

01672



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

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

COMPORTAMIENTO DE LOS LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES EN LA INFECCION POR *Eimeria*
tenella EN UN MODELO *IN VIVO* EN POLLO DE ENGORDA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS:

A V E S

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

MVZ. XOCHITL HERNANDEZ VELASCO

ASESORES: MVZ., MC. GARY GARCIA E.
MVZ., MC, Ph. D. GUILLERMO TELLEZ I.
MVZ. DIPL. ING., JAIME A. NAVARRO H.
MVZ., EPA. JOSE A. QUINTANA L.
DVM., M.Sc., Ph. D. MICHAEL KOGUT H.



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MVZ. Xóchitl Hernández Velasco

DEDICATORIAS

A mis padres:

Por su amor,

Por su apoyo,

Por ser la bendición más grande que Dios me ha dado.

A mi hermana:

Por su ejemplo de tenacidad y superación constante.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Al Departamento de Producción Animal: Aves

A mis asesores. Por compartir sus conocimientos y su tiempo.

A mis sinodales. Por el tiempo que me dedicaron y por contribuir con sus valiosas aportaciones al mejoramiento del presente trabajo.

Al Dr. Guillermo Téllez. Por ser una persona con inmensa calidad humana y profesional, por ser mi maestro y por todo el apoyo que siempre me ha brindado.

A los Dres. José de Jesús, José L. Vicente, Marco A. Juárez, Víctor Petrone, Rubén Merino. Por su amistad, sugerencias y ayuda.

Al Dr. Alejandro Banda. Por su ayuda y orientación.

A las Dras. Donají García, Felipa Galindo y Eva Hernández. Por su ayuda en la toma de muestras sanguíneas.

A Gerardo M. Nava. Por su ayuda en el conteo de ooquistes.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron o participaron en la elaboración de este trabajo.

MIL GRACIAS

RESUMEN

Se utilizaron 343 pollitos de engorda de un día de edad en dos experimentos. En el primer experimento 50 pollos fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos de 15, más 5 para muestreo bacteriológico. A los 17 días de edad, se inoculó en promedio 2 ml de solución salina fosfatada estéril (SSF), por vía endovenosa a cada ave del grupo 1, mientras que en los grupos 2 y 3 se les administró 5 fluorouracilo (5-FU) en solución a dosis de 200 y 300 mg / kg de peso respectivamente. A 10 aves de cada grupo se les tomó una muestra sanguínea a los días 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 y 15 postratamiento (PT) para realizar un conteo total y diferencial de leucocitos, posteriormente, se obtuvo la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales (LPMN / L_T). En este estudio se observó que la proporción de LPMN / L_T en los grupos tratados con 5-FU disminuyó a partir del día 1 hasta el día 9 PT, los valores más bajos se presentaron del día 7 al día 9 PT y los valores normales se recuperaron hasta el día 15 PT. Se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) entre los grupos, entre los días de muestreo, así como en la interacción de la dosis de 5-FU y el tiempo postratamiento en relación a las proporciones de LPMN / L_T . También se observaron diferencias ($P < 0.05$) entre las proporciones de LPMN / L_T de las aves tratadas con 5-FU en comparación con las aves del grupo testigo, así como entre los días de muestreo en los grupos tratados. En el segundo experimento, 293 pollitos fueron asignados aleatoriamente en 4 grupos: 1) testigo, 2) tratado con 5-FU, 3) infectado con *E. tenella* y 4) tratado con 5-FU y luego infectado con *E. tenella*. La administración del 5-FU se realizó a la misma edad y en la misma forma que en el experimento 1, a dosis de 200 mg / kg de peso. Los 4 tratamientos con 12 aves cada uno se realizaron 6 veces con la variante del día de infección por vía oral con 5,000 ooquistes esporulados de *E. tenella* en los grupos 3 y 4 a uno de los siguientes 6 días: 2, 4, 6, 8, 10 y 12 PT con 5-FU. En los grupos tratados con 5-FU se observaron proporciones similares de LPMN / L_T a las de los grupos tratados con 5-FU y luego infectados con *E. tenella*. Los grupos infectados únicamente con el parásito presentaron dos picos en las proporciones de LPMN / L_T ($P < 0.05$), a los días 1 al 2 y 5 al 6 posinfección en comparación con los grupos testigo. La mayor producción de ooquistes ($P = 1.611 \text{ e-}07$) se observó en las aves infectadas 2 días PT con 5-FU, también se encontraron diferencias ($P < 0.05$) a los días 6, 10 y 12 de infección PT con 5-FU en comparación con las aves que no recibieron el fármaco. El grado de severidad de las lesiones cecales fueron superiores ($P < 0.05$) en las aves infectadas a los días 4, 6 y 10 PT con 5-FU en comparación con las aves que no fueron tratadas con 5-FU.

Palabras clave: Pollos de engorda; 5 fluorouracilo; 5-FU; Leucocitos; Leucocitos polimorfonucleares; Granulocitopenia; Coccidiosis aviar; *Eimeria tenella*.

Involvement of polymorphonuclear leukocytes in broilers infected

with *Eimeria tenella*.

SUMMARY

343 one-day-old broiler chicks were used in two experiments. In the first study, fifty of which were randomly assigned into 3 groups of 15 birds each and 5 chicks were used for bacteriologic monitoring. On the day 17th of age the control group (1) was intravenously inoculated with (2 ml on average) sterile phosphate-buffered solution (PBS), pH 7.4 and the groups 2 and 3 were inoculated with a single dose of 200 and 300 mg / kg body weight (BW) 5 fluorouracil (5-FU) to each bird, respectively. At the days 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 and 15 postinoculation (PI), 10 chicks from each group per day were bled for counts of total and differential white blood cells and determination of polymorphonuclear leukocytes / total leukocytes (PMN / TL) ratio. A fast reduction in PMN / TL ratio started since day 1 after 5-FU treatment and a further reduction in PMN / TL ratio occurred from day 7 to day 9 PI. At day 15 PI, birds treated with 5-FU recovered their PMN / TL ratios to the normal. There were highly significant differences ($P < 0.001$) in PMN / TL ratio between groups, between days PI, as well as in the interaction 5-FU dosage and time PI. A significant reduction ($P < 0.05$) in the PMN / TL ratio was found in birds given 200 and 300 mg / kg BW 5-FU and between days, compared with the control birds. Clinical signs of toxicity appeared in birds given 300 mg / kg BW 5-FU. In a second experiment, 293 chicks were assigned into 4 groups: 1) control group, 2) treated with 5-FU, 3) infected with *E. tenella* and 4) infected with *E. tenella* after 5-FU treatment. The administration of 5-FU was the same as in the first experiment with 200 mg/kg BW. The 4 groups of 12 birds each were to carry out 6 times, giving orally 5,000 sporulated oocyst of *E. tenella* in both 3 and 4 groups at one of the following six days: 2, 4, 6, 8, 10 and 12 5-FU PI. At days 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 12 and 15 PI, 10 chicks from each treatment into each group per day were bled in order to measure PMN / TL ratio. PMN / TL ratios were similar in both 2 and 4 groups. The groups infected only with *E. tenella* showed two peaks of PMN / TL ratio ($P < 0.05$) in comparison with control groups, these occurred at 1 to 2 and 5 to 6 days after *E. tenella* infection. The greatest *E. tenella* oocyst production ($P = 1.611 \text{ e-}07$) was found on infected birds 2 days after 5-FU treatment, whereas it was greater ($P < 0.05$) in chickens infected 6, 10 and 12 days after 5-FU treatment than birds without 5-FU. Cecal lesion scores in the birds infected with *E. tenella* at days 4, 6 and 10 of 5-FU treatment were greater ($P < 0.05$) than birds without 5-FU.

Keywords: Chickens; 5 fluorouracil; 5-FU; Polymorphonuclear leukocytes; Granulocytopenia; Depletion of polymorphonuclear leukocytes; Avian coccidiosis; *Eimeria tenella*.

ÍNDICE

		Página	
Capítulo	1.0	INTRODUCCIÓN	1
	1.1	Definición de la coccidiosis aviar	1
	1.2	Historia	1
	1.3	Importancia	2
	1.4	Epidemiología	3
	1.4.1	Distribución geográfica	3
	1.4.2	Especies susceptibles	3
	1.4.3	Transmisión	4
	1.5	Etiología	4
	1.5.1	Características biológicas de las <i>Eimerias</i> en las aves	4
	1.5.2	Ooquiste esporulado	5
	1.5.3	Ciclo de vida de <i>Eimeria tenella</i>	5
	1.5.4	Resistencia a agentes físicos y químicos	6
	1.6	Presentaciones de la coccidiosis	6
	1.7	Patogenia	7
	1.8	Signos clínicos	9
	1.9	Lesiones	9
	1.10	Respuesta inmune contra la coccidiosis	9
	1.11	5 fluorouracilo	14
	1.12	Mecanismos de acción del 5-FU	14
	1.13	Efectos del 5-FU en células no tumorales	15
	1.14	Objetivos	17
Capítulo	2.0	MATERIAL Y MÉTODOS	18
Capítulo	3.0	RESULTADOS	25
Capítulo	4.0	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	28
Capítulo	5.0	LITERATURA CITADA	33
Capítulo	6.0	FIGURAS Y CUADROS	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diagrama de un ooquiste esporulado del género <i>Eimeria</i> .	41
Figura 2. Estructura de un esporozoito de <i>Eimeria tenella</i> .	42
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Eimeria spp.</i>	43
Figura 4. Efecto de la administración intravenosa de 5 fluorouracilo sobre el número de leucocitos en sangre periférica de pollos de engorda.	44
Figura 5. Efecto de la administración intravenosa de 5 fluorouracilo sobre el número de leucocitos polimorfonucleares en sangre periférica de pollos de engorda.	45
Figura 6. Efecto de la administración intravenosa de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos de engorda.	46
Figura 7. Efecto de la infección con <i>E. tenella</i> 2 días después de la administración de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos	47
Figura 8. Producción de ooquistes en ciegos de pollos infectados con <i>E. tenella</i> 2 días posadministración de 5 fluorouracilo	48
Figura 9. Efecto de la infección con <i>E. tenella</i> 4 días después de la administración de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos	49
Figura 10. Producción de ooquistes en ciegos de pollos infectados con <i>E. tenella</i> 4 días posadministración de 5 fluorouracilo	50

	Página
Figura 11. Efecto de la infección con <i>E. tenella</i> 6 días después de la administración de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos	51
Figura 12. Producción de ooquistes en ciegos de pollos infectados con <i>E. tenella</i> 6 días posadministración de 5 fluorouracilo	52
Figura 13. Efecto de la infección con <i>E. tenella</i> 8 días después de la administración de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos	53
Figura 14. Producción de ooquistes en ciegos de pollos infectados con <i>E. tenella</i> 8 días posadministración de 5 fluorouracilo	54
Figura 15. Efecto de la infección con <i>E. tenella</i> 10 días después de la administración de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos	55
Figura 16. Producción de ooquistes en ciegos de pollos infectados con <i>E. tenella</i> 10 días posadministración de 5 fluorouracilo	56
Figura 17. Efecto de la infección con <i>E. tenella</i> 12 días después de la administración de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos	57
Figura 18. Producción de ooquistes en ciegos de pollos infectados con <i>E. tenella</i> 12 días posadministración de 5 fluorouracilo	58

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Grado de severidad de lesiones cecales en pollos infectados con <i>E. tenella</i> 2 días posadministración y no, de 5-FU	48
Cuadro 2. Grado de severidad de lesiones cecales en pollos infectados con <i>E. tenella</i> 4 días posadministración y no, de 5-FU	50
Cuadro 3. Grado de severidad de lesiones cecales en pollos infectados con <i>E. tenella</i> 6 días posadministración y no, de 5-FU	52
Cuadro 4. Grado de severidad de lesiones cecales en pollos infectados con <i>E. tenella</i> 8 días posadministración y no, de 5-FU	54
Cuadro 5. Grado de severidad de lesiones cecales en pollos infectados con <i>E. tenella</i> 10 días posadministración y no, de 5-FU	56
Cuadro 6. Grado de severidad de lesiones cecales en pollos infectados con <i>E. tenella</i> 12 días posadministración y no, de 5-FU	58

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

- ANDEVA** = Análisis de varianza
5-FU = 5 fluorouracilo
CA = Coccidiosis aviar
CON-A = Concanavalina A
dTMP = Monofosfato de desoxitimidina
dTTP = Trifosfato de desoxitimidina
dUMP = Monofosfato de desoxiuridina
FdUM = 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato
FEC-G = Factor estimulador de colonias de granulocitos
FUTP = Trifosfato de fluorouridina
IFN γ = Interferón gama
IL-1 = Interleucina 1
IL-2 = Interleucina 2
LIE = Linfocitos intraepiteliales
LPMN = Leucocitos polimorfonucleares
L_T = Leucocitos totales
LT = Linfocitos T
MHC-I = Molécula principal de histocompatibilidad clase I
mTHF = Tetrahidrofolato de metileno
NO = Número de ooquistes
NTL = Número total de leucocitos
PT = Postratamiento
TNF α = Factor de necrosis tumoral alfa

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de la coccidiosis aviar

La coccidiosis aviar (CA) es una enfermedad del aparato digestivo causada por protozoarios del género *Eimeria*. Clínicamente se caracteriza por producir diarrea, anemia, mala digestión y mortalidad variable (Moreno, 1992; McDougald y Reid, 1991).

1.2 Historia

En 1826, Leeuwenhoeck observó por primera vez un protozooario en los conductos biliares de conejo, al que posteriormente se le llamó *Eimeria stiedae*. Leucart en 1879 utilizó la palabra *Coccidium* y definió a los parásitos como elementos intracitoplasmáticos de forma esférica u oval (Ruiz, 1990).

Eimer en 1870 logra diferenciar las formas asexuales y sexuales e indica que los ooquistes son las formas de transmisión de la infección (Ruiz, 1990).

Railliet y Lucet en 1891 describieron al *Coccidium tenellum* como un parásito del ciego de pollos, causante de la coccidiosis en diferentes tipos de aves (Kheysin, 1972).

Schaudinn en 1900 describió el ciclo biológico de una coccidia y Hardley en 1911 publicó un estudio morfológico de *E. avium*, que más tarde se llamó *E. tenella* y a la cual se le responsabilizó de causar la coccidiosis en pollos y gallinas (Ruiz, 1990).

Tyzzar *et al.*, de 1929 a 1932, realizaron un estudio detallado de la biología y la patogenia de *E. tenella*. Además identificaron y describieron a *E. acervulina*, *maxima*, *necatrix* y *mitis* en pollos y *E. meleagridis*, *meleagrimitis* y *dispersa* en pavos (Ruiz, 1990;

McDougald y Reid, 1991). Posteriormente se identificaron otras especies: Levine en 1924 (*E. brunetti*) y en 1938 (*E. hagani*), Jonhson en 1930 (*E. praecox* y *E. necatrix*), Edgar y Sibold en 1964 (*E. mivati*) en pollos y (*E. adenoides*) en pavos (McDougald y Reid, 1991).

El control de esta parasitosis inició con el descubrimiento anticoccidial de las sulfas por Levine en 1939; sin embargo, debido al desarrollo de resistencia por parte de las coccidias a los agentes farmacológicos, se estudian formas alternativas para su futuro control (Lillehoj y Trout, 1993).

1.3 Importancia de la enfermedad

La coccidiosis es un problema en varias especies animales. Sin embargo, la industria avícola se ve particularmente afectada porque la explotación intensiva de las aves, la presencia de factores estresantes y la presión de producción entre otros factores, han modificado el equilibrio natural del parásito con su hospedero y creado condiciones favorables para su presentación (McDougald y Reid, 1991).

La importancia de la CA es principalmente económica debido a que afecta los parámetros productivos. El parásito se multiplica en las células intestinales, ocasiona daño tisular, afecta la digestión, la absorción y el metabolismo de los nutrientes, por lo que causa anemia y deshidratación y predispone a la presentación de otras enfermedades. Además, aumenta la mortalidad y los costos de producción debido al uso continuo de anticoccidianos para prevenirla (Moreno 1989; McDougal y Reid, 1991).

1.4 Epidemiología

1.4.1 Distribución geográfica

En México como en todo el mundo, la CA es la parasitosis más importante y común en la industria avícola (McDougald y Reid, 1991; Moreno, 1992). Su presencia es prácticamente inevitable en las explotaciones avícolas tanto rústicas como comerciales, debido a que las coccidias que afectan a los pollos son agentes cosmopolitas (McDougald y Reid, 1991; Moreno, 1992; Borges, 1994). Sin embargo su presentación es más frecuente en zonas con clima frío y húmedo (McDougald y Reid, 1991).

1.4.2 Especies susceptibles

Las coccidias tienen alta especificidad de especie; las especies que afectan a los pollos no afectan a ninguna otra especie de aves, ni viceversa (Long, 1990; Vervelde *et al.*, 1996).

La coccidiosis es en gran parte una enfermedad de animales jóvenes. Sin embargo, los pollos recién nacidos no son susceptibles a la infección debido a la insuficiencia de quimotripsina y sales biliares para ocasionar el desenquistamiento, mientras que las aves de 3 a 6 semanas de edad son las más comúnmente afectadas (Long, 1990; McDougald y Reid, 1991). La infección es poco frecuente en aves adultas, por que la CA es una parasitosis de naturaleza autolimitante y después de la exposición, se desarrolla inmunidad con rapidez que protege a las aves contra brotes de la misma especie. Aunque es común la infección con dos o más especies de coccidias, es posible que se presenten varios brotes con diferentes especies en una parvada debido a que no existe inmunidad cruzada (Long, 1990; McDougald y Reid, 1991; Moreno, 1992).

