 0.05$).^{47,48}

Resultados

Primer estudio experimental

En la infección primaria con *E. tenella* donde se utilizaron LT purificados con columnas de fibra de nailon, se observó un patrón de secreción de IFN distinto al presentado por el grupo testigo. En la evaluación antiviral con el VIBF se observó que el IFN comenzó a incrementarse a partir del día 3 pi y hasta el día 5 pi, resultó estadísticamente diferente ($P < 0.05$) al grupo testigo; al día 7 pi se observó una baja de IFN que, aunque fue diferente al grupo testigo ($P < 0.05$), logarítmicamente fue menor al nivel observado el día 5 pi. Sin embargo, al día 9 pi el nivel de IFN se incrementó ligeramente ($P < 0.05$) (Figura 1).

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

En el patrón de secreción de IFN cada día pi con 10 000 ooquistes de *E. tenella*/ave, se determinó que los títulos obtenidos con el ensayo del VIBF al día 5 pi no difieren con los del IFN de referencia, ni con los títulos a los días 3 y 9 pi del grupo infectado; en tanto que fueron diferentes ($P < 0.05$) con respecto a los del grupo testigo sin infectar y los observados al día 1 y 7 pi del grupo infectado. Los títulos del grupo infectado obtenidos al día 3 y 9 pi fueron semejantes entre sí, pero diferentes

Cuadro 1

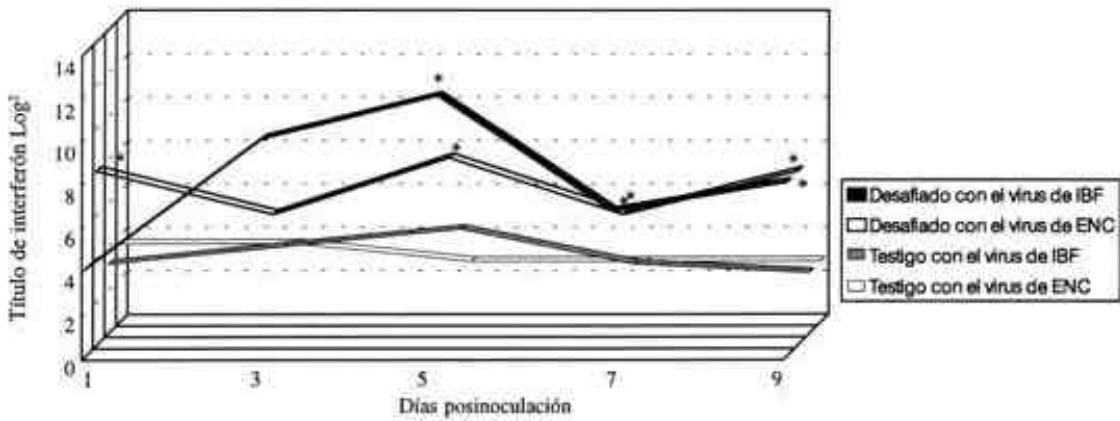
COMPARACION DE PROTECCION ANTIVIRAL EN SOBRENADANTES DE LINFOCITOS ESPLENICOS AISLADOS CON COLUMNAS DE FIBRA DE NAILON EN DOS ENSAYOS ANTIVIRALES A LOS DIAS 1, 3, 5, 7 Y 9 DÍAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN PRIMARIA CON *Eimeria tenella*

Grupos de tratamiento	Medias en logaritmo base 2 \pm desviación estándar			
	Días	Número	VIBF ^c	VENC ^c
	posinoculación	de aves		
Interf. Ref. ^b	-	-	16.00 \pm (1.32) ^a	16.00 \pm (2.21) ^a
Infectado	1	8	4.00 \pm (0.00) ^{de}	7.00 \pm (0.00) ^b
Infectado	3	8	10.00 \pm (6.57) ^{bc}	6.00 \pm (2.19) ^{bc}
Infectado	5	8	12.00 \pm (4.38) ^{ab}	6.67 \pm (2.06) ^{bc}
Infectado	7	8	6.67 \pm (2.06) ^{cd}	6.00 \pm (2.89) ^c
Infectado	9	8	8.00 \pm (0.00) ^{bc}	8.00 \pm (4.38) ^c
Sin infectar	-	8	3.00 \pm (1.09) ^e	3.33 \pm (1.03) ^d

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

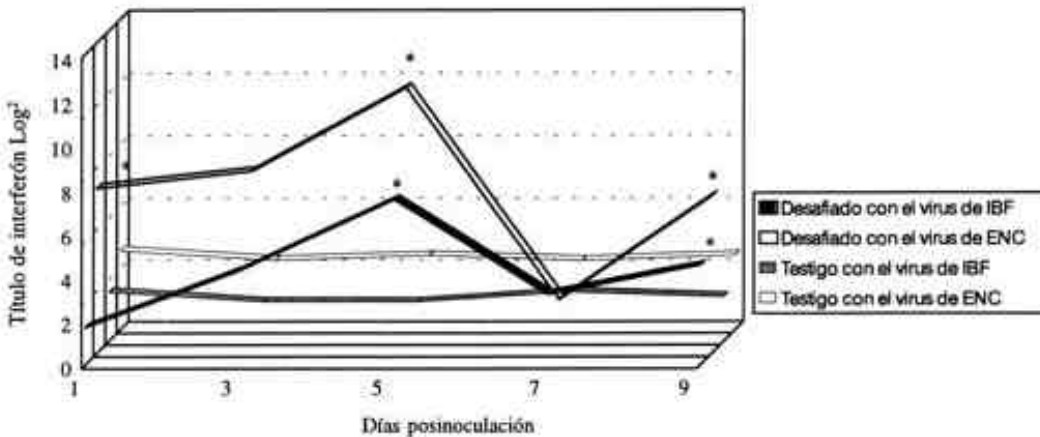
^b Como control positivo se utilizó interferón de referencia (1st Ifn Ref prep Inter Chick 67/18).

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



Los títulos de interferón obtenidos del grupo desafiado se compararon en cada ensayo antiviral con los del grupo testigo por medio de la prueba de Dunnet. Las diferencias estadísticas significativas se expresan con asterisco. ($P < 0.05$).

Figura 1. Producción de interferón por linfocitos esplénicos purificados en columnas de fibra de nailon, provenientes de la infección primaria con *Eimeria tenella* en pollo de engorda.



Los títulos de cada ensayo antiviral del grupo desafiado se compararon con los del grupo testigo a través de la prueba de Dunnet. Las diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) se encuentran expresadas con asterisco.

Figura 2. Producción de interferón por linfocitos esplénicos purificados en gradientes de Ficoll Hypaque, durante la infección primaria con *Eimeria tenella* en pollo de engorda.

($P < 0.05$) a los obtenidos al día 1 pi, al IFN de referencia y a los obtenidos en el grupo testigo sin infectar (Cuadro 1).

El título obtenido al día 1 pi fue diferente ($P < 0.05$) al obtenido para el resto de los días pi y al del IFN de referencia. Sin embargo, no fue diferente al título determinado al día 7 pi y al del grupo testigo sin infectar (Cuadro 1).

En el patrón de liberación de IFN por medio de los títulos obtenidos cada día pi con el ensayo del VENC, se determinó que el título obtenido al día 1 pi fue diferente ($P < 0.05$) respecto al resto de los SN; sin embargo, no fue distinto al título del día 3 y 5 pi del grupo infectado. Los títulos obtenidos los días 3, 5, 7 y 9 pi no fueron diferentes entre sí. Sin embargo, sí difirieron ($P < 0.05$) con respecto a los dos grupos testigo (Cuadro 1).

Segundo estudio experimental

Los linfocitos purificados a través de gradientes de Ficoll Hypaque en la infección primaria con *E. tenella*, presentaron una cinética de secreción de IFN diferente a la mostrada por los SN del grupo testigo de linfocitos de aves sin infectar. El patrón de secreción cada día pi se comportó similar al observado en el primer estudio. En la evaluación con el VIBF, los niveles de IFN comenzaron a incrementarse desde el día 1 pi hasta el día 5 pi fecha en la cual fue diferente ($P < 0.05$) respecto de su grupo testigo. Al día 7 pi se observó una baja de nivel de IFN a punto basal, posteriormente este nivel se elevó ligeramente al día 9 pi (Figura 2).