1.4.3 Transmisión

Las aves infectadas pueden eliminar ooquistes en las heces por varios días o semanas, los cuales aumentan en número entre las 4 y 5 semanas de edad y posteriormente disminuyen (Moreno, 1992). La enfermedad se disemina dentro y entre granjas en forma mecánica (McDougald y Reid, 1991).

1.5 Etiología

Las coccidias pertenecen al phylum Apicomplexa y a la familia *Eimeriidae*. Existen cerca de 900 especies que afectan ránidos, anélidos, insectos, reptiles, anfibios, aves y mamíferos (Pellerdy, 1974). Se reconocen siete especies de *Eimeria* que producen infecciones características en pollos: *E. tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. imitidis* y *E. praecox*, ya que *E. hagani* y *E. mivati* no han sido aceptadas como especies distintas (Long, 1990; McDougal y Reid, 1991; Lillehoj y Trout, 1993).

En México las especies de *Eimeria* más frecuentes en pollo de engorda son: *E. tenella* y *E. acervulina*, las cuales afectan principalmente a las aves entre las 4 y 6 semanas de edad (Moreno 1992). Existen además dentro de cada especie, cepas con diferente grado de patogenicidad (Moreno, 1989).

1.5.1 Características biológicas de las *Eimerias* en las aves

Las *Eimerias* son parásitos con un alto grado de especificidad, no sólo son específicas de hospedero, también infecta tejidos, órganos y regiones particulares dentro del ave, así como parasitan células específicas dentro de un tejido (Long, 1990). Además, tienen un alto potencial reproductivo y un ciclo de reproducción corto y complejo, por lo que se difunden rápidamente en la parvada (Moreno 1989; McDougal y Reid, 1991).

E. tenella se distingue de las demás especies de *Eimerias* que afectan a las aves por localizarse en el epitelio, lámina propia, túnica y criptas de Lieberkhün de los ciegos (McDougal y Reid, 1991).

1.5.2 Ooquiste esporulado

El ooquiste esporulado es un cigoto de forma ovoide de doble pared que contiene 4 esporoblastos y cada esporoblasto contiene a su vez dos esporozoitos (Figura 1). Los ooquistes de las *Eimerias* que afectan a los pollos miden desde (11 a 18 μm) X (12 a 19 μm) hasta (16 a 30 μm) X (22 a 42 μm) de ancho por largo respectivamente (Long, 1990; McDougal y Reid, 1991). Los ooquistes de *E. tenella* se caracterizan por medir 22 x 19 μm en promedio (McDougal y Reid, 1991) (Figura 1).

1.5.3 Ciclo de vida de *Eimeria tenella*

La infección por *E. tenella* inicia con la ingestión de ooquistes esporulados. Posteriormente la pared del ooquiste se rompe por la acción mecánica de la molleja y el efecto de la temperatura del hospedero. Finalmente, los esporozoitos se liberan en el lumen intestinal por acción de enzimas pancreáticas y sales biliares (Long, 1984 y 1990, McDougal y Reid, 1991) (Figura 2). Mientras que los esporozoitos de *E. brunetti* y *E. praecox* se desarrollan dentro de las células epiteliales del intestino, los esporozoitos de *E. tenella* al igual que los de *E. acervulina* y *E. necatrix* son transportados del epitelio a las células epiteliales de las criptas intestinales por leucocitos intraepiteliales (LIE), para su posterior desarrollo, (Pellerdy, 1974; Lawn y Rose, 1982; Long, 1984; Fernando, 1987).

Cada esporozoito pasa al estado de trofozoito, el cual se multiplica por fisión binaria y da origen a un esquizonte de primera generación del segundo al tercer día posinfección, éste da lugar a 900 merozoitos de primera generación, cada uno de los cuales penetra a una nueva célula y de él se originan de 200 a 350 merozoitos de segunda generación que del cuarto al quinto día posinfección inician la ruptura de los enterocitos y se liberan, con la subsecuente

aparición de hemorragias macroscópicas (Long, 1990; Lillehoj, 1989). Los merozoitos de segunda generación penetran a otras células intestinales para formar a los micro y macrogametos, cada microgametogonia produce un gran número de microgametos biflagelados, los cuales fertilizan al macrogameto al sexto día posinfección y al séptimo día dan origen a un cigoto con pared gruesa que posteriormente se libera de la célula y se elimina en las heces como ooquiste no esporulado (Long, 1990; Lillehoj y Trout, 1993).

La fase de esporogonia dura 48 horas o más y se realiza en el suelo bajo condiciones apropiadas de oxígeno, humedad y temperatura (29 a 30 °C) y al concluir da origen a un ooquiste esporulado con capacidad infectante (Moreno, 1989; Long, 1990; Lillehoj y Trout, 1993) (Figura 3).

1.5.4 Resistencia a agentes físicos y químicos

Los ooquistes son relativamente resistentes a ambientes extremos, así como a los desinfectantes y antibióticos comunes. Sin embargo, son sensibles a la exposición a temperaturas de 55 °C, a la congelación y a la desecación, al igual que al amoníaco y a la acción de hongos y bacterias, por lo que su supervivencia en la cama o en las heces es limitada (McDougald y Reid, 1991; Moreno, 1992).

1.6 Presentaciones de la coccidiosis

La coccidiasis es la presentación subclínica de la enfermedad. Se caracteriza por su cronicidad, baja mortalidad y signos inespecíficos. Aunque es la presentación más frecuente de esta parasitosis, comúnmente se confunde con otros padecimientos o pasa desapercibida (Mosqueda, 1989; McDougal y Reid, 1991).

La presentación clínica se caracteriza por producir diarrea, anemia, mala digestión y mortalidad (Moreno, 1989 y 1992; McDougal y Reid, 1991). Ambas están determinadas por las especies de *Eimeria* presentes, el grado de patogenicidad de la cepa, la dosis infectante, la

interacción con otros patógenos, así como la edad, el estado inmunológico y fisiológico del hospedero, además de algunos factores ambientales y de manejo (Moreno, 1989; Mosqueda, 1989; McDougal y Reid, 1991).

1.7 Patogenia

El daño causado por una misma coccidia varía de acuerdo con la edad, estirpe, estado nutricional y fisiológico del ave, así como la edad de los ooquistes y las especies involucradas (McDougal y Reid, 1991; Fernando, 1982). Los esporozoitos producen un daño mínimo, sin embargo, los merozoitos de *E. tenella* y *E. necatrix* pueden causar hemorragias severas (Long, 1990).

La etapa más patógena del ciclo de desarrollo de *E. tenella* es durante la segunda generación de esquizoontes (Long, 1990). La maduración de los ooquistes de segunda generación se acompaña de grave daño tisular, sangrado, ruptura de las glándulas cecales y destrucción de la mucosa y de la capa muscular (McDougal y Reid, 1991). Al cuarto día posinfección con *E. tenella* las hemorragias son aparentes, las paredes cecales pueden estar engrosadas debido al edema e infiltración de heterófilos en estados tempranos de la infección seguidos por macrófagos y linfocitos (Rose *et al.*, 1979; Fernando, *et al.*, 1983b; Terry, 1988; McDougal y Reid, 1991). En el sitio del daño epitelial, hay pérdida del epitelio y de las vellosidades, que pueden verse agraviadas si se presenta un gran número de heterófilos (Weiss, 1989). Las paredes cecales pueden estar distendidas con contenido sanguinolento, coágulos de sangre y porciones de la mucosa. El contenido cecal comúnmente se deshidrata, se endurece y se excreta en las heces (McDougal y Reid, 1991). La hiperplasia del epitelio se presenta como una respuesta compensatoria de las células epiteliales no afectadas, pero estas células son inmaduras y con menor capacidad de absorción (Fernando y McCraw, 1973; Ferguson, 1979).

La coccidiosis por *E. acervulina* se ha asociado a una disminución en la absorción de nutrientes, no así en las infecciones por *E. tenella*, donde el daño sobre la absorción es prácticamente nulo y la despigmentación en las aves se debe a la pérdida de carotenos por las hemorragias que este parásito ocasiona en los ciegos (Ruff, 1975 y 1978; Turk, 1978).

En su metabolismo, *E. tenella* produce ácido láctico por lo que disminuye el pH intestinal y provoca la desnaturalización de proteínas, inhibe enzimas y produce el desequilibrio de la flora bacteriana, además la destrucción celular favorece la penetración de bacterias, la absorción de toxinas y la formación de hemorragias (Bradley y Radhakrishnan, 1973). También se ha observado la alteración de procesos fisiológicos como incremento en los niveles sanguíneos de glucosa, cloro, sodio y potasio así como aumentó en los tiempos de coagulación, por lo que *Eimeria tenella* es considerada la más patógena de las *Eimerias* que afectan a los pollos (McDougal y Reid, 1991). *E. tenella* favorece la proliferación de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens* al disminuir la velocidad de paso del alimento, (Schildknecht, 1992).

Se considera que la acción traumática en las células y la consecuente pérdida de sangre son la causa principal de la muerte, pero también se asocia a la absorción de toxinas que resultan de la proteólisis excesiva por muerte y necrosis celular (Witlock, 1982; Lozanov, 1985; Fernando y Pasternak, 1983a).

La morbilidad es del 100% y la mortalidad varía dependiendo de diversos factores como son las especies y la cantidad de ooquistes ingeridos, la edad del ave y la presencia de enfermedades inmunodepresoras (Moreno, 1992). La mortalidad es mayor entre los 5 y 6 días posinfección (Long, 1990).

1.8 Signos Clínicos

Los signos clínicos más comunes en pollos infectados con *E. tenella* son: plumas erizadas, depresión, palidez, diarrea sanguinolenta, disminución del consumo de alimento y en la ganancia de peso y aumento en la mortalidad (Moreno, 1992; McDougal y Reid, 1991).

1.9 Lesiones

E. tenella se distingue de las otras especies de coccidias que afectan a pollos por producir lesiones características en ciegos. Comúnmente se observan engrosamiento de la pared y aumento de volumen en ciegos, inflamación y hemorragias en la mucosa, sangre líquida o coagulada, sola o mezclada con el contenido cecal, posiblemente material necrótico y con exudado de apariencia caseosa de acuerdo al curso de la enfermedad (Moreno, 1989 y 1992).

Al microscopio se observan edema, hemorragias, infiltrado linfocitario, pérdida del epitelio y de las microvellosidades intestinales, ruptura de glándulas y ocasionalmente destrucción de las capa mucosa y muscular, además de hiperplasia epitelial al décimo día después de infecciones leves (McDougal y Reid, 1991).

1.10 Respuesta inmune a la coccidiosis

La naturaleza del antígeno, las vías de reconocimiento antigénico y la respuesta inmunológica del hospedero dependen del estado de desarrollo en el que se encuentra el parásito y de su relación con las células del hospedero (Wakelin y Rose, 1990).

Cada especie de *Eimeria* posee material antigénico distinto, por lo que no existe inmunidad cruzada. *E. maxima* es una de las especies más inmunogénicas de las coccidias patógenas para pollos, mientras que *E. tenella* es moderadamente inmunogénica y altamente patógena (Wakelin y Rose, 1990; McDougald y Reid, 1991; Talebi y Mulchy, 1995). Así

mismo, dentro del ciclo reproductivo, cada estado de desarrollo expresa diversos antígenos y es blanco de un tipo específico de la respuesta protectora del hospedero. Los antígenos asociados con los estados de desarrollo asexual son más inmunogénicos que los estados sexuales (Rose *et al.*, 1984a; Talebi y Mulchy, 1995). La salida de merozoitos está relacionada con la liberación de una gran cantidad de material antigénico de la célula infectada (Wakelin y Rose, 1990), sin embargo, el esporozoito parece ser el estado más inmunogénico (Jeurissen *et al.*, 1996).

Las fases extracelulares teóricamente son susceptibles a la acción de los anticuerpos, el complemento, mediadores inflamatorios, citocinas y a la fagocitosis, sin embargo, cuando el parásito penetra a las células del hospedero se vuelve inaccesible a estos factores y sólo puede ser afectado por mecanismos que operan intracelularmente como radicales superóxido, enzimas lisosomales, halógenos o por destrucción de la célula parasitada (Wakelin y Rose, 1990).

Se ha evidenciado que la participación de la inmunidad humoral contra la coccidiosis es mínima (Lillehoj, 1987; Dunnington *et al.*, 1992), así como que la inmunidad celular es la más importante en este tipo de infecciones (Kogut y Long, 1981; Giambone *et al.*, 1984; Kronke *et al.*, 1984; Long, 1990; Kogut y Eirman, 1991; Lillehoj y Trout, 1996).

Existen dos tipos de células fagocíticas especializadas, los macrófagos y los neutrófilos polimorfonucleares (Roitt *et al.*, 1994).

A diferencia de los mamíferos, en las aves el grupo de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) incluye a los heterófilos, eosinófilos y basófilos (Sturkie *et al.*, 1986). Debido al bajo número de eosinófilos y basófilos en pollos, en algunos estudios todos los LPMN se han considerado como heterófilos (Lucas y Jamroz, 1961; Kogut *et al.*, 1994 y 1995).

Los heterófilos son el equivalente de los neutrófilos en otras especies. Los heterófilos son células de patrullaje con gran fuerza contráctil, motilidad y direccionalidad que

desempeñan funciones fundamentales en la inflamación y en la resistencia innata y participan en la eliminación de microorganismos y tejidos muertos, pero también ejercen importantes funciones efectoras en la respuesta inmune específica, al ser estimulados por citocinas derivadas de LT, macrófagos y células endoteliales y fagocitar partículas opsonizadas (Carlson, 1972; Roitt *et al.*, 1994).

Los heterófilos pueden ser muy numerosos donde el epitelio es dañado o roto y particularmente si hay invasión bacteriana (Topp y Carlson, 1972b; Powell, 1987b; Latimer *et al.*, 1990; Gregory, 1990; Kogut *et al.*, 1994 y 1995). Son reclutados a estos sitios por componentes del agente y mediadores inflamatorios del huésped, mediante los procesos de pavimentación y adhesión al endotelio vascular, diapedesis y quimiotaxis (Ming *et al.*, 1987; Kogut *et al.*, 1996; Roitt *et al.*, 1994). Además, son más eficientes que los macrófagos para fagocitar y destruir bacterias, incluso en ausencia de opsoninas (Roitt *et al.*, 1994; Stabler *et al.*, 1994).

En los gránulos de los heterófilos se han identificado enzimas como la fosfatasa ácida, β -glucoronidasa y estereasa inespecífica (Topp y Carlson, 1972a) y carecen de mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina (Atwal y McFarland, 1966; Brune y Spintzanagel, 1973).

Se ha asociado un nivel mayor de heterófilos a una mayor resistencia en aves infectadas con *E. tenella* (Gross y Siegal, 1983). Al igual que los macrófagos, los heterófilos han fagocitado esporozoitos *in vitro* (Onaga e Ishii, 1980a; Davis, 1981; Rose, 1987). Además se menciona que forman parte del infiltrado en las infecciones y que participan en la destrucción de la primera generación de merozoitos (Gregory, 1990).

Los eosinófilos son células enigmáticas, fácilmente confundidas con los heterófilos y raramente estimuladas por las mismas causas que en mamíferos (Rose, *et al.*, 1979). Tienen capacidad fagocítica, pero menor a la de los heterófilos, mientras que los basófilos son los PMN menos abundantes en las aves (Roitt *et al.*, 1994).

Los macrófagos participan en la iniciación de una respuesta inmunológica específica por el procesamiento y la presentación de antígenos a los linfocitos en asociación con el complejo principal de histocompatibilidad, además de producir citocinas que estimulan a otras células inmunológicas (Onaga e Ishii, 1980b; Powell 1987a, b; Lillehoj 1989; Lillehoj y Trout 1993).

Existe una interacción entre linfocitos T y macrófagos mediada por linfocinas que pueden actuar directamente sobre la célula hospedera previniendo el desarrollo del parásito o activando a otros macrófagos (Kogut y Lange, 1989).

La respuesta inmune contra las infecciones con *Eimeria* es T dependiente, es decir, es iniciada y regulada a través de la actividad de LT (Rose y Long, 1970; Rose y Hesketh, 1982). Los LT ejercen una actividad antiparasitaria por medio de la liberación de interferón γ (IFN γ). El IFN γ activa otras células como macrófagos para que liberen interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Zhang *et al.*, 1995), estas citocinas promueven la muerte intracelular y aumentan la actividad fagocítica y citotóxica de los macrófagos (Durum *et al.*, 1985). En estudios *in vitro* se ha demostrado que IFN γ inhibe el desarrollo de *E. tenella* en células MDBK (Kogut y Lange, 1989) y se sugiere que activa mecanismos destructivos para las células parasitadas que expresan moléculas principales de histocompatibilidad clase I (MHC-I) en su superficie (Trout y Lillehoj, 1995).

Bymes *et al.*, (1993) sugieren que el TNF α puede estar involucrado en la modulación de la patogénesis de la coccidiosis. En estudios *in vitro* se ha observado un aumento en la producción de TNF α por macrófagos de aves infectadas con *E. tenella* y *E. maxima* 3-6 días posinfección, este aumento coincide con los mayores cambios fisiopatológico en el hospedero, además de que la administración de TNF α produce cambios similares a los causados por coccidias, como diarrea, acidosis, glicogenolisis, heterofilia y extravasación de heterófilos. De igual forma, al aumentar las concentraciones de IL-1 y cortisona en plasma, se observa anorexia, disminución de la eficiencia alimenticia, la

ganancia de peso, los niveles de Zn en plasma e incremento de cobre en el mismo (Dinarelo, 1984; Byrnes *et al.*, 1993).

Los linfocitos CD4+ son importantes en el control de infecciones primarias con *Eimeria tenella*, mientras que los linfocitos CD8+ son necesarios para desarrollar una inmunidad protectora contra la coccidiosis (Trout y Lillehoj, 1996). Esto también ha sido demostrado con *Eimeria* spp. en ratones (Rose *et al.*, 1992).

En pollos inoculados con *E. maxima*, se observó un incremento en el número de linfocitos CD4+ y CD8+ en lámina propia y de CD8+ en el epitelio intestinal, 3 a 5 y 11 días posdesafío (Rothwell *et al.*, 1995). Vervelde *et al.*, (1993) caracterizaron la subpoblación de leucocitos infiltrados en el tejido intestinal de pollos infectados con *E. tenella*, la mayoría de las células infiltradas eran macrófagos y linfocitos T con un incremento importante en el número de linfocitos CD4+, mientras que en aves inmunes se encontraron linfocitos T CD4+ y principalmente CD8+, por lo que sugieren que los linfocitos CD4+ están involucrados en la inducción de la respuesta inmune, mientras los linfocitos CD8+ participan seguramente como células efectoras. En pollos infectados con *E. tenella* se observó un incremento transitorio marcado en la proporción de células que expresan CD8 (Dim+ y Bright+) 8 días posinfección y una disminución en la proporción de células que expresan CD4+ a los 9-10 días posinfección (Breed *et al.*, 1996).

Las linfocinas provenientes de LT de aves inmunes contra *E. tenella* estimulados con Con-A confirieron cierta protección ante desafíos con ooquistes de *E. tenella* (Kogut *et al.*, 1992; García, 1995). Esta protección posiblemente estuvo relacionada a un aumento en la síntesis del factor estimulador de colonias de granulocitos (FEC-G) como se observó en otro estudio donde los LT fueron expuestos a *Salmonella enteritidis*, *S. gallinarum* y *S. typhimurium* y estimulados con Con-A (Kogut *et al.*, 1995).

1.11 5 fluorouracilo

El 5 fluorouracilo (5-FU) es un antimetabolito sintético que fue desarrollado por Heidelberger y Ansfield en 1957. Estos investigadores observaron en ratas que algunas células malignas usaban la base uracilo más eficientemente que las células de la mucosa intestinal y desarrollaron una serie de análogos del uracilo con substitución de fluorinas (Chabner y Myers, 1985). El 5-FU es un agente proliferativo dependiente que actúa sobre las células en crecimiento logarítmico afectando su replicación, principalmente en las fases G₁ y S del ciclo celular (Pizzorno *et al.*, 1995; Haskell, 1995).

El 5-FU es utilizado ampliamente para el tratamiento de carcinomas por su actividad selectiva sobre células cancerígenas, ya que se incorpora mejor dentro del tejido tumoral que dentro de los tejidos normales (Fujii y Shirasaka, 1984; Chu *et al.*, 1994).

1.12 Mecanismos de acción del 5-FU

El 5-FU se clasifica como una fluoropirimidina por que tiene una fluorina en la posición 5, es metabolizado en el organismo a nivel intracelular a 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUM), el cual junto con las cadenas N⁵ y N¹⁰ del tetrahidrofolato de metileno (mTHF), sólo si el mTHF se encuentra en niveles adecuados forman un complejo ternario covalente al unirse con la enzima timidilato sintetasa bloqueando la actividad de esta enzima, por lo que la biotransformación por metilación del monofosfato de desoxiuridina (dUMP) en monofosfato de desoxitimidina (dTMP) no se lleva a cabo, inhibiendo así la síntesis de trifosfato de desoxitimidina (dTTP), uno de los cuatro precursores del ADN, inhibiendo así la síntesis del ADN, además de provocar un desequilibrio metabólico y muerte de la célula (Suga *et al.*, 1984; Chabner y Myers, 1985; Haskell, 1995).

Un mecanismo secundario de acción del 5-FU involucra la síntesis de ribonucleótidos como la trifosfato de fluorouridina (FUTP), un metabolito del 5-FU que se incorpora dentro del ARN, con iguales efectos (Pizzorno *et al.*, 1995; Haskell, 1995).

Otros efectos bioquímicos menores incluyen la incorporación de 5-FU a la enzima ADN uracil glicosilasa, afectando la reparación e induciendo la ruptura de las cadenas dentro del ADN y la inhibición de la utilización de uracilo en la síntesis del ARN por bloqueo de la uracil fosfatasa. (Haskell, 1995).

1.13 Efectos del 5-FU en células no tumorales

En pacientes normales el 5-FU puede tener un efecto citotóxico reversible sobre las células progenitoras de la médula ósea que impide su replicación (Molineux *et al.*, 1995; Shimamura *et al.*, 1987). En estudios realizados por Ophir *et al.*, (1993) y por Moore y Warren, (1987) se observó que el 5-FU induce mielosupresión en ratones predominantemente de PMN y que este efecto es reversible por la acción sinérgica del factor estimulador de colonias de granulocitos (FEC-G) y de interleucina 1 (IL-1). Las células que sobreviven a la exposición con 5-FU, posteriormente aumentan su capacidad proliferativa sobrepasando los niveles normales y son capaces de producir neutrófilos con actividad bactericida normal (Donowitz y Quesenberry, 1986; Yaeger *et al.*, 1983). Solamente cuando se administran altas concentraciones de 5-FU y por largos periodos de tiempo, se llega a suprimir la producción de peróxidos y el estallido respiratorio de los PMN *in vitro* (Hara *et al.*, 1990; Ueta y Osaki, 1996). Kogut, *et al.*, (1993 y 1994) reportaron que el 5-FU produce granulocitopenia en pollos Leghorn de 2 semanas de edad.

A pesar de que en varios estudios se ha reportado la respuesta de los LPMN hacia las infecciones por coccidias, ya sea como células que se infiltran en forma masiva en los sitios de inflamación o con marcado daño (Ridell, 1987; Gregory, 1990), así como un aumento en los niveles sanguíneos (Rose *et al.*, 1979; Gross y Siegal, 1983), existen ciertas contradicciones al respecto, ya que no todos los autores lo reportan y la mayoría de las investigaciones se enfocan al estudio de las células linfocitarias que se infiltran en la mucosa intestinal, además ha sido poco estudiada la posible participación de los LPMN en infecciones de origen parasitario y se desconoce su comportamiento en las infecciones por *E. tenella*, así

como su participación como células blanco de citocinas provenientes de LT o macrófagos que contribuyan a explicar los mecanismos de protección que se han observado en los estudios anteriormente mencionados.

El presente estudio pretende aportar información sobre el comportamiento de los PMN sanguíneos durante la infección primaria con *E. tenella*, conocer si en presencia del parásito, existe alguna reacción de los PMN en aves testigo, así como en las que se indujo granulocitopenia mediante la administración de 5-FU, determinar si la infección es más severa en aves con granulocitopenia y finalmente contribuir con información relacionada a los mecanismos involucrados en la resistencia y la respuesta inmune del hospedero, en las infecciones por protozoarios del género *Eimeria*.

Objetivo general:

Evaluar el comportamiento de los leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica en pollos de engorda normales y granulocitopénicos durante la infección primaria con *Eimeria tenella*.

Objetivos particulares:

- 1.- Adecuar un modelo que disminuya los granulocitos de sangre periférica a niveles no detectables en pollos de engorda de 17 días de edad, mediante la administración de 5 fluorouracilo.
- 2.- Determinar el efecto del desafío con ooquistes de *E. tenella* a diferentes días después del tratamiento con 5-FU sobre la proporción de LPMN / L de sangre periférica en pollos granulocitopénicos, en comparación con el grupo testigo correspondiente.
- 3.- Determinar si la condición de granulocitopenia hace a las aves más susceptibles a la infección por *E. tenella*, mediante la evaluación del grado de severidad de las lesiones macroscópicas cecales y el número de ooquistes en ciegos.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron 343 pollitos de engorda mixtos, Peterson X Avian Farm de un día de edad provenientes de una incubadora comercial.¹ Los pollitos se criaron en jaulas dispuestas en batería eléctrica² en una de las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Al día de llegada de los pollitos se realizó un muestreo bacteriológico a partir del alimento, cama de las cajas de transporte, de hígado y del saco vitelino de 5 pollos tomados al azar. Al día 15 de edad las aves se distribuyeron aleatoriamente y se les asignó de la misma forma un tratamiento. A todas las aves se les proporcionó alimento balanceado de iniciación no medicado, con 22% de proteína cruda y 3100 Kcal/kg y agua *ad libitum* hasta el final del experimento. Se realizó un examen cualitativo a partir de heces para verificar la ausencia de coccidias al día 14 de edad (3 días antes de iniciar los experimentos).

Cepa MOR-80 de *Eimeria tenella*

Se utilizó una cepa de campo moderadamente patógena (MOR-80) de *Eimeria tenella* donada por el Dr. Reynaldo Moreno³. Los ooquistes fueron cosechados, esporulados y almacenados como describe Long *et al.* (1976).

Los pollos fueron infectados con 5 000 ooquistes esporulados de *E. tenella* en un volumen de 2.0 ml, mientras que los testigos fueron inoculados con un volumen igual de solución amortiguadora estéril. El inóculo fue cuantificado en un hematocitómetro (Long y

¹ Grupo Agropecuario Tepexpan S.A. de C.V.

² Petersime Brood-Unit; Petersime Incubator Company. Gettysburg Ohio U.S.A.

³ Departamento de Producción Animal: Aves, FMVZ., UNAM.

Rowell, 1958; Rose *et al.*, 1979; Kao y Ungar, 1994). y se administró vía oral por medio de una cánula que se introdujo hasta el ingluvies de cada pollo.

5 fluorouracilo

Se administró 5-FU^{*} a dosis única de 200 o 300 mg / kg de peso en la vena yugular de cada ave a los 17 días de edad, mientras que a las aves de los grupos testigos se les administró un volumen igual de solución amortiguadora estéril con un pH de 7.4.

Estudio hematológico

Se tomó una muestra de sangre por ave a la misma hora en cada uno de los días de muestreo y en el mismo orden de acuerdo a los grupos experimentales. La muestra se obtuvo por punción en la vena radial. En ambos conteos, se calculó el número de cada tipo celular de leucocitos / μ l de sangre por ave. Los resultados se presentan como los valores promedio de 10 aves por grupo por día de muestreo.

Conteo total de leucocitos

De cada ave, 0.1 ml de sangre fue vertida en un vial de vidrio con 1.9 ml del diluyente de Natt y Henrick previamente preparados, ambos se mezclaron suavemente para obtener una dilución 1:20, los frascos se almacenaron para su conteo posterior (Natt and Henrick 1952). El conteo del número total de leucocitos (NTL) se realizó por medio de un hematocitómetro, utilizando la siguiente fórmula (Terry, 1988):

$$\text{NTL} / \mu\text{l} = (\text{total de leucocitos en 9 cuadros} \times 1.1) \times 20$$

^{*} Roche, S.A. de C.V., México, D.F. 03310

Conteo diferencial de leucocitos

Simultáneamente al muestreo para el conteo total de leucocitos se tomó una gota de sangre y se hizo un frotis sanguíneo por pollo, éste se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se tiñó con el colorante de Wright. A partir de un total de 100 células de cada frotis se realizó el conteo diferencial entre células mononucleares y polimorfonucleares (Kogut, 1994). Las células se identificaron de acuerdo a la descripción de Lucas y Jamroz (1961).

Proporción de polimorfonucleares / leucocitos

En cada conteo, la proporción de polimorfonucleares / leucocitos totales fue determinada dividiendo el número de leucocitos polimorfonucleares entre el número de leucocitos totales por μl de sangre. Los leucocitos totales incluyen a los heterófilos, linfocitos, monocitos, basófilos y eosinófilos (Gross y Siegel, 1983).

Evaluación del grado de severidad de las lesiones macroscópicas en ciego

La severidad de las lesiones cecales fueron evaluadas en una escala de 0 a 4+, donde (0) = sin lesiones; (1+) = petequias sobre la pared cecal, contenido y paredes cecales normales; (2+) = mayor número de petequias, poca sangre en el contenido cecal y la pared del ciego ligeramente engrosada; (3+) = gran cantidad de sangre o exudado, la pared cecal muy engrosada, con poco o ningún contenido; (4+) = la pared cecal está muy distendida con sangre o exudado con apariencia caseosa y puede haber desechos fecales incluidos en el exudado (Johnson y Reid, 1970).

Conteo de ooquistes cecales

Los ciegos de 9 aves fueron repartidos en 3 subgrupos, cada subgrupo fue pesado y macerado en 20 ml de dicromato de potasio al 2.5%, de esta mezcla se tomaron 2 ml y se

aforó con dicromato de potasio al 2.5% hasta 30 ml en un frasco de vidrio el cual se conservó en refrigeración hasta su conteo (Long *et al.*, 1976; McDougal y Reid, 1991). Los ooquistes fueron cuantificados en un hematocitómetro (Long y Rowell, 1958; Rose *et al.*, 1979; Kao y Ungar, 1994; Trout y Lillehoj, 1995). El número promedio de ooquistes por subgrupo se obtuvo de 6 conteos, en cada un de los cuales se contó el número de ooquistes (NO) de los cuatro cuadros de las esquinas y el del centro de cada una de las dos celdas de la cámara y se utilizó la siguiente fórmula:

$$NO = \text{Número de ooquistes en 10 cuadros} \times C \times D \times V / g$$

$C = 10^3$ (para obtener el número de ooquistes / ml, de acuerdo a las dimensiones de la cámara)

$D = 15$ (factor de dilución, donde la dilución es 1:15)

$V = 20$ (ml de dicromato que se agregaron para el macerado de la muestra inicial)

g = peso en gramos de los 3 ciegos de un subgrupo y su contenido.

Diseño experimental

Experimento 1.

Determinación de la dosis óptima de 5-FU capaz de producir granulocitopenia severa en pollos de engorda de 17 días de edad. Se emplearon 50 pollitos, de los cuales 5 se utilizaron para realizar un muestreo bacteriológico y los 45 restantes al día 15 de edad fueron asignados aleatoriamente en tres grupos de 15 pollos cada uno, de los que se obtuvo una muestra basal de sangre para confirmar que las medias del conteo de LPMN total y diferencial de leucocitos entre grupos estuvieran en línea base. Los tratamientos se asignaron aleatoriamente a cada uno de los grupos y consistieron en la aplicación por vena yugular a los 17 días de edad de: A) grupo testigo, solución salina amortiguadora estéril, B) grupo tratado con una dosis única de 200 mg/kg de peso de 5-FU, C) grupo tratado con una dosis única de

300 mg/kg de peso de 5-FU. A los días 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 y 15 postratamiento (PT) con 5-FU se muestrearon 10 aves de cada grupo para realizar el conteo total y diferencial de leucocitos, los 5 pollos restantes en cada grupo se mantuvieron durante el experimento para prevenir que no faltaran lecturas.

Grupos	No. aves	Días de muestreo sanguíneo ^{PT}										
		5-FU 14 d.	1	3	5	6	7	8	9	10	12	15
Testigo	15	-	10 ⁿ	10	10	10	10	10	10	10	10	10
5-FU(200mg/kg)	15	+	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
5-FU(300mg/kg)	15	+	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

ⁿ = Número de aves muestreadas por día y por grupo

^{PT} = Postratamiento con 5-FU

Experimento 2.

Efecto del desafío con *E. tenella* en pollos testigos y granulocitopénicos a diferentes días después del tratamiento con 5-FU, sobre la proporción de LPMN / L_T circulantes. Se utilizaron 293 pollos, al igual que en el primer estudio 5 pollitos se utilizaron para realizar un muestreo bacteriológico y los 288 restantes fueron asignados a 4 grupos con 72 pollos cada uno. Los pollos y los tratamientos se asignaron aleatoriamente a cada uno de los grupos y consistieron en la aplicación del fármaco por vena yugular a los 17 días de edad y del parásito por vía oral a diferentes días después de la aplicación del fármaco: A) grupo testigo, solución salina amortiguadora estéril, B) grupo inoculado con solución amortiguadora estéril y desafiado con *E. tenella*, C) grupo tratado con una dosis única de 200mg/kg de peso de 5-FU, D) grupo tratado con una dosis única de 200mg/kg de peso y desafiado con *E. tenella*. A los días 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 12 y 15 PT con 5-FU se muestrearon 10 aves de cada grupo para realizar el conteo total y diferencial de leucocitos, los 2 pollos restantes en cada

grupo se mantuvieron durante el experimento para prevenir que no faltaran lecturas. A los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días después del tratamiento con 5-FU, 12 aves de cada grupo, fueron desafiadas por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella* o tratadas con el mismo volumen de solución amortiguadora estéril, en los grupos no infectados.