En el ensayo antiviral con el VENC se observó un comportamiento semejante al patrón de secreción determinado con el ensayo del VIBF; sin embargo, al día

Cuadro 2

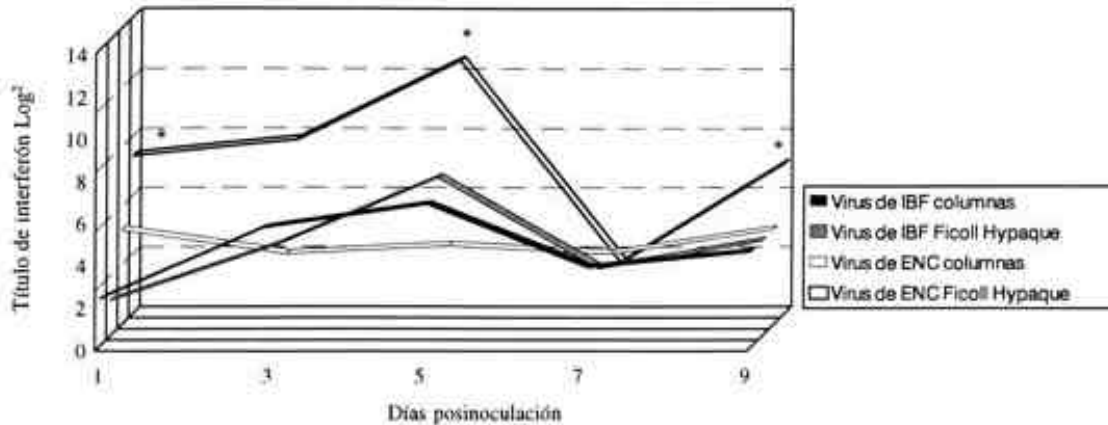
RESPUESTA DE LA PROTECCION ANTIVIRAL EN SOBRENADANTES DE LINFOCITOS ESPLENICOS AISLADOS CON GRADIENTES DE FICOLL HYPaque a LOS DÍAS 1, 3, 5, 7 Y 9 DÍAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN PRIMARIA CON EIMERIA TENELLA

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

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

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

^c Valores dentro de cada columna, seguidos por diferente literal, son significativamente diferentes, P<0.05 (Duncan).



Los títulos de cada ensayo antiviral del primer experimento se compararon con los títulos del mismo ensayo antiviral del segundo experimento por medio de la prueba de Turkey. Las diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) se expresan con asterisco.

Figura 3. Comparación de interferón determinado con el mismo ensayo antiviral en linfocitos purificados en columnas de fibra de nailon, o en gradientes de Ficoll hypaque durante la infección primaria con *Eimeria tenella*.

1 pi el ensayo del VENC presentó una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) respecto de su grupo testigo (Figura 2). En el patrón de liberación de IFN cada día pi con *E. tenella*, se determinó que el título del grupo testigo sin infectar y los del día 1 y 3 pi del grupo infectado fueron diferentes ($P < 0.05$) al título del IFN de referencia. El título del día 1 pi fue diferente al obtenido el día 9 pi (Cuadro 2).

Al determinar el patrón de secreción de IFN cada día pi con el ensayo del VENC, se observó que los títulos del grupo testigo sin infectar y los del día 7 pi no difirieron entre sí, pero sí fueron diferentes ($P < 0.05$) al resto de los SN evaluados (Cuadro 2).

Al comparar las dos técnicas de purificación de LT durante la infección primaria con *E. tenella*, se determinó que los títulos del ensayo antiviral con el VENC de LT purificados con columnas de fibra de nailon fueron

diferentes ($P < 0.05$) los días 1 y 5 pi, respecto de los títulos de los SN obtenidos de LT purificados con gradientes de Ficoll Hypaque. Los títulos determinados con el ensayo antiviral del VIBF a partir de SN obtenidos con las dos distintas técnicas de purificación no difirieron entre sí (Figura 3).

Discusión

Los dos ensayos antivirales empleados para detectar la actividad antiviral de IFN en los SN obtenidos dieron resultados satisfactorios, ya que además de detectar cualitativamente el IFN, éste también se pudo determinar cuantitativamente.