Determinación de la susceptibilidad a la infección con *E. tenella* en pollos bajo condiciones de granulocitopenia. Al séptimo día posinoculación fueron sacrificadas 9 aves de cada uno de los cuatro grupos, se evaluó el grado de severidad de las lesiones macroscópicas en uno de los ciegos de cada pollo, mientras que de otro ciego y su contenido se determinó el número de ooquistes.

Grupos	No. aves	5-FU 17 d.	2, 4, 6, 8, 10 y 12 ^{PT} <i>E. tenella</i>	12 ⁿ	Días de muestreo sanguíneo ^{PT}								
					1	3	5	7	8	9	10	12	15
A	72	-	-	12 ⁿ	10	10	10	10	10	10	10	10	10
B	72	-	+	12	10	10	10	10	10	10	10	10	10
C	72	+	-	12	10	10	10	10	10	10	10	10	10
D	72	+	+	12	10	10	10	10	10	10	10	10	10

ⁿ = Número de aves por grupo en cada día

^{PT} = Postratamiento con 5-FU

Análisis estadístico

Experimento 1.

Determinación de la dosis óptima de 5-FU que produjera granulocitopenia severa en pollos de engorda. Los valores de la proporción de LPMN / leucocitos totales por pollo fueron sometidos a una prueba de análisis de varianza (ANDEVA) con un diseño de parcelas divididas (Cody y Smith, 1991) y las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se evaluaron con la prueba de comparaciones múltiples de Scheffé por medio del paquete estadístico S.A.S. (Luginbuke, 1987).

Experimento 2.

Efecto del desafío con *E. tenella* en pollos testigos y granulocitopénicos a diferentes días después del tratamiento con 5-FU, sobre la proporción de LPMN / L_T de sangre periférica. Se realizó una prueba de ANDEVA, para determinar la diferencia entre las proporciones de LPMN / L_T de los cuatro grupos en cada día de infección con *E. tenella* durante los días de muestreo y las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos en relación con el grupo testigo se evaluaron con la prueba múltiple de Dunnett por medio del paquete estadístico S.A.S. (Luginbuke, 1987).

Determinación de la susceptibilidad a la infección con *E. tenella* en pollos bajo condiciones de granulocitopenia. Las diferencias del número de ooquistes en ciegos, así como del grado de severidad de las lesiones cecales de los grupos infectados con *E. tenella* después del tratamiento con 5-FU en comparación con los grupos que solamente fueron infectados con el parásito fueron analizadas con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se utilizó la prueba U de Mann-Witney para determinar las diferencias entre las medianas de los grupos (Zar, 1996).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

Experimento 1

En el estudio que se realizó para determinar la dosis óptima de 5-FU que produjera granulocitopenia severa en pollos de engorda de 17 días de edad se observó una disminución acelerada del número de leucocitos sanguíneos totales en los dos grupos tratados con 5-FU (Figura 4), el cual es un reflejo de la reducción del número de LPMN en sangre periférica (Figura 5). La proporción LPMN / L_T disminuyó dramáticamente a partir del día 1 postratamiento (PT) con 5-FU, registrándose los valores más bajos entre los días 7 y 10, principalmente al día 9 PT y los valores normales se recuperaron en relación al grupo testigo hasta el día 15 PT (Figura 6).

Se observó una diferencia estadísticamente significativa tanto entre tratamientos ($F=241.01$ y $gl=2$) como entre los días de muestreo ($gl=9$ y $F=51.3$) y de la interacción entre los tratamientos y los días de muestreo ($F=12.75$ y $gl=18$) ($P < 0.001$), esto significa: 1) que las dosis de 5-FU tienen diferentes efectos sobre la proporción de LPMN / L_T , 2) que la proporción de LPMN / L_T también cambia de acuerdo al tiempo y 3) que las dosis del 5-FU no actúan igual conforme transcurre el tiempo después de su administración.

Con la prueba de comparaciones múltiples de Scheffé se obtuvieron diferencias significativas en las proporciones de LPMN / L_T entre los grupos tratados con 5-FU ($P < 0.05$), así como entre estos cada uno de los grupos tratados ($F=3.354$, $gl=27$ y $DMS= 0.0141$) y el grupo testigo. También se observaron diferencias significativas entre los días de muestreo ($F=1.91854$, $gl=243$ y $DMS= 0.0683$) ($P < 0.05$) (Figura 6).

Experimento 2

En las proporciones de LPMN / L_T en sangre periférica en pollos de engorda desafiados con *E. tenella* a los 2 días después del tratamiento y no con 5-FU, al día tres PT se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en la proporción de LPMN / L_T en ambos grupos tratados con 5-FU, que posteriormente se normalizó al día 5 PT, y después disminuyó dramáticamente hasta el día 8 y 9 PT donde se registraron los niveles más bajos. Estas diferencias en las proporciones de LPMN / L_T se observaron durante todos los días de muestreo, con excepción del día 5 PT. Las medias de las proporciones de LPMN / L_T del grupo que únicamente fue infectado con *E. tenella* mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo a los días 1 y 6 después de la infección con *E. tenella*. (Figura 7).

En las aves desafiadas con *E. tenella* 4, 6, 8, 10 y 12 días PT y no con 5-FU, nuevamente aumentaron significativamente ($P < 0.05$) las proporciones de LPMN / L_T en la sangre periférica de las aves tratadas con 5-FU, que se normalizó al día 5 PT, para después disminuir a niveles muy bajos a los días 8 y 9 PT y recuperarse a partir del día 10 PT, además estas diferencias en las proporciones de LPMN / L_T se observaron durante todos los días de muestreo, con excepción de los días 5 y 12 PT. Las medias de las proporciones de LPMN / L_T del grupo que únicamente fue infectado con *E. tenella* mostraron un aumento bifásico ($P < 0.05$) a los días 1 o 2 y 5 o 6 después de la infección con *E. tenella* en la mayoría de los grupos infectados a diferentes días PT 5-FU, en comparación con grupo testigo correspondiente (Figuras 9, 11, 13, 15 y 17). En las aves infectadas solamente con *E. tenella* al día 10 posadministración de solución amortiguadora estéril, se observó un aumento en la proporción de LPMN / L_T , sin embargo no se encontró diferencia significativa en comparación con su grupo testigo (Figura 15).

En el análisis estadístico del grado de severidad de las lesiones cecales, así como en el número de ooquistes en ciego y en el contenido cecal no se incluyeron los resultados de los

grupos que no fueron infectados con el parásito por que no se encontraron lesiones cecales ni ooquistes en ninguna de las muestras y la diferencia con los grupos infectados era evidente.

Número de ooquistes después de la infección con *E. tenella* en aves testigo y tratadas con 5-FU. Se observó una mayor cantidad de ooquistes en los ciegos y en el contenido cecal de las aves tratadas con 5-FU e infectadas con *E. tenella* en comparación con los grupos que únicamente fueron infectados con el parásito, esta diferencia fue altamente significativa ($P=1.611^{-7}$, $U= 324$) en las aves infectadas con *E. tenella* 2 días PT con 5-FU (Figura 8). También se observaron diferencias en las aves infectadas con el parásito a los días 6 ($P=0.0000531$, $U=285.00$) (Figura 12) y 10 ($P=.0298596$, $U=222.00$) (Figura 16). En las aves infectadas a los 4 (Figura 10) y 8 días PT con 5-FU (Figura 14), no se observaron diferencias significativas, sin embargo el número de ooquistes producidos en las aves tratadas fue superior en comparación con el de las aves testigo.

En las aves infectadas a los 12 días PT con 5-FU se observó una menor producción de ooquistes en comparación con el grupo que no fue tratado con el 5-FU ($P=0.0001362$, $U=277.50$) (Figura 18).

Grado de severidad de las lesiones macroscópicas cecales. Las lesiones cecales fueron estadísticamente ($P<0.05$) más severas en las aves infectadas con *E. tenella* a los días 4 ($P=0.02515$, $U=63.0$) (Cuadro 2), 6 ($P=0.046956$, $U=60.0$) (Cuadro 3) y 10 ($P=0.0069853$, $U=67.5$) (Cuadro 5), después de haber sido tratadas con 5-FU en comparación con las aves que solamente se infectaron con *E. tenella*. Sin embargo, no se observaron diferencias en las lesiones de aves infectadas al día 2 (Cuadro 1), 8 (Cuadro 4) y 12 (Cuadro 6) PT con 5-FU.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En ambos experimento los valores en los L_T , así como en los LPMN del grupo testigo concuerdan con valores de referencia (Rose *et al.*, 1984; Sturkie, 1986).

Los 2 grupos tratados con 5-FU en el primer experimento, presentaron una disminución marcada de los LPMN totales a partir del día 1 PT, y llegó a sus niveles más bajos del día 7 al día 10, posteriormente recuperaron los niveles normales; estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kogut *et al.* (1993) y con Chabner y Myers (1985), quienes reportaron que después de la administración intravenosa de 5-FU, éste es rápidamente depurado del torrente sanguíneo y se difunde en todo el cuerpo; en contraste, tanto el 5-FU como sus metabolitos (5-FdUMP y FUTP) pueden persistir por períodos prolongados en algunos tejidos. En ratones, se ha demostrado que el metabolito activo del 5-FU persiste en la médula ósea y en células tumorales por 7 días, después de una sola inyección intravenosa (Chabner y Myers, 1985).

Además se observó un aumento de PMN por arriba de los niveles normales el día 15 lo cual es un reflejo del efecto reversible y compensatorio de las células progenitoras de PMN; esto concuerda con los resultados obtenidos en estudios anteriores realizados con ratones (Moore y Warren, 1987; Yaeger *et al.*, 1983). Sin embargo en el presente estudio se decidió reportar los resultados del número de leucocitos en sangre periférica expresado en la proporción de LPMN / L_T porque se consideró que ésta es menos variable que el número total para efectos del análisis estadístico, además de que la proporción refleja el efecto principal del 5-FU sobre los LPMN, ya que si el 5-FU actuara también sobre los leucocitos mononucleares, los valores de las proporciones de LPMN / L_T permanecerían igual y no disminuirían como se observó en el presente estudio.

En el grupo tratado con 300 mg / kg de peso de 5-FU, se observaron algunos signos adversos como caída de plumas, petequias, estomatitis y laceraciones en piel en algunos animales, la posología de este fármaco se basa en función del peso corporal (Haskell, 1995). Sin embargo, las aves empleadas en este estudio fueron más grandes y pertenecieron a una estirpe pesada a diferencia de las aves utilizadas por Kogut *et al.* (1993), además el fármaco que se utilizó se administró como solución inyectable (presentación comercial), lo que facilitó su biodisponibilidad, por lo que en este estudio la dosis tóxica fue igual o posiblemente menor a 300 mg / kg de peso.

Aunque Vetvicka *et al.* (1986) reportaron que en estudios *in vivo* e *in vitro* los linfocitos B de ratones fueron más sensibles al tratamiento con el 5-FU que los linfocitos T o la línea mieloide, los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con lo observado por Donowitz y Quesenberry (1986) y Yaeger *et al.* (1983), quienes reportan que el 5-FU disminuye el número de células precursoras de granulocitos en forma transitoria en ratones. Moore y Warren (1987) observaron una acción predominante del 5-FU sobre los LPMN, así como Kogut *et al.* (1993 y 1994) los cuales demostraron que el 5-FU produce granulocitopenia en pollos Leghorn de 2 semanas de edad. Posiblemente los LPMN son más susceptibles que otros leucocitos, debido a que su vida media es más corta. Los neutrófilos son células de supervivencia limitada, su vida media es de 2 a 3 días, mientras que otras células como los monocitos viven meses o incluso años (Roiit *et al.*, 1994). Las células de rápido crecimiento fijan mejor al 5-FU (Haskell, 1995); posiblemente la mayor susceptibilidad de los LPMN al 5-FU en aves sanas se deba a la mayor capacidad de replicación de sus células progenitoras.

En las aves los PMN se forman y se desarrollan exclusivamente en la médula ósea (Glick y Rosse, 1976), por lo que el uso de 5-FU puede servir como un modelo para estudiar y controlar la hematopoyesis en pollos normales, así como para estudiar el papel que desempeñan los PMN en diferentes procesos infecciosos.

En el segundo experimento se observó al día 3 PT un aumento en la proporción de LPMN / L_T únicamente en los grupos tratados con 5-FU en los diferentes días de infección con *E. tenella*, por lo que este efecto se atribuye al fármaco. Posteriormente, al día 5 PT las proporciones de LPMN / L_T disminuyeron y llegaron a niveles parecidos a los del grupo testigo, y continuaron descendiendo llegando a los niveles más bajos entre los días 8 y 9 PT. El día 10 PT marca el momento en el cual cesa el efecto del fármaco y comienzan a recuperarse los niveles normales de LPMN en sangre hasta el día 12 PT. Estos resultados confirman los resultados obtenidos en el experimento uno y además muestran que la presencia del parásito no es capaz de estimular la producción de LPMN por las células progenitoras que estaban bajo el efecto del fármaco.

En los grupos infectados únicamente con *E. tenella* 2, 4 y 6 días después de la administración de solución amortiguadora estéril se observó un incremento en las proporciones de LPMN / L_T a los días 1 o 2 y 5 o 6 posinfección en comparación con el grupo testigo. Rose *et al.*, (1979) observaron en pollos y ratas infectadas con *Eimerias* homólogas un incremento bifásico de leucocitos en la sangre periférica a los días 3 y 10 y 6 y 13 días posinfección, respectivamente. Posteriormente, Rose *et al.* (1984b) reportaron un incremento bifásico de leucocitos y principalmente de heterófilos, en pollos de 4 semanas de edad, minutos y horas después de la infección con *E. maxima*. Martin *et al.* (1993) reportaron que tanto los esporozoitos como los merozoitos inducen una alta proliferación de linfocitos en sangre periférica después de una infección primaria; sin embargo, los merozoitos provocan una respuesta proliferativa.

El aumento bifásico en la proporción de LPMN / L_T observado en el presente estudio se puede asociar con el momento en que los esporozoitos de *E. tenella* se liberan del ooquiste e invaden la célula del hospedero y con el día en el que la segunda generación de merozoitos se libera de las células hospederas y produce el mayor daño tisular. Posiblemente el incremento de LPMN en sangre esté relacionado con la movilización al sitio de infección y con la fagocitosis de etapas extracelulares del parásito, debido a que una de las funciones de

los LPMN es remover detritos celulares (Weiss, 1989). La liberación de merozoitos está asociada además, con la mayor liberación de material antigénico de la célula infectada (Long, 1990). Sin embargo, este aumento de los LPMN puede ser un medio para promover el contacto entre las células efectoras del hospedero y el parásito.

Con excepción del día 12 PT, en todos los grupos tratados con el 5-FU se observó mayor producción de ooquistes en comparación con el grupo testigo respectivo, aunque no en todos se encontró diferencia significativa, sin embargo el grupo infectado con el parásito 2 días después del tratamiento con 5-FU presentó la mayor diferencia ($P < 0.001$) en comparación con su grupo testigo correspondiente, lo cual puede deberse a que coincide con el momento de mayor acción del fármaco sobre las células progenitoras de los LPMN y por lo que no aumentan en sangre y posiblemente tampoco en el sitio de infección, lo cual puede favorecer la subsistencia y conclusión del ciclo del parásito. En los días posteriores de infección con el parásito, aunque se presenta diferencia, esta no es tan marcada debido a que el tiempo entre la infección y el período de prepatencia del parásito rebasan el momento en que el fármaco tiene su mayor acción sobre las células progenitoras de los LPMN.

Se observó una menor producción de ooquistes en el grupo infectado 12 días PT con 5-FU en comparación con su grupo testigo, esto posiblemente se deba a que en el momento de la infección los niveles de LPMN en sangre periférica de las aves tratadas eran superiores a los de las aves testigo (aunque no se determinó por cuánto tiempo duró este efecto compensatorio).

No se observó una relación entre la producción de ooquistes y la severidad de las lesiones en ciegos, éstas sólo fueron más severas en las aves infectadas a los días 4, 6 y 10 PT con 5-FU en comparación con las aves que solamente se infectaron con *E. tenella*.

Conclusiones

El 5-FU tiene un efecto tóxico, selectivo y reversible sobre los LPMN de pollos de engorda al ser administrado por vía intravenosa a dosis de 200 mg / kg de peso.

La dosis de 300 mg de 5-FU / kg de peso provocó signos de toxicidad en las aves.

La condición de granulocitopenia en el pollo de engorda incrementó la severidad de las infecciones primarias con *E. tenella*, aumentando la producción de ooquistes y el grado de severidad de las lesiones cecales.

Los PMN posiblemente actúen fagocitando etapas tempranas y asexuales del ciclo del parásito en las infecciones primarias por *E. tenella*.

La mayoría de las investigaciones relacionadas con la respuesta inmunológica del hospedero contra las infecciones por coccidias se enfocan a estudiar el papel de los linfocitos, sin embargo, los LPMN también participan en estas infecciones. Es necesario realizar estudios para determinar la naturaleza de los estímulos que inducen la movilización y el aumento en los LPMN en sangre periférica, así como su destino y su función en las infecciones parasitarias y en particular en las infecciones por *E. tenella*.

CAPÍTULO 5

LITERATURA CITADA

- 1) Atwal OS and McFarland LZ. A Morphologic and cytochemical study of erythrocytes and leukocytes of *Coturnix coturnix japonica*. *Am. J. Vet. Res.*, 27:1059-1065 (1966).
- 2) Bradley RE and Radhakrishnan CV. The role of cecal microbial flora in cecal coccidiosis in chickens. *Poult. Sci.*, 52:2001 (1973).
- 3) Borges GM. Panorama general de la coccidiosis en México. Curso de actualización sobre coccidiosis aviar. 1994 22-26; México, D.F: *Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA)* 1994.
- 4) Breed DG, Dorrestein J and Vermeulen AN. Immunity to *Eimeria tenella* in chickens: phenotypical and functional changes in peripheral blood T-cell subsets. *Avian Dis.* 40(1):37-48 (1996).
- 5) Brune K and Spintzanagel JK. Peroxidase less chicken leukocytes: isolation and characterization of antibacterial granules. *J. Infect. Dis.*, 127:84-94 (1973).
- 6) Byrnes S, Eaton R y Kogut M. *In vitro* interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha production by macrophages from chickens infected with either *Eimeria maxima* or *Eimeria tenella*. *Int. J. Parasitol.*, 23:639-645 (1993).
- 7) Carlson HC. The acute inflammatory reaction in chicken breast muscle. *Avian Dis.*, 16:553-558 (1972).
- 8) Chabner BA and Myers CE. Clinical pharmacology of cancer chemotherapy. In: *Cancer Principles & Practice of Oncology*. Edited by: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, 2nd. ed. pp 287 y 196-298. *J.B. Lippincott Company*. Vol. 1, Philadelphia, Pennsylvania, 1985.
- 9) Chu E, Johnson PG, Green JL, Takimoto CH, Groeningen CV, Chabner BA and Allegra CJ. Antimetabolites Chapter 1. In: *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers Annual* 15. Pinedo HM, Longo DL and Chabner BA. pp. 12-18. *Elsevier Science B.V.*, Amsterdam, The Netherlands, 1994.
- 10) Cody RP and Smith J. *Applied Statistics and the SAS Programming Language*. Third edition. *Elsevier Science Publishing Co., Inc.* New York, USA., 1991.
- 11) Davis P.J. Immunity to coccidia. In: Rose ME, Payne LN y Freeman BM. *Avian Immunology*. *British Poultry Science Symposium* No. 16 Edinburgh, 361-385 (1981).
- 12) Dinarello CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response. *N. Engl. J. Med.*, 311:1413 (1984).

- 13) Donowitz GR and Quesenberry P. 5-fluorouracil effect on cultured murine stem cell progeny and peripheral leukocytes. *Exp. Hematol.*, 14(3):207-214 (1986).
- 14) Dunnington EA, Gross WB, Martin A, and Seigel PB. Response to *Eimeria tenella* of chickens selected for high or low antibody response and differing in haplotypes at the major histocompatibility complex. *Avian Dis.* 36:49-53 (1992).
- 15) Durum SK, Schmidt JA and Oppenheim JJ. Interleukin 1: an immunological perspective, *Annu. Rev. Immunol.*, 3:263 (1985).
- 16) Ferguson A. Pathogenesis and mechanisms in the gastrointestinal tract, in Proc. 1st Food Allergy Work-shop, *Medical Education Services*, Oxford, 1979.
- 17) Fernando MA and McCraw BM. Mucosal morphology and cellular renewal in the intestine of chickens following a single infection of *Eimeria acervulina*. *J. Parasitol.*, 59:493 (1973).
- 18) Fernando MA. Pathology and pathogenicity, in: *The Biology of the Coccidia*, Long, P.L., chap. 7. *Edward Arnold*, London., 1982.
- 19) Fernando MA and Parsternak J. *Eimeria necatrix*: induced proteolytic sensitivity of infected chick crypt cell. *Exp. Parasitol.* 56(1):20-26 (1983a).
- 20) Fernando M.A, Lawn AM, Rose ME y Al-Attar MA. Invasion of chicken caecal and intestinal lamina propria by crypt epithelial cells infected with coccidia. *Parasitol.* 86:391-398 (1983b).
- 21) Fernando MA, Rose ME and Millard BJ. *Eimeria spp.* of domestic fowl: The migration of sporozoites intra- and extra-enterically. *J. Parasitol.*, 73:(3) 561-567 (1987).
- 22) Fujii S and Shirasaka T. Development of fluoropyrimidine derivatives *Gan. To. Kagaku. Ryoho.*, 11(11):2316-2328 (1984).
- 23) García EG. Inmunoprofilaxis y caracterización parcial de linfocinas en la protección de la coccidiosis aviar. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias. *Div. Est. Pos. e Inv. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1995.
- 24) Giambrone JJ, Johnson LW and Kleius PH. Development of cell-mediated immunity and resistance to clinical coccidiosis infection in chickens selected for resistance and susceptibility to *Eimeria tenella*. *Poult. Sci.* 63(11):2162-2166 (1984).
- 25) Glick B and Rose C. Cellular composition of the bone marrow in the chicken. Identification of cells. *Anat. Rec* 185:235-246 (1976).
- 26) Gregory MW. Pathology of coccidial infections. In: Long PL. *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. U.S.A., *CRC Press*, 236-261 1990.
- 27) Gross BW and Siegel HS. Evaluation of the heterophil / lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis.* 27(4):972-979 (1983).

- 28) Hara N, Ichinose Y, Motohiro A, Kuda T, Aso H y Ohta M. Influence of chemotherapeutic agents on superoxide anion production by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer*, 66(4):684-688 (1990).
- 29) Haskell MC, Antineoplastic Agents in Cancer treatment. Fourth edition. *W.B. Saunders Company*. Philadelphia, Pennsylvania, 1995.
- 30) Jeurissen SH, Jane EM, Vermeulen AN y Vervelde L. *Eimeria tenella* infections in chickens: aspects of host-parasite: interaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54(1-4):231-238 (1996).
- 31) Johnson J and Reid WM. Anticoccidial drugs; Lesion scoring techniques in battery and floorpen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 28:30-36 (1970).
- 32) Kao T and Ungar LP. Comparison of sequential, random and Hemacytometer methods for counting *Cryptosporidium* oocysts. *J. Parasitol.*, 80(5):816-819 (1994).
- 33) Kheysin YN. Life cycles of Coccidia of Domestic Animals. *University Park Press*, 1972.
- 34) Kogut HM and Long LP. The effect of silica injections on the rejection of *Eimeria* from nonspecific hosts. *J. Parasitol.* 67(6):960-961 (1981).
- 35) Kogut MH and Lange C. Interferon- γ -mediated inhibition of the development of *Eimeria tenella* in cultured cells. *J. Parasitol.* 75:313-317 (1989).
- 36) Kogut HM and Eirmann L. The effect of cyclosporin A on the development of *Eimeria* in non-specific host. *International J. Parasitol.*, 21: (8) 979-983 (1991).
- 37) Kogut HM and Slajchert T. T-lymphocytes confer protection in chickens against *Eimeria tenella* by production of lymphokines. *Immunol. Infect. Dis.* 2:69-79 (1992).
- 38) Kogut HM, Tellez IG, Hargis MB, Corrier ED and DeLoach RJ. The effect of 5-fluorouracil treatment of chicks: A cell depletion model for the study of avian polymorphonuclear leukocytes and natural host defenses. *Poult. Sci.* 72:1873-1880 (1993).
- 39) Kogut HM, Hargis MB, Corrier ED and DeLoach RJ. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. *Microb. Pathog.*, 16:141-151 (1994).
- 40) Kogut HM, McGruder ED, Hargis MB, Corrier ED, DeLoach RJ. *In vivo* activation of heterophil function in chicken following infection with *Salmonella enteritidis* immune linphopenic. *J. Leukoc. Biod.*, 57:56-62 (1995).
- 41) Kogut HM, Moyes BR, y DeLoach RJ. Las citocinas y sus interacciones funcionales: Potenciación de la respuesta inflamatoria en el control de infecciones sistémicas por *Salmonella* en aves. Memorias del curso de avances sobre inmunología aviar. México, D.F. pp. 8-12, *Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*. México, D.F., (1996).

- 42) Kronke M, Leonard WJ, Depper JM, Arya SK, Wong-STau F, Gallo RC, Waldmann TA and Green WC. Cyclosporine A inhibits T cell growth factor at the level of mRNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:5214 (1984).
- 43) Latimer KS, Harmon BG, Glisson JR, Kircher IM and Brown J: Turkey heterophil chemotaxis to *Pasteurella multocida* (serotype 3,4) generated chemotactic factors. *Avian Dis.* 34:137-140 (1990).
- 44) Lawn AM and Rose ME. Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken. *J. Parasitol.*, 68:1117-1123 (1982).
- 45) Lillehoj HS. Effects of immunosuppression on avian coccidiosis: Cyclosporin A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infect. Immun.*, 55:(7) 1616-1621 (1987).
- 46) Lillehoj HS. Intestinal intraepithelial and splenic natural killer cell responses to Eimerian infections in inbred chickens. *Infect. Immun.*, 57:(7) 1879-1884 (1989).
- 47) Lillehoj HS and Trout JM. Coccidia: A review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathol.* 22:3-31 (1993).
- 48) Lillehoj HS y Trout JM. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clin Microbiol. Rev.* 9(3):349-360 (1996).
- 49) Long PL and Rowell JG. Counting oocysts of chicken coccidia. *Lab. Pract.* 7:515-534 (1958).
- 50) Long PL, Millard BJ, Joyner LP and Norton CC. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet. Lat.*, 6:201-217 (1976).
- 51) Long PL. The biology of the coccidia. *University Park Press. Inc.*, Boca Raton, Florida, 1984.
- 52) Long PL. Coccidiosis of Man and Domestic Animals. *CRC Press*, U.S.A., 1990.
- 53) Lozanov L and Koinrski V. Morphology and histokinesis of the changes in turkey poults caused by an experimental *Eimeria adenoides* infection. *Vet. Sci.*, 22:43 (1985).
- 54) Lucas AM and Jamroz C. Atlas of Avian Hematology. *Unite States Department of Agriculture, (U.S.D.A.)* Washington, D.C., 1961.
- 55) Luginbuke RC and Schlotzhaver SD. SAS / STAT Guide For Personal Computers. 6th ed. *SAS Institute*, Cary, N.C., 1987.
- 56) Martin A, Lillehoj HS, Kaspers B y Bacon LD. Antigen-specific T cell proliferation following coccidia infection. *Poult. Sci.* 72(11):2084-2094 (1993).
- 57) McDougal RL and Reid MW. Coccidiosis. In: Diseases of Poultry. Edited by Calnek BW, Barnes HJ, Reid MW and Yoder HW; 9th ed. pp. 780-787. *Iowa State University Press.* Ames Iowa, USA., 1991.

- 58) Ming WJ, Bersani L and Mantovani A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Immunol.* 138:1474-1480 (1987).
- 59) Molineux G, Migdalska A, Haley J, Evans G and Dexter M. Total marrow failure induced by pegylated stem-cell factor administered before 5-fluorouracil. *Blood*, 83(12):3491-3499 (1995).
- 60) Moore MAS and Warren DJ. Synergy of interleukin-1 and granulocyte colony stimulating factor *in vivo* stimulation of stem cell recovery and hematopoietic regeneration following 5-fluorouracil treatment of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:7134-7138 (1987).
- 61) Moreno DR. Enfermedades parasitarias de las aves, Tomo II 2ª ed. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM*. México, D.F., 1989.
- 62) Moreno DR. Endoparásitos más frecuentes en las gallinas. Memorias de la III Jornada Médico Avícola. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM*. México, D.F. pp. 146-148, 1992.
- 63) Mosqueda TA. Generalidades de coccidiosis. Curso de actualización: Coccidiosis Aviar. México, D.F.; 1989. *Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*. México, D.F., (1989).
- 64) Natt PM and Herrick AC. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poult. Sci.* 31:735-738 (1952).
- 65) Onaga H and Ishii T. Effects of chicken anti-*Eimeria tenella* serum on the phagocytosis of sporozoites and merozoites by chicken peritoneal macrophages. *Jp. J. Vet. Sci.* 42:211-219 (1980a).
- 66) Onaga H and Ishii T. Leukocyte migration inhibition in chickens immunized with *Eimeria tenella*. *Jp. J. Vet. Sci.* 42:345-351 (1980b).
- 67) Ophir A, Berenshtein E, Ziltener HJ y Razin E. 5-fluorouracil and mast cell precursors in mice. *Exp. Hematol.* 21:1558-1562 (1993).
- 68) Pellerdy LP. Coccidia and coccidiosis. 2nd ed., *Verlag Paul Parey*. Berlin, 1974.
- 69) Pizzorno G, Sun Z and Handschumacher RE. Aberrant cell cycle inhibition pattern in human colon carcinoma cell lines after exposure to 5-fluorouracil. *Biochem. Pharmacol.* 49:553-557 (1995).
- 70) Powell PC. Immune mechanisms in infections of poultry. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15:87-113 (1987a).
- 71) Powell PC. Macrophages and other nonlymphoid cells contributing to immunity. *Avian Immunology: Basis and Practice*. Vol I A. y P., *CRC Press*, Boca Raton, FL, 1987b.
- 72) Riddell C. Avian histopathology. *Allen Press Inc*. Lawrence, Kansas, 1987.

- 73) Roitt J, Brostoff J. Inmunología. Séptima edición. *Médica Panamericana, S.A.* Buenos Aires, Argentina, 1994.
- 74) Rose ME and Long PL. Resistance to *Eimeria* infections in the chicken: the effects of thymectomy, bursectomy, whole body irradiation and cortisone treatment. *Parasitol.* 60:291 (1970).
- 75) Rose ME, Hesketh P y Ogilvie BM. Peripheral blood leukocyte response to coccidial infection: a comparison of the response in rats and chickens and its correlation with resistance to reinfection. *Immunol.* 36:71-79 (1979).
- 76) Rose ME and Hesketh P. Coccidiosis: T-lymphocyte-dependent effects of infection with *Eimeria nieschulzi* in rats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 3:499 (1982).
- 77) Rose ME, Lawn AM and Millard BJ. The effect of immunity on the early events in the life cycle of *Eimeria tenella* in the caecal mucosa of the chicken. *Parasitol.* 88:199-210 (1984a).
- 78) Rose ME, Hesketh P and Rennie M. Coccidiosis: Rapid depletion of circulating lymphocytes after challenge of immune chickens with parasite antigens. *Infect. Immun.* 45:166-171 (1984b).
- 79) Rose ME. Immunity to *Eimeria* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17:333-343 (1987).
- 80) Rose ME, Hesketh P and Wakelin D. Immune control of murine coccidiosis: CD4+ or CD8+ T lymphocytes, contribute differentially in resistance to primary and secondary infections. *Parasitol.*, 105: 349-354 (1992).
- 81) Rothwell L, Gramzinski RA, Rose ME y Kaiser P. Avian coccidiosis: changes in intestinal lymphocyte populations associated with the development of immunity to *Eimeria maxima*. *Parasite. Immunol.* 17:525-533 (1995).
- 82) Ruff MD and Fuller HR. Some mechanisms of reduction of carotenoid levels in chicken infected with *Eimeria acervulina* or *E. tenella*. *J. Nutr.*, 105:1447 (1975).
- 83) Ruff MD. Malabsorption from the intestine of birds with coccidiosis. In: Avian Coccidiosis. Edited by: Long PL, Boorman KN and Freeman BM. Eds. Br. Poultry Sci., Edinburgh, 1978.
- 84) Ruiz H. Coccidiosis Aviar. *Universidad Central de Venezuela.* Caracas, Venezuela, 1990.
- 85) Schildknecht E. The effect of antimicrobials on the performance and microbial flora of coccidiosis infected and non-infected chickens. 19th World Poultry Congress. Amsterdam, Netherlands, 1992. In: Ibarra B y Cortés R. Interacción de las coccidias y de los anticoccidiales en la nutrición del pollo de engorda. Curso de actualización sobre coccidiosis aviar. *Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas.* México, D.F. (1994).
- 86) Shimamura M, Koboyashi Y, Yuo A, Urabe A, Okabe T, Komatsu Y, Itoh S, Takaku F. Effect of human recombinant granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic injury in mice induced by 5-fluorouracil. *Blood*, 69:353-355 (1987).