En los estudios efectuados por Breed *et al.*³³ se observó que al día ocho de la infección primaria con *E. tenella*, el efecto antiviral del IFN- γ presente en SN obtenidos de linfocitos sanguíneos estimulados con Con-A tiene un 90% de correlación con la producción de óxido nítrico (NO₂) de macrófagos activados con los mismos SN. Debido a que la producción específica de NO₂ por macrófagos activados es exclusiva del IFN- γ no se puede descartar su participación en la actividad antiviral observada en el presente estudio.

En los SN de los cultivos de LT purificados con las dos diferentes técnicas se observó un patrón similar en la liberación de IFN, con un incremento agudo transitorio al día 5 pi. Sin embargo, al evaluar los SN con las dos técnicas antivirales se obtuvo un mayor título de IFN en los SN de LT aislados con la técnica de Ficoll Hypaque, en comparación con el obtenido en los SN de LT aislados con columnas de fibra de nailon (Figura 3). Las cantidades obtenidas con Ficoll fueron más altas de lo esperado, ya que con esta técnica se esperaba obtener un nivel más bajo de IFN, debido a que Weiler y Von Bülow⁴⁵ han informado que los componentes del Ficoll Hypaque (polisucrosa, diatriozato de sodio) son tóxicos para LT y disminuyen su capacidad para producir citocinas. Otro factor potencial involucrado en la baja producción de los LT aislados con Ficoll Hypaque es posiblemente la composición celular obtenida. Maheswaran *et al.*⁴⁹ han observado que la respuesta hacia algunos mitógenos varía de acuerdo con la composición heterogénea del cultivo celular. Shaefer *et al.*⁵⁰ mencionan que los monocitos no activados aislados con Ficoll Hypaque pueden ejercer supresión sobre LT estimulados y, por lo mismo, abatir la producción de citocinas. Lee *et al.*⁵¹ y Onaga y Tajima⁵² mencionan una supresión del mismo tipo. Sin embargo, con el ensayo antiviral del VENC se detectó mayor actividad de IFN en las células aisladas con Ficoll que la detectada en las células aisladas con columnas de fibra de nailon, hallazgo que concuerda a su vez con lo investigado por Kaspers *et al.*,³¹ quienes observaron que con Ficoll Hypaque además de obtener linfocitos, puede haber cierta cantidad de monocitos activados que podrían interrelacionar en retroalimentación positiva con citocinas como TNF- α , TNF- β , IL-12 e IFN- γ .

Una diferencia observada en los ensayos antivirales con los SN obtenidos de linfocitos purificados con columnas de fibra de nailon del primer experimento, es que el IFN aparentemente bloqueó más al VIBF que al VENC. Mientras que en el segundo experimento con linfocitos purificados por Ficoll Hypaque los niveles de IFN bloquearon más al VENC que al VIBF. La diferencia en respuesta hacia el IFN presente en un mismo SN, se puede deber de acuerdo con lo propuesto por Stryer,⁵³ a la falta de sensibilidad de los mecanismos de respuesta intracelular de la célula huésped, al bloqueo molecular inducido por el IFN y al tipo de ARN de cada uno de los dos virus utilizados.⁵³ Otra explicación de acuerdo con Fenner,⁵⁴ es que posiblemente existe diferencia en la capacidad para invadir el monoestrato de FEP por parte de cada virus.

Byrnes *et al.*³⁶ determinaron que durante la infección con *E. tenella* existe un pico de producción de TNF- α alrededor del día 3 pi, baja después y alrededor del día 10-14 pi se eleva para presentar un segundo pico. Byrnes *et al.*³⁶ sugieren que el primer pico se debe a la respuesta inflamatoria inespecífica, y el segundo a una respuesta de tipo inmune. El primer pico de TNF- α curiosamente se presenta dos días antes del pico de IFN detectado en el primer y segundo experimentos del presente estudio, por lo cual posiblemente el TNF- α actúa como inmunomodulador en la respuesta de IFN- γ , precediéndolo en 2 o 3 días a su máxima producción, lo cual sugiere que estas dos citocinas se encuentran interrelacionadas en la defensa primaria contra *E. tenella* y posiblemente también en la respuesta inmune.