- 87) Stabler JG, McCormick TW, Powell KC and Kogut MH. Avian heterophils and monocytes: phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*. *Vet. Microbiol.*, 38:293-305 (1994).
- 88) Sturkie PD and Griminger P. Body fluid blood. In: Avian Physiology. 4th ed. Edited by Sturkie, P.D., 102-121. *Springer-Verlag*, New York, U.S.A., 1986.
- 89) Suga S, Kimura K, Kubo K, Aoyama H, Inukai N, Kato K, Horiuchi T, Sawada H y Yokoyama Y. Mode of action of fluoropirimidinas in relation to their clinical application. *Gan. To. Kagaku. Ryoho.*, 11:2301-2306 (1984).
- 90) Talebi A y Mulchy G. Correlation between immune responses and oocyst production in chickens monospecifically infected with *Eimeria maxima*. *Avian Pathol.*, 24:485-495 (1995).
- 91) Terry WC. Avian Hematology and Cytology. Iowa, Florida. *Iowa State University Press*. Ames, Iowa, pp 9-27., 1988.
- 92) Topp RC and Carlson HC. Studies on avian heterophils. II. Histochemistry. *Avian Dis.*, 16:369-373 (1972a).
- 93) Topp RC and Carlson HC. Studies on avian heterophils. III. Phagocytic properties. *Avian Dis.*, 16:374-380 (1972b).
- 94) Trout JM y Lillehoj HS. *Eimeria acervulina*: Evidence for the involment of CD8+ T lymphocytes in sporozoites transport and host protection. *Poult. Sci.* 74(7): 1117-1125 (1995).
- 95) Trout JM y Lillehoj HS. T lymphocyte roles during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 53(1-2):163-172 (1996).
- 96) Turk DE. The effects of coccidiosis on intestinal function and gut microflora. In: Avian Coccidiosis. Edited by: Long, P.L., Boorman, K.N. and Freeman, B.M., *Eds. Br. Poultry Sci.*, Edinburgh, 1978.
- 97) Ueta E y Osaki T. Suppression by anticancer agents of reactive oxygen generation from polymorphonuclear leukocytes. *Free. Radic. Res.* 24(1):39-53 (1996).
- 98) Vervelde L, Vermeulen AN y Jeurissen SHM. Common epitopes on *Eimeria tenella* sporozoites and cecal epithelium of chickens. *Infect. Immun.*, 61(10):4504-4506 (1993).
- 99) Vervelde L, Vermeulen AN y Jeurissen SHM. Common epitopes on *Eimeria tenella* sporozoites and cecal epithelium of chickens. *Parasite Immunol.*, 18(5):247-256 (1996).
- 100) Vetvicka V, Kincade WP y Witte LP. Effects of 5-fluorouracil on B lymphocyte lineage cells. *J. Immunol.* 137(8):2405-2410 (1986).
- 101) Wakelin D and Rose ME. Immunity to coccidiosis. In: Long PL. *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. U.S.A., *CRC Press*, 282-306 1990.

- 102) Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320:365 (1989).
- 103) Witlock DR and Brimfield AA. Further studies on toxic extracts from *Eimeria tenella*-infected chicken ceca. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 49: 305 (1982).
- 104) Yaeger AM, Levin J and Levin FC. The effects of 5-fluorouracil on hematopoiesis: studies of murine megakaryocyte-CFC, granulocyte-macrophage CFC, and peripheral blood cell levels. *Exp. Hematol.* 11(10):944-952 (1983).
- 105) Zar HJ. Bioestatistical Analysis. Third edition. *Prentice Hall, Inc.* Upper Saddle River, New Jersey, 1996.
- 106) Zhang S, Lillehoj HS y Ruff MD. Chicken tumor necrosis-like factor. *In vitro* production by macrophages stimulated with *Eimeria tenella* or bacterial lipopolysaccharide. *Poult. Sci.* 74:1304-1310 (1995).

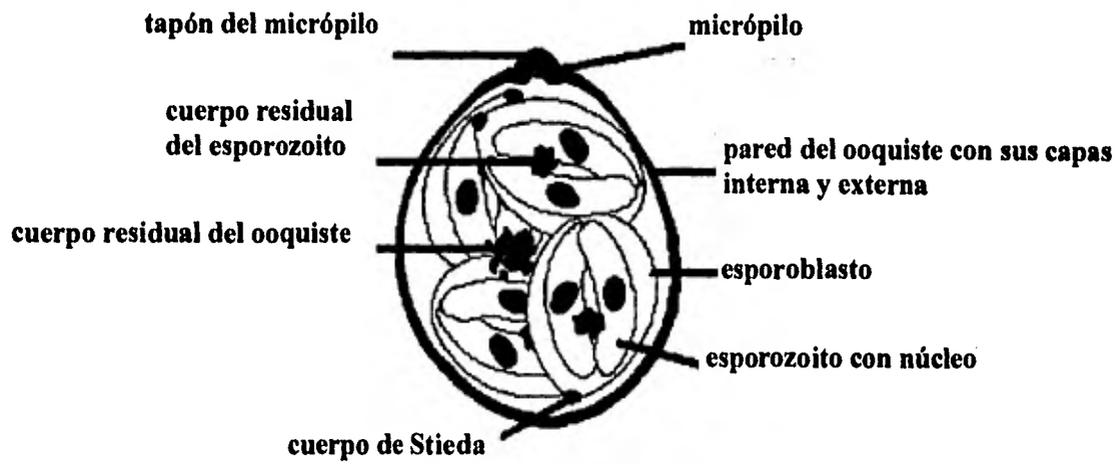


Figura 1.- Diagrama de un ooquiste esporulado del género *Eimeria*.

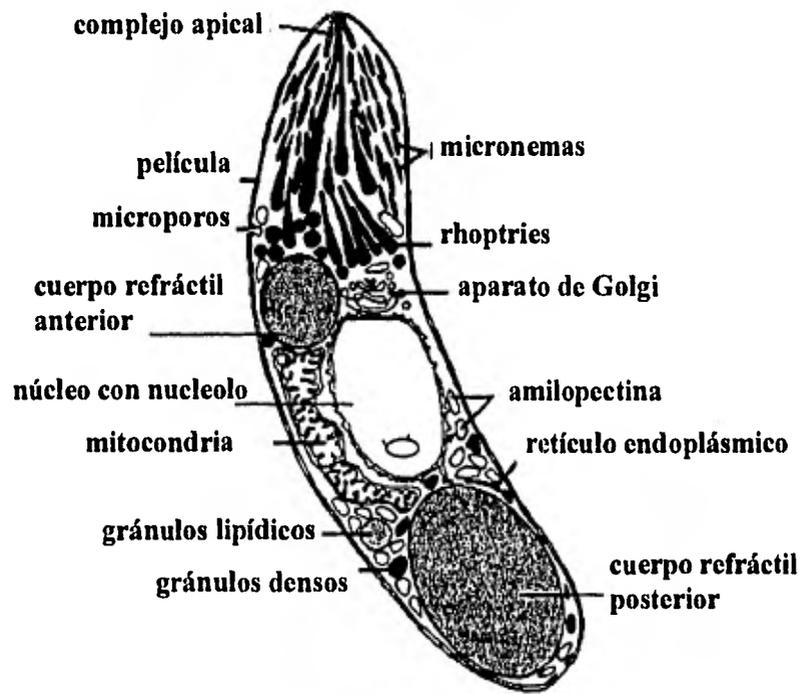


Figura 2.- Estructura de un esporozoito del género *Eimeria tenella*

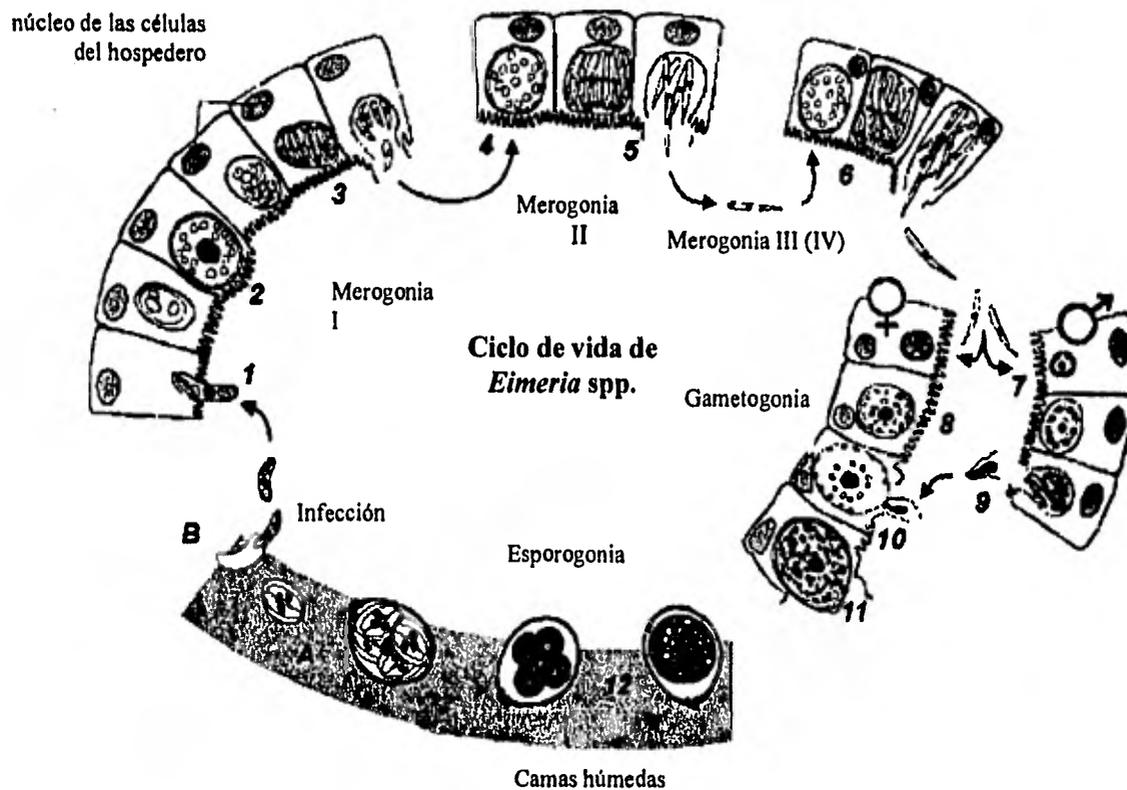
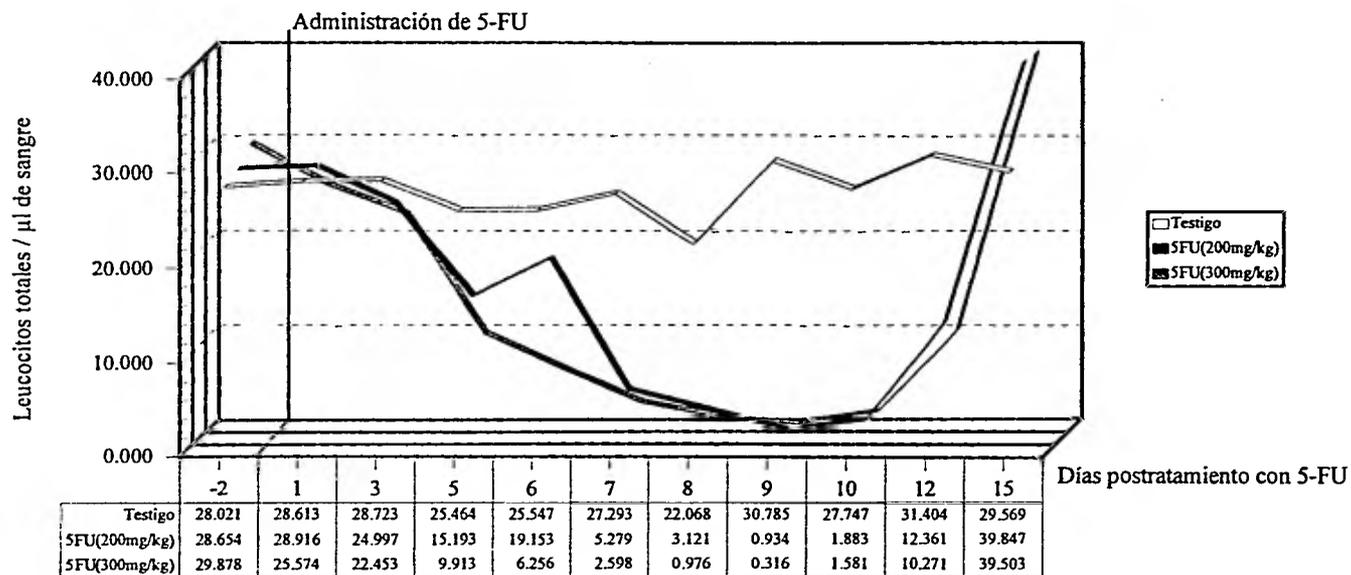


Figura 1.- Ciclo de vida de *Eimeria* spp.

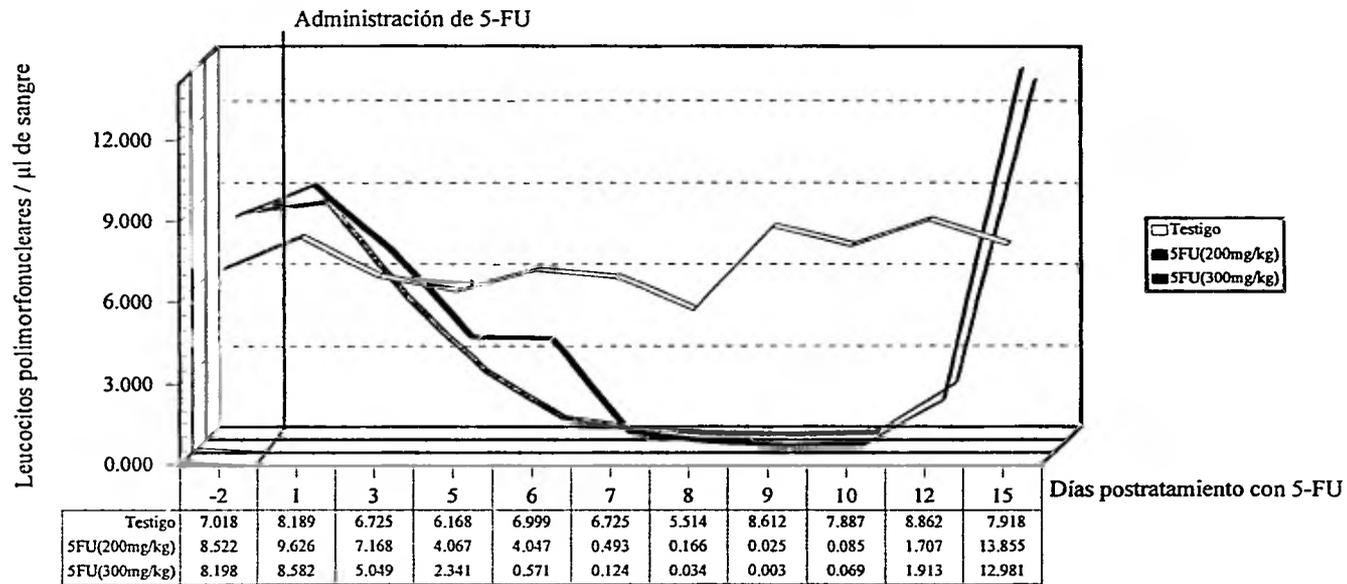
- A.- Liberación de esporoblasto.
- B.- Liberación de esporozoitos.
- 1.- Entrada de los esporozoitos a las células epiteliales del intestino.
- 2 y 3.- Desarrollo a esquizontes de primera generación.
- 4.- Destrucción celular por la liberación de merozoitos de primera generación.
- 5.- Formación de esquizontes de segunda generación.
- 6.- Liberación de los merozoitos de segunda generación, algunas especies pueden desarrollar merogonias de cuarta generación.
- 7.- Gametos masculinos (Microgamontes).
- 8.- Gametos femeninos (Macrogamontes).
- 9 y 10.- Penetración de los microgametos a los macrogametos y formación de un cigoto intracelular.
- 11.- Salida del ooquiste no esporulado de la célula hospedera que es desechado en las heces.
- 12.- Esporulación de los ooquistes.

Figura 4. Efecto de la administración intravenosa de 5 fluorouracilo sobre el número de leucocitos en sangre periférica de pollos de engorda



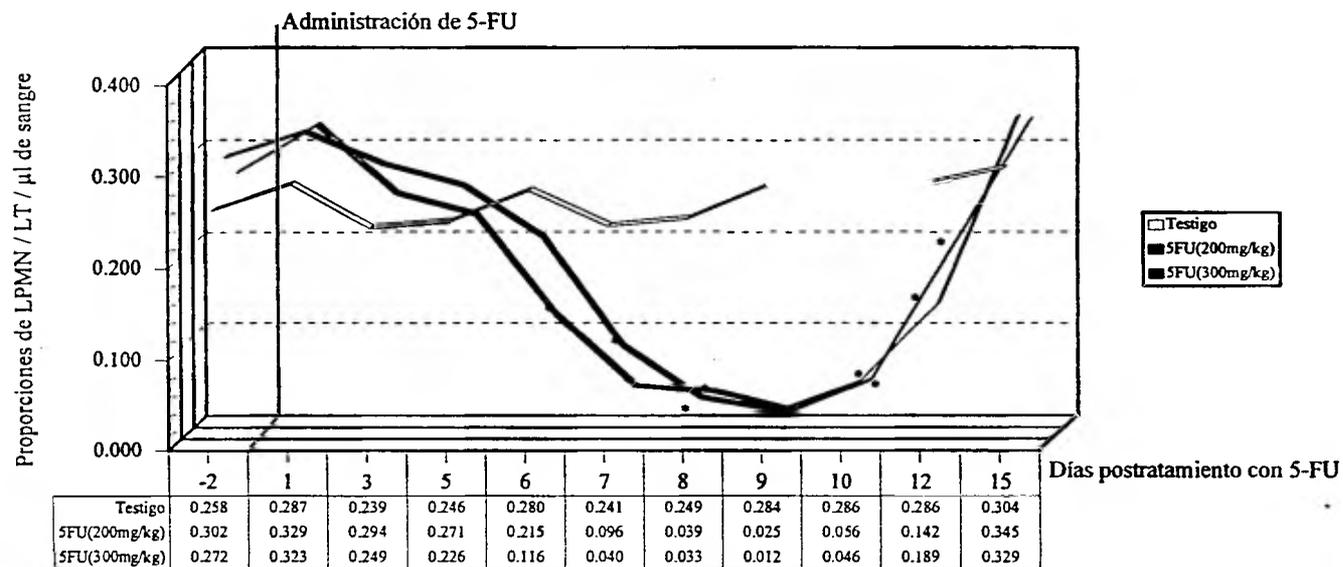
Efecto de la administración única por vía intravenosa de 200 o 300 mg de 5 fluorouracilo (5-FU) / kg de peso sobre el número de leucocitos totales en sangre periférica de pollos de engorda de 17 días de edad (día 0), a los días 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 y 15 días postratamiento con 5-FU. Los valores en cada uno de los diferentes días de muestreo son el promedio de 10 aves por grupo.