La elevación gradual de IFN hasta el pico observado al día 5 pi difiere de lo observado por Breed *et al.*,³³ quienes con linfocitos de sangre periférica determinaron el nivel de IFN más alto al día 8 pi; Breed *et al.*³³ correlacionan este aumento con un incremento de LT CD8+ observado en sangre el mismo día.²⁶

El nivel de IFN determinado en los dos experimentos bajó abruptamente al día 7 pi (Figuras 1 y 2), cuando los títulos de los linfocitos purificados con Ficoll Hypaque no difirieron con el título del grupo testigo. Observando también lo mismo con los títulos de linfocitos purificados con columnas de fibra de nailon, los cuales aun cuando difirieron de los del grupo testigo, sí mostraron una baja aparente en el nivel de IFN (Figuras 2 y 3). Aunque esta diferencia entre técnicas de aislamiento se puede deber a la presencia de macrófagos productores de TNF- α , esto únicamente sucedería con Ficoll Hypaque; sin embargo, la diferencia también se observó con las columnas de fibra de nailon, donde supuestamente existen menos macrófagos.

Una diferencia en el tiempo de presentación de la máxima producción de IFN en el trabajo de Breed *et al.*³³ y la observada en este informe posiblemente se debe a un mayor grado de resistencia contra la infección por *E. tenella*. Breed *et al.*³³ utilizaron aves Leghorn las cuales posiblemente son menos resistentes que la línea de pollo de engorda empleada en la presente investigación (Hubbard x Hubbard), ya que al extrapolar esta observación a las investigaciones efectuadas en mamíferos, se ha observado que al infectar con *E. vermiformis* una línea de ratones resistentes a coccidia (Balb/c), se obtiene una rápida respuesta al día 4 o 5 pi en la producción de IFN- γ , la cual posteriormente declina. Mientras que el pico de producción de IFN- γ en una línea susceptible (C57BL/6) se presenta hasta el día 9 pi, diferente al pico de IFN- γ detectado en los testigos sin infectar y en la línea resistente (Balb/c).^{5,17,35} Los autores infieren que el rápido incremento en la producción de IFN- γ se relaciona con una mejor respuesta inmune de los ratones resistentes (Balb/c), caracterizada por una infección benigna, a diferencia de la observada en los ratones susceptibles (C57BL/6).

Para determinar si en las aves ocurre algo semejante, se requiere efectuar investigaciones que verifiquen si realmente la rápida respuesta de IFN al día 5 pi se debe a una mayor resistencia a la infección con *E. tenella*.³³

En el contexto de la presente investigación se desprenden algunas apreciaciones de carácter concluyente: El patrón de liberación de IFN aviar detectado en LT estimulados *in vitro* después de un desafío con *E. tenella in vivo*, se comporta de manera diferente al patrón de liberación de LT estimulados *in vitro* con Con-A, pero sin previo desafío *in vivo*. Los ensayos antivirales con virus de origen aviar permiten detectar cualitativa y cuantitativamente el IFN aviar secretado por LT estimulados *in vitro*. Los patrones de liberación de IFN aviar, detectado con las dos diferentes técnicas de aislamiento de LT después de la infección primaria con *E. tenella*, se comportan de manera similar.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) y a la Secretaría de Investigación de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo otorgado para la realización de la tesis de maestría del primer autor, de la cual forma parte la presente investigación.

Referencias

1. Long PL, Millard BJ, Joyner LP. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet Latina* 1976;6:201-217.
2. Moreno DR, Quiroz RH, Mosqueda TA. Patogenicidad de algunas cepas de *Eimeria* aisladas de pollos en México. *Vet Méx* 1980;2:1-7.
3. Long PL, Johnson J, McKenzie ME, Perry E, Crane MS, Murray PK. Immunisation of young broiler chickens with low level infections of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* or *E. maxima*. *Avian Pathol* 1986;15:271-278.
4. Stiff MI, Bafundo KW. Development of immunity in broilers continuously exposed to *Eimeria* spp. *Avian Dis* 1993;37:295-301.
5. Wakelin D, Rose ME. Immunity to coccidiosis. In: Long PL, editor. *Coccidiosis of man and domestic animals*. London (UK): CRC Press, 1991:281-306.
6. Lillehoj HS, Trout JM. Coccidia a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathol* 1993;22:3-31.
7. Pierce AE, Long PL. Studies on acquired immunity to coccidiosis in bursaless and thymectomized fowls. *Immunology* 1965;9:427-439.
8. Rose ME, Hesketh P, Ogilvie BM. Peripheral blood leucocyte response to coccidial infection: a comparison of the response in rats and chickens and its correlation with resistance to reinfection..

9. Rose ME, Hesketh P. Immunity to coccidia in chickens: adoptive transfer with peripheral blood lymphocytes and spleen cells. *Parasite Immunol* 1982;54:171-185.
10. Lillehoj HS. Immune response during coccidiosis in SC and FP chickens. I. In vitro assessment of T-cell proliferation response to stage-specific parasite antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 1986;13:321-330.
11. Martín A, Awadalla S, Lillehoj HS. Characterization of cell-mediated responses to *Eimeria acervulina* antigens. *Avian Dis* 1995;39:538-547.
12. Prowse SJ, Pallister J. Interferon release as a measure of the T-cell response to coccidial antigens in chickens. *Avian Pathol* 1989;16:439-442.
13. Chang HR, Grau GE, Pechère JC. Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. *Immunology* 1990;69:33-37.
14. Scott P. IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 1991;147:3149-3155.
15. Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R, Nussenzweig V. γ -interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 1987;330:664-666.
16. Suzuki Y, Orelfibre MA, Shreiber RD, Remington JS. Interferon- γ The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988;240:516-518.
17. Ovington KS, Alleva LM, Kerr EA. Cytokines and immunological control of *Eimeria* spp. *Int J Parasitol* 1995;25:1331-1351.
18. Hughes HPA, Speer CA, Kyle E, Dubey JP. Activation of murine macrophages and a bovine monocyte cell line by bovine lymphokines to kill the intracellular pathogens *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1987;55:784-791.
19. Kogut MH, Lange C. Recombinant interferon- γ inhibits cell invasion by *Eimeria tenella*. *J Interf Res* 1989;9:67-77.
20. Kogut MH, Lange C. Interferon- γ mediated inhibition of the development of *Eimeria tenella* in cultured cells. *J Parasitol* 1989;75:313-317.
21. Rose ME, Wakelin D, Hesketh P. Gamma interferon controls *Eimeria vermiformis* primary infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 1989;57:1599-1603.
22. Byrnes S, Emerson K, Kogut M. Dynamics of cytokine production during coccidial infections in chickens: colony-stimulating factors and interferon. *Immun Med Microbiol* 1993;6:45-52.
23. Sekellick MJ, Ferrandino AF, Hopkins DA, Marcus PI. Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis. *J Interf Res* 1994;14:71-79.
24. Shultz U, Kaspers B, Rinderle C, Sekellick MJ, Marcus PI, Staeheli P. Recombinant chicken interferon: a potent antiviral agent that lacks intrinsic macrophage activating factor activity. *Eur J Immunol* 1995;25:847-851.