Figura 5. Efecto de la administración intravenosa de 5 fluorouracilo sobre el número de leucocitos polimorfonucleares en sangre periférica de pollos de engorda



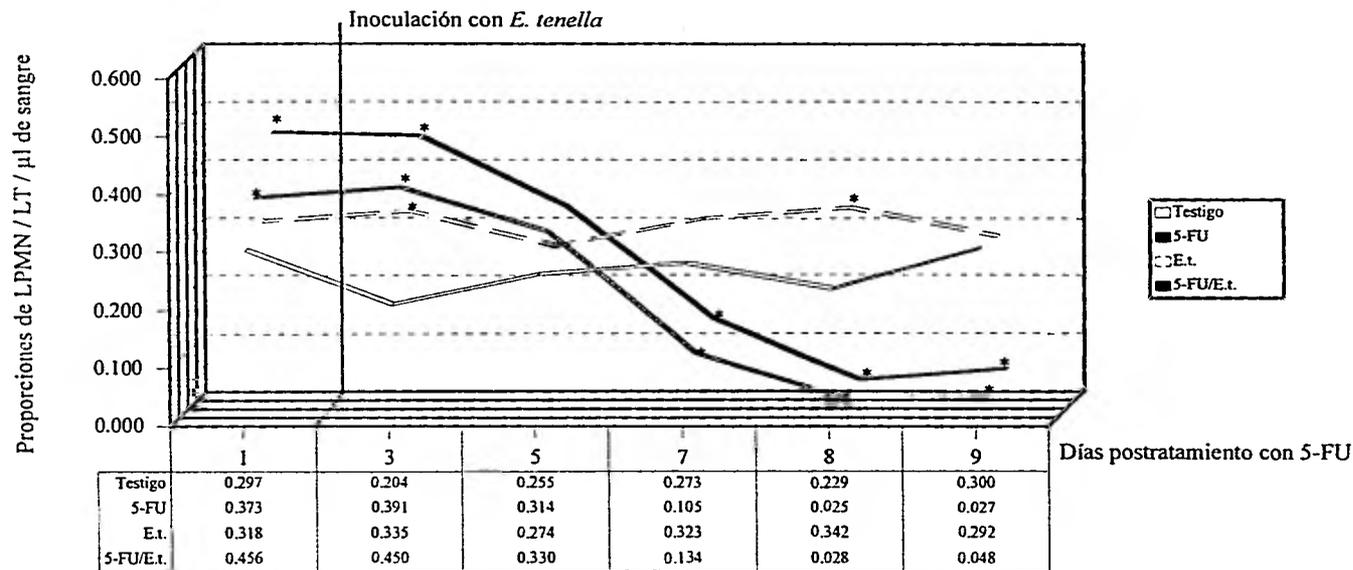
Efecto de la administración única por vía intravenosa de 200 o 300 mg de 5 fluorouracilo (5-FU) / kg de peso sobre el número de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) en sangre periférica de pollos de engorda de 17 días de edad (día 0), a los días 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 y 15 postratamiento con 5-FU. Los valores en cada uno de los diferentes días de muestreo son el promedio de 10 aves por grupo. Dos días antes de la administración de 5-FU, se realizó un muestreo y un análisis estadístico para confirmar que las medias del número de LPMN de los tres grupos estuvieran en línea base.

Figura 6. Efecto de la administración intravenosa de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos de engorda



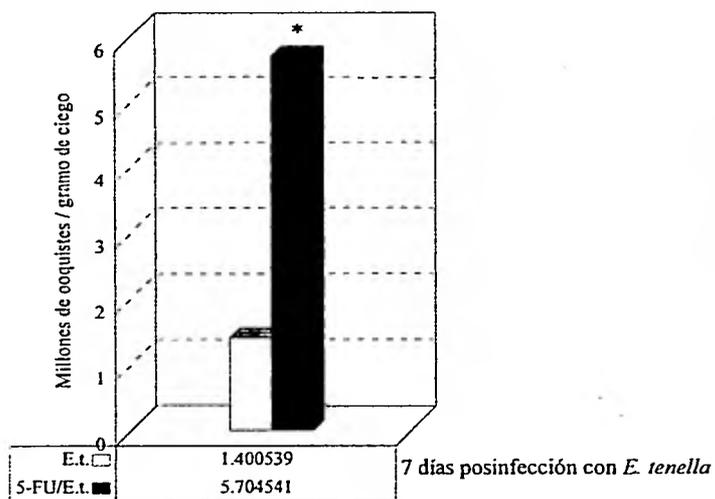
Proporción de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) / leucocitos totales (LT) en pollos de engorda testigos y tratados con una dosis única de 200 o 300 mg de 5 fluorouracilo (5-FU)/ kg de peso a los 17 días de edad (día 0). Las proporciones de LPMN / Lt de 10 aves por grupo fueron sometidos a una prueba de ANDEVA, con un diseño de parcelas divididas y las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se evaluaron con la prueba de comparaciones múltiples de Scheffé. Se observó que 5-FU tiene un efecto dosisdependiente sobre la proporción LPMN / Lt, además de que no actúa igual sobre los LPMN conforme transcurre el tiempo después de su aplicación, por lo que las proporciones cambian a largo del período de muestreo en ambos grupos tratados en comparación con el grupo testigo ($P < 0.05$).

Figura 7. Efecto de la infección con *E. tenella* 2 días después de la administración de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos de engorda



Proporciones de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) / leucocitos totales (LT) en sangre periférica de pollos de engorda testigos y tratados con 200 mg de 5-FU / kg de peso por vía intravenosa a los 17 días de edad (días 0) y que 2 días después fueron infectados con 5,000 ooquistes de *E. tenella* por vía oral. Las proporciones de LPMN / LT de 10 aves por grupo por día de muestreo, fueron sometidas a una prueba de ANDEVA y las diferencias entre las medias se evaluaron con la prueba de Dunnett. Los asteriscos muestran una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo.

Figura 8. Producción de ooquistes en ciegos de pollos infectados con *E. tenella* 2 días posadministración de 5-FU



Medianas del número de ooquistes en ciegos de pollos (9 por grupo), infectados por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella* 2 días después de la administración por vía intravenosa de 200 mg de 5-FU / kg de peso a los 17 días de edad. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre medianas se determinaron con la prueba U de Wilcoxon-Man Whitney. El asterisco muestra diferencias estadísticas significativas ($P < 0.001$) en comparación con el grupo testigo.

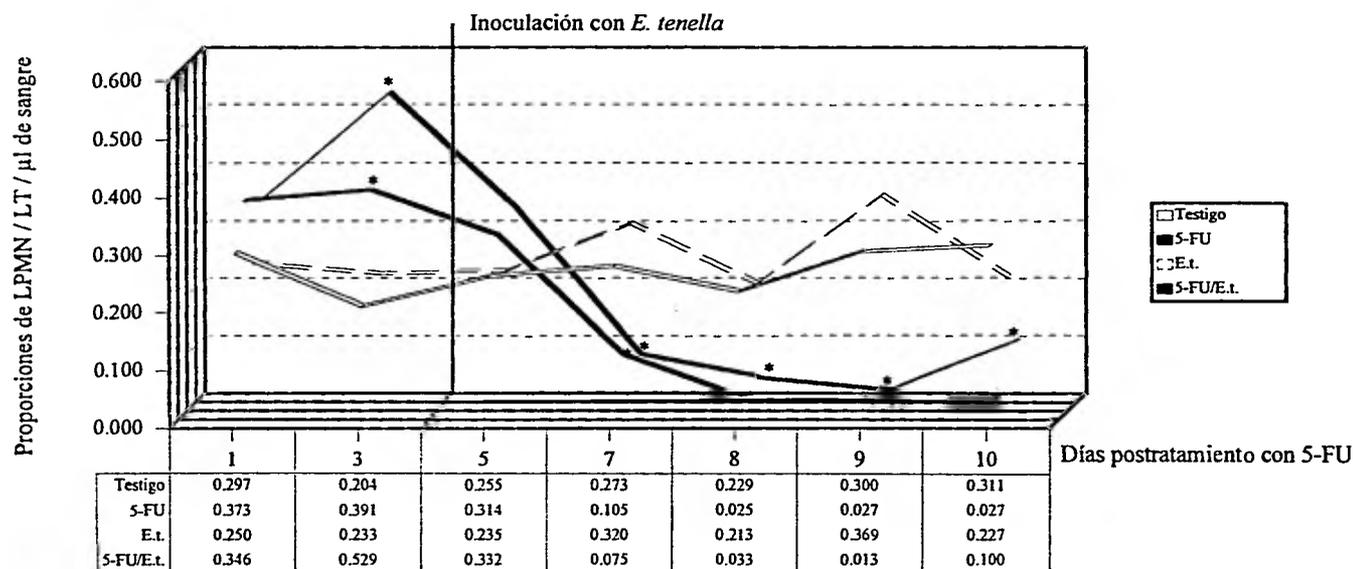
Cuadro 1. Grado de severidad de lesiones cecales en pollos infectados con *E. tenella* 2 días posadministración de 5-FU

Grado de severidad de lesiones cecales

	0	1+	2+	3+	4+
E.t.		1	2	6	
5-FU/E.t.			3	6	

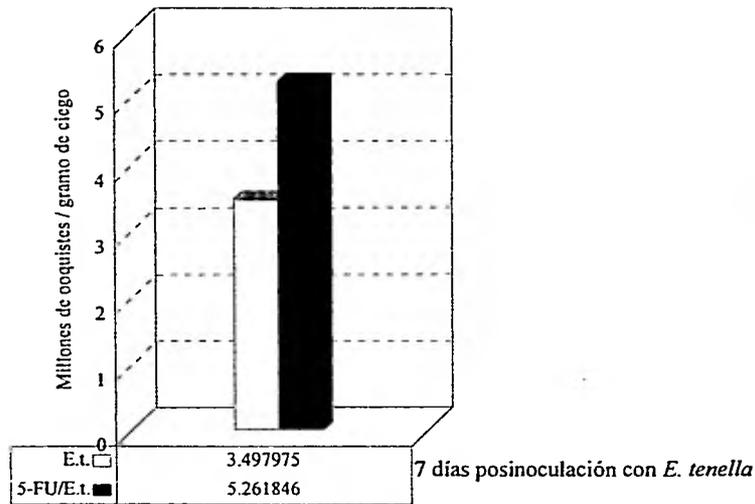
Evaluación de la severidad de lesiones cecales de pollos (9 por grupo) tratados con 200 mg de 5-FU / kg de peso e infectados 2 días después por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella*. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre medianas se determinaron con la prueba de Wilcoxon-Man Whitney.

Figura 9. Efecto de la infección con *E. tenella* 4 días después de la administración de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos de engorda



Proporciones de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) / leucocitos totales (LT) en sangre periférica de pollos de engorda testigos y tratados con 200 mg de 5-FU / kg de peso por vía intravenosa a los 17 días de edad (días 0) y que 4 días después fueron infectados con 5,000 ooquistes de *E. tenella* por vía oral. Las proporciones de LPMN / LT de 10 aves por grupo por día de muestreo, fueron sometidas a una prueba de ANDEVA y las diferencias entre las medias se evaluaron con la prueba de Dunnett. Los asteriscos muestran una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo.

Figura 10. Producción de ooquistes en ciegos de pollos infectados con *E. tenella* 4 días posadministración de 5-FU



Medianas del número de ooquistes en ciegos de pollos (9 por grupo), infectados por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella* 4 días después de la administración por vía intravenosa de 200 mg de 5-FU / kg de peso a los 17 días de edad. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre medianas se determinaron con la prueba U de Wilcoxon-Man Whitney.

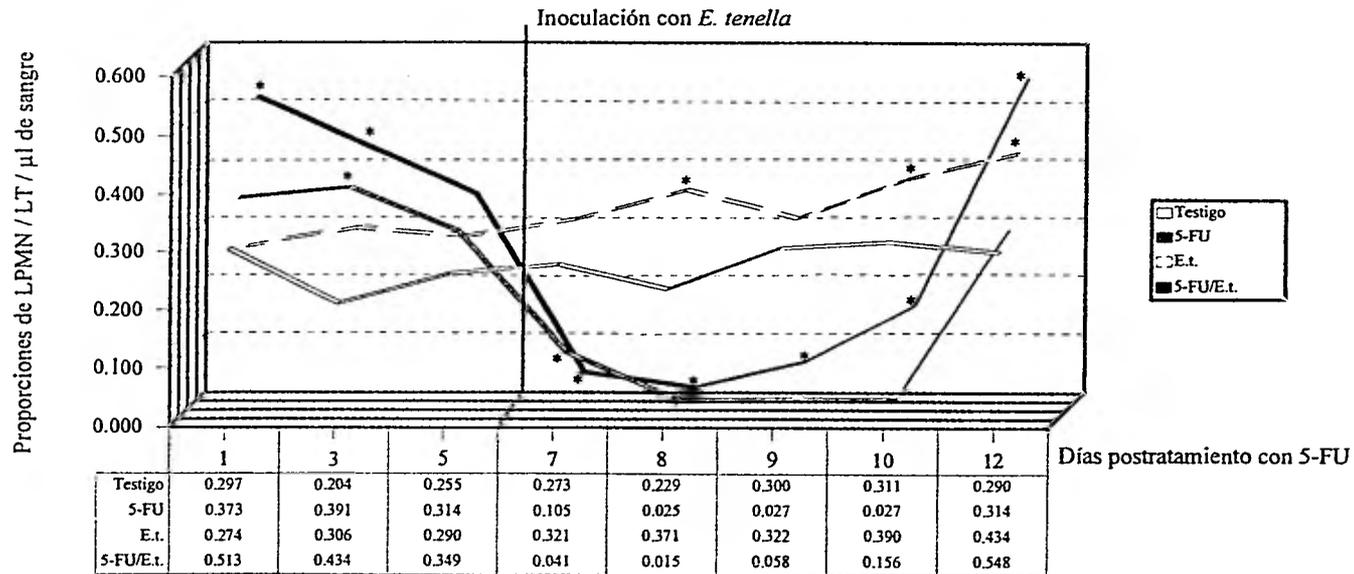
Cuadro 2. Grado de severidad de lesiones cecales en pollos infectados con *E. tenella* 4 días posadministración de 5-FU

Grado de severidad de lesiones cecales

	0	1*	2*	3*	4*
E.t.		1	4	4	
5-FU/E.t.*			2	3	4

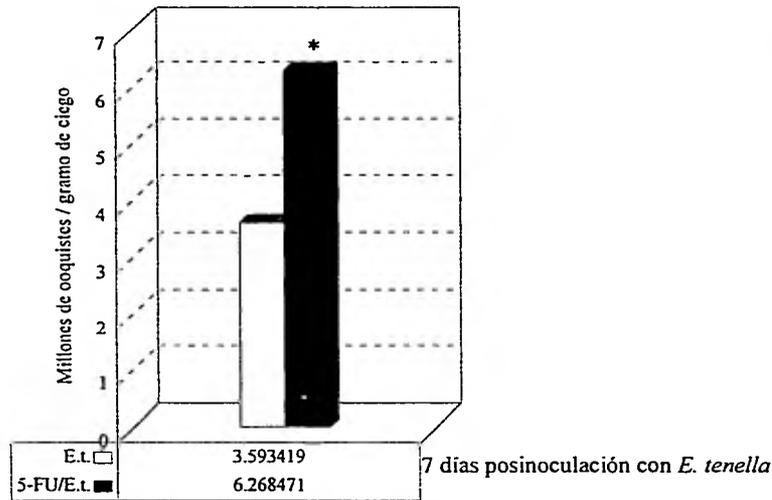
Evaluación de la severidad de lesiones cecales de pollos (9 por grupo) tratados con 200 mg de 5-FU / kg de peso e infectados 4 días después por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella*. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre medianas se determinaron con la prueba U de Wilcoxon-Man Whitney. El asterisco muestra diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo.

Figura 11. Efecto de la infección con *E. tenella* 6 días después de la administración de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos de engorda



Proporciones de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) / leucocitos totales (LT) en sangre periférica de pollos de engorda testigos y tratados con 200 mg de 5-FU / kg de peso por vía intravenosa a los 17 días de edad (días 0) y que 6 días después fueron infectados con 5,000 ooquistes de *Eimeria tenella* por vía oral. Las proporciones de LPMN / LT de 10 aves por grupo por día de muestreo, fueron sometidas a un prueba de ANDEVA y las diferencias entre las medias se evaluaron con la prueba de Dunnett. Los asteriscos muestran una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo.