25. Lowenthal JW, Digby MR, York JJ. Production of interferon- γ by chicken T-cells. *J Interf Cytokine Res* 1995;15:933-938.
26. Breed DGJ, Dorrestein J, Vermeulen AN. Immunity to *Eimeria tenella* in chickens: phenotypical and functional changes in peripheral blood T-cell subsets. *Avian Dis* 1996;40:37-48.
27. Dijkmans R, Decock N, Heremans H, Van Damme J, Billiau A. Interferon- γ is cytotoxic for normal mouse fibroblasts: enhancement by necrosis factor and interleukin-1. *Lymphokine Res* 1989;8:25-34.
28. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 3rd ed. New York: Mosby, 1993.
29. Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* 1991;5:171-177.
30. Kogut MH, Slajchert T. T-lymphocytes confer protection in chicken against *Eimeria tenella* by production of lymphokines. *Immunol Infect Dis* 1992;2:69-79.
31. Kaspers B, Lillehoj HS, Jenkins MC, Pharr GT. Chicken interferon-mediated induction of major histocompatibility complex class II antigens on peripheral blood monocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;44:71-84.
32. Martín A, Lillehoj HS, Kaspers B, Bacon LD. Mitogen-induced lymphocyte proliferation and interferon production following coccidia infection. *Avian Dis* 1994;38:262-268.
33. Breed DGJ, Dorrestein J, Schettters TPM, Waart LVD, Rijke E, Vermeulen AN. Peripheral blood lymphocytes from *Eimeria tenella* infected chickens produce gamma-interferon after stimulation in vitro. *Parasite Immunol* 1997;19:127-135.
34. Delannoy I, Lekeux P, Miossec P. Cytokine and anti-cytokine strategies in inflammatory reaction modulation. *Vet Res* 1993;24:449-467.
35. Rose ME, Smith AL, Wakelin D. Gamma interferon-mediated inhibition of *Eimeria vermiformis* growth in cultured fibroblast and epithelial cells. *Infect Immun* 1991;59:580-586.
36. Byrnes S, Eaton R, Kogut M. In vitro interleukin-1 and tumor necrosis factor- γ production by macrophages from chickens infected with either *Eimeria maxima* or *Eimeria tenella*. *International J Parasitol* 1993;23:639-645.
37. Stephan B, Rommel M, Dausgshies A, Haberkorn A. Studies of resistance to anticoccidials in *Eimeria* field isolates and pure *Eimeria* strains. *Vet Parasitol* 1997;69:19-29.
38. Shat KA, Purchase HG. Cell-culture methods. In: Purchase HG, editor. *Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. Philadelphia (Pa): American Association of Avian Pathologists, 1989:167-175.
39. Castañón CJA. Comportamiento de un aislamiento velogénico del virus de la enfermedad de Newcastle en cultivos celulares (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1974.
40. Dijkmans R, Creemers J, Billiau A. Chicken macrophage activation by interferon: do birds lack the molecular homologue of mammalian interferon- γ ? *Vet Immun Immunopathol* 1990;26:319-332.
41. Tellez IG, Kogut MH, Hargis MB. Immunoprophylaxis of *Salmonella enteritidis* infections by lymphokines in Leghorn chicks. *Avian Dis* 1993;37:1062-1070.
42. Gómez VG. Identificación de linfocinas en sobrenadante de linfoblastos de pollo estimulados con concanavalina A (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.
43. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevack EM, Strober W. *Current protocols in immunology*. Vol 1. New York: Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, 1992.
44. Weiler H, Von Bülow V. Detection of different macrophage-activating factor and interferon activities in supernatants of chicken lymphocyte cultures. *Avian Pathol* 1987;16:439-452.
45. Weiler H, Von Bülow V. Development of optimal conditions for lymphokine production by chicken lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1987;14:257-267.
46. Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. Convenient assay for interferons. *J Virol* 1981;37:755-758.
47. Gill JL. *Design and analysis of experiments in the animal and medical sciences*. Vol 1. Ames (Ia): The Iowa State University Press, 1978.
48. Luginbuck RC, Schlotzhaver SD. *SAS/STAT guide for personal computers*. 6th ed. Cary (NC): SAS Institute, 1987:555-573.
49. Maheswaran SK, Thies ES, Greimann C. A micromethod for evaluating turkey lymphocyte responses to phytoantigens. *Am J Vet Res* 1975;9:1397-1400.
50. Schaefer AE, Scafuri AR, Fredericksen TL, Gilmour DG. Strong suppression by monocytes of T cell mitogenesis in chicken peripheral blood leukocytes. *J Immunol* 1985;135:1652-1660.
51. Lee LF, Sharma JM, Nazerian K, Witter RL. Suppression of mitogen-induced proliferation of normal spleen cells by macrophages from chickens inoculated with Marek's disease virus. *J Immunol* 1978;120:1554-1559.
52. Onaga H, Tajima M. Activation of macrophages by culture fluid of antigen stimulated spleen cells collected from chickens immunized with *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol* 1983;13:1-11.
53. Stryer L. *Bioquímica II*. 3a ed. Barcelona (España): Reverte S.A., 1991.
54. Fenner F. *The biology of animal viruses. Interference and interferon*. 2nd ed. New York: Academic Press, 1974.