Figura 12. Producción de ooquistes en ciegos de pollos infectados con *E. tenella* 6 días posadministración de 5-FU



Medianas del número de ooquistes en ciegos de pollos (9 por grupo), infectados por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella* 6 días después de la administración por vía intravenosa de 200 mg de 5-FU / kg de peso a los 17 días de edad. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre medianas se determinaron con la prueba U de Wilcoxon-Man Whitney. El asterisco muestra diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo.

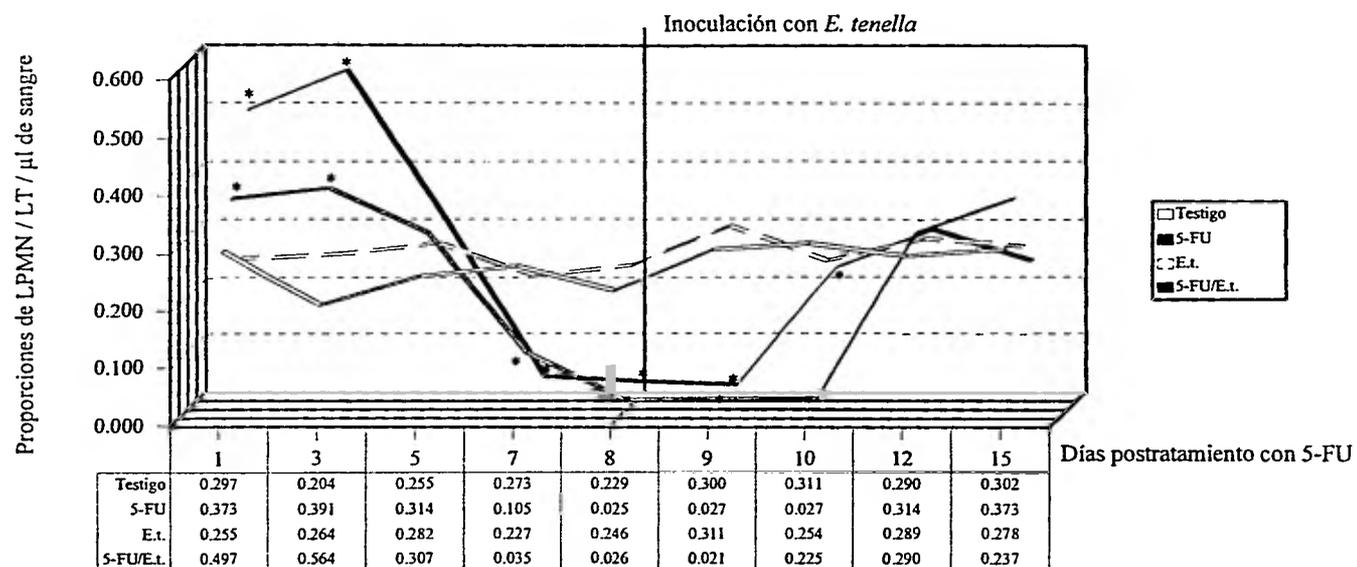
Cuadro 3. Grado de severidad de lesiones cecales en pollos infectados con *E. tenella* 6 días posadministración de 5-FU

Grado de severidad de lesiones cecales

	0	1	2	3	4
Grupos			5	4	
5-FU/			2	4	3

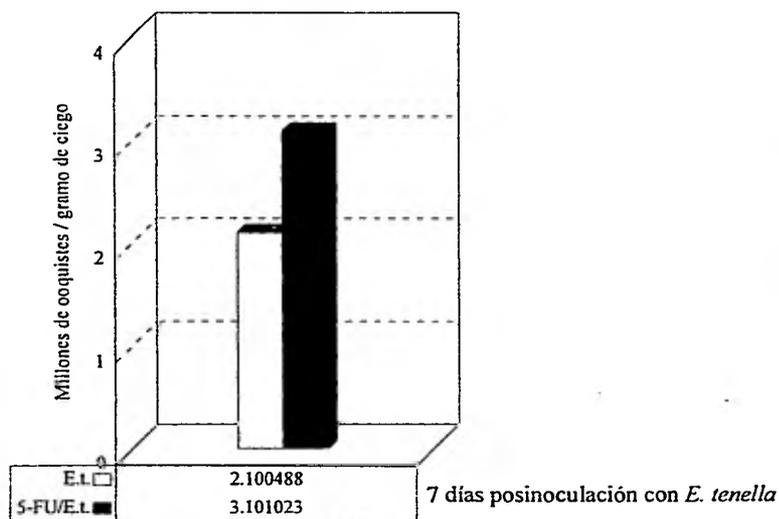
Evaluación de la severidad de lesiones cecales de pollos (9 por grupo) tratados con 200 mg de 5-FU / kg de peso e infectados 6 días después por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella*. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre medianas se determinaron con la prueba U de Wilcoxon-Man Whitney. El asterisco muestra diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo.

Figura 13. Efecto de la infección con *E. tenella* 8 días después de la administración de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos de engorda



Proporciones de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) / leucocitos totales (LT) en sangre periférica de pollos de engorda testigos y tratados con 200 mg de 5-FU / kg de peso por vía intravenosa a los 17 días de edad (días 0) y que 8 días después fueron infectados con 5,000 ooquistes de *Eimeria tenella* por vía oral. Las proporciones de LPMN / LT de 10 aves por grupo por día de muestreo, fueron sometidas a una prueba de ANDEVA y las diferencias entre las medias se evaluaron con la prueba de Dunnett. Los asteriscos muestran una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo.

Figura 14. Producción de ooquistes en ciegos de pollos infectados con *E. tenella* 8 días posadministración de 5-FU



Medianas del número de ooquistes en ciegos de pollos (9 por grupo), infectados por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella* 8 días después de la administración por vía intravenosa de 200 mg de 5-FU / kg de peso a los 17 días de edad. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre medianas se determinaron con la prueba U de Wilcoxon-Man Whitney.

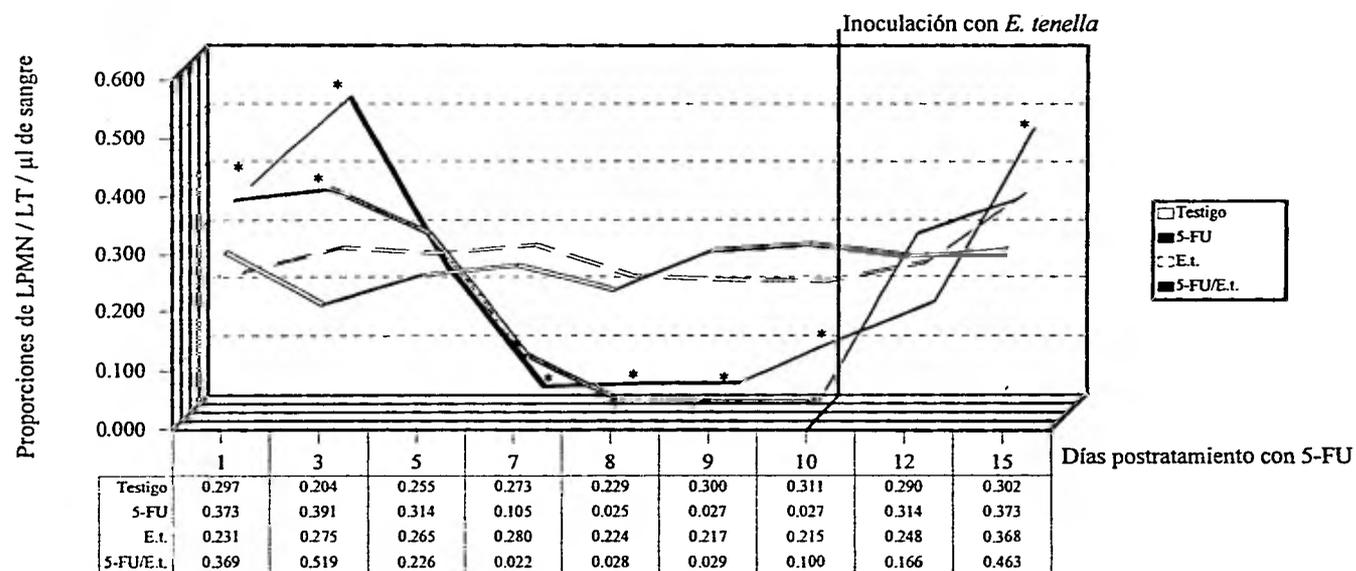
Cuadro 4. Grado de severidad de lesiones cecales en pollos infectados con *E. tenella* 8 días posadministración de 5-FU

Grado de severidad de lesiones cecales

	0	1	2	3	4
Grupos			8		1
5-FU/ <i>E.t.</i>			7	2	

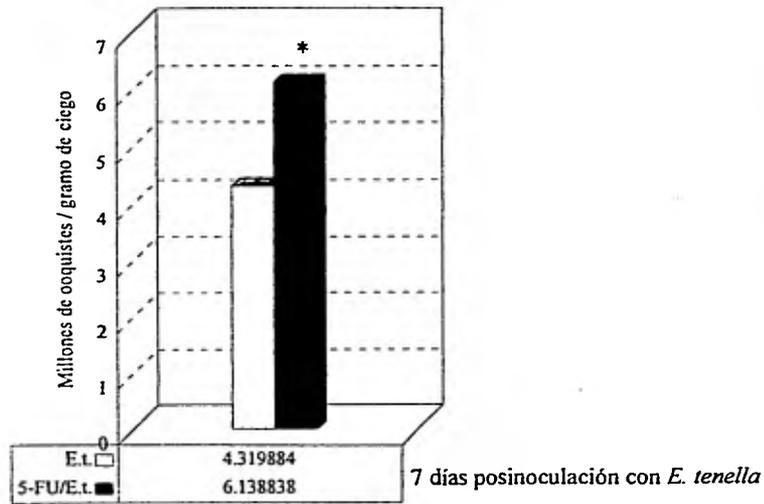
Evaluación de la severidad de lesiones cecales de pollos (9 por grupo) tratados con 200 mg de 5-FU / kg de peso e infectados 8 días después por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella*. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre medianas se determinaron con la prueba U de Wilcoxon-Man Whitney.

Figura 15. Efecto de la infección con *E. tenella* 10 días después de la administración de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos de engorda



Proporciones de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) / leucocitos totales (LT) en sangre periférica de pollos de engorda testigos y tratados con 200 mg de 5-FU / kg de peso por vía intravenosa a los 17 días de edad (días 0) y que 10 días después fueron infectados con 5,000 ooquistes de *Eimeria tenella* por vía oral. Las proporciones de LPMN / LT de 10 aves por grupo por día de muestreo, fueron sometidas a una prueba de ANDEVA y las diferencias entre las medias se evaluaron con la prueba de Dunnett. Los asteriscos muestran una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo.

Figura 16. Producción de ooquistes en ciegos de pollos infectados con *E. tenella* 10 días posadministración de 5-FU



Medianas del número de ooquistes en ciegos de pollos (9 por grupo), infectados por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella* 10 días después de la administración por vía intravenosa de 200 mg de 5-FU / kg de peso a los 17 días de edad. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre medianas se determinaron con la prueba U de Wilcoxon-Man Whitney. El asterisco muestra diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo.

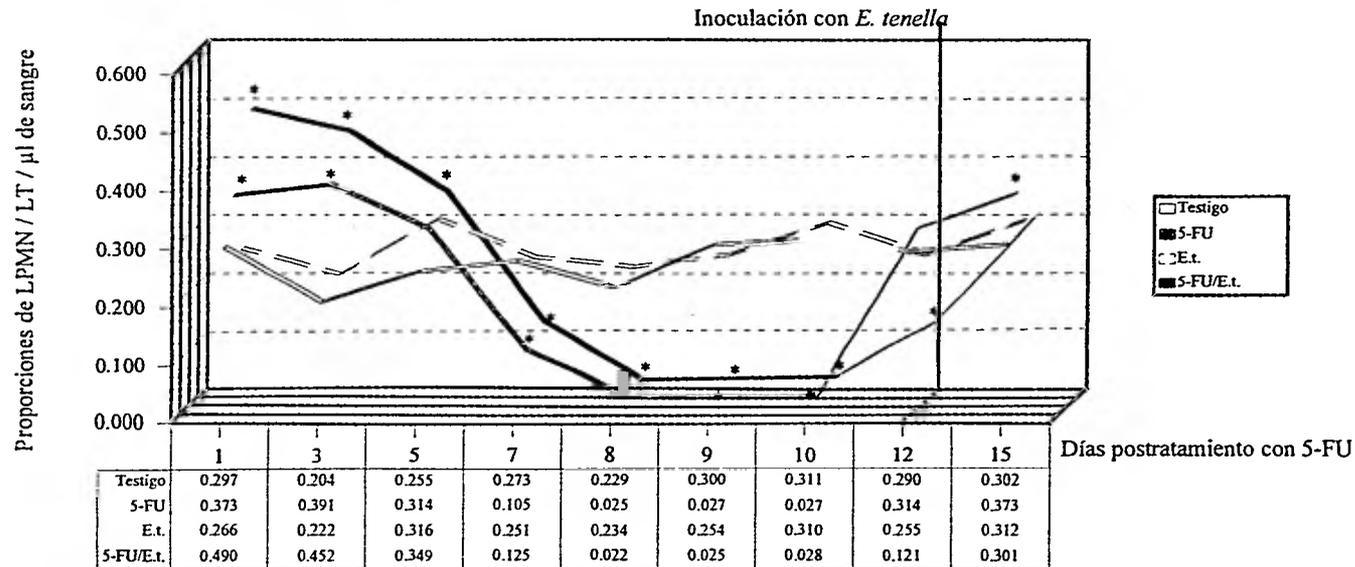
Cuadro 5. Grado de severidad de lesiones cecales en pollos infectados con *E. tenella* 10 días posadministración de 5-FU

Grado de severidad de lesiones cecales

	0	1	2	3	4
Grupos			6	3	
5-FU/E.t.			1	5	3

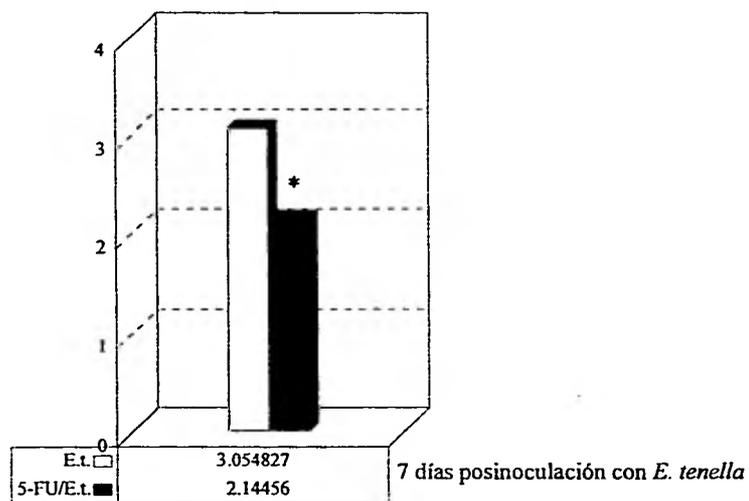
Evaluación de la severidad de lesiones cecales de pollos (9 por grupo) tratados con 200 mg de 5-FU / kg de peso e infectados 10 días después por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella*. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre medianas se determinaron con la prueba U de Wilcoxon-Man Whitney. El asterisco muestra diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo.

Figura 17. Efecto de la infección con *E. tenella* 12 días después de la administración de 5 fluorouracilo sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales en sangre periférica de pollos de engorda



Proporciones de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) / leucocitos totales (LT) en sangre periférica de pollos de engorda testigos y tratados con 200 mg de 5-FU / kg de peso por vía intravenosa a los 17 días de edad (días 0) y que 12 días después fueron infectados con 5,000 ooquistes de *Eimeria tenella* por vía oral. Las proporciones de LPMN / LT de 10 aves por grupo por día de muestreo, fueron sometidas a una prueba de ANDEVA y las diferencias entre las medias se evaluaron con la prueba de Dunnett. Los asteriscos muestran una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo.

Figura 18. Producción de ooquistes en ciegos de pollos infectados con *E. tenella* 12 días posadministración de 5-FU



Medianas del número de ooquistes en ciegos de pollos (9 por grupo), infectados por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella* 12 días después de la administración por vía intravenosa de 200 mg de 5-FU / kg de peso a los 17 días de edad. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre medianas se determinaron con la prueba U de Wilcoxon-Man Whitney. El asterisco muestra diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en comparación con el grupo testigo.

Cuadro 6. Grado de severidad de lesiones cecales en pollos infectados con *E. tenella* 12 días posadministración de 5-FU

Grado de severidad de lesiones cecales

		0	1+	2+	3+	4+
Grupos				2	7	
	5-FU/E.t.			3	6	

Evaluación de la severidad de lesiones cecales de pollos (9 por grupo) tratados con 200 mg de 5-FU / kg de peso e infectados 12 días después por vía oral con 5,000 ooquistes de *E. tenella*. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre medianas se determinaron con la prueba U de Wilcoxon-Man Whitney.