

01672



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL: AVES**

92ej.

**IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE GRANULOCITOS EN
EL PROCESO INFLAMATORIO ASOCIADO A LA INOCULACION
EXPERIMENTAL DE *Salmonella enteritidis* FAGOTIPO 13,
Eimeria tenella CEPA MOR80, ADMINISTRACION DE CLORURO
DE SODIO Y ANHIDRIDO CITRACONICO, EN POLLOS LEGHORN**

**T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS
A V E S
PRESENTADA POR
MVZ EDPV VICTOR MANUEL PETRONE GARCIA**

ASESORES: MVZ Ph. D. Fernando Constantino Casas
MVZ Ph. D. Pedro Pradal Roa
MVZ MC Gary García Espinosa
MVZ MI Jorge Lecumberri López



México, DF 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

259870



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis padres.

A mis asesores: Fernando Constantino, Pedro Pradal, Gary García y Jorge Lecumberri

Al Jefe del Departamento de Producción Animal: Aves. Guillermo Téllez Isaías

A mi Jurado: Francisco Trigo, Francisco Suárez, Rosa María García, Sergio Estrada Parra.

A mis compañeros del Departamento de Producción Animal: Aves,

Magda, Ivonne, Pilar, Consuelo, Cecilia, Eva, Judith, Luz María, María Elena, Ana Laura, Lilia, Iliana, Teresa, Xóchitl, Rosy, Araceli, Felipa, Laura, Elizabeth.

Marco, Alejandro Méndez, Juan Carlos, Chucho, Rubén, Alejandro Hernández, Benjamín, Luis Vicente, Manuel Quiroz, Carlos López Coello, Tamas Fehervari, Ernesto Ávila, José A. Quintana, Alejandro Banda, Reynaldo Moreno, Miguel A. Cenicerros, Juanito, Edgar, Pancho, Julio, Roberto, Rodrigo, Adelfo, Miguel A. Zamora.

Esta investigación fué financiada parcialmente por:

- CONACYT a través del proyecto: Desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas para diagnóstico e investigación en Medicina Veterinaria.

- Incubadora Mexicana S.A. de C.V.

DECLARACIÓN

El autor concede el derecho 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 disponga de esta tesis cuando se requiera cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

ATENTAMENTE

MVZ EDPV VÍCTOR MANUEL PETRONE GARCÍA

RESUMEN

La respuesta celular inflamatoria de las aves, no ha sido estudiada detalladamente, ya que los granulocitos aviares no se distinguen claramente con la técnica de hematoxilina y eosina (HE), siendo necesario utilizar técnicas histoquímicas. Se realizaron 6 experimentos con pollos Leghorn de 4 semanas de edad. Tres grupos de 80 pollos infectados oralmente con 1) 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) de *Salmonella enteritidis*, 2) 10^4 ooquistes de *Eimeria tenella* y 3) 10^8 UFC de *S. enteritidis* más 10^4 ooquistes de *E. tenella*. 4) 60 aves intoxicadas por 28 días con 3.25% de NaCl en el alimento y del día 21 al 28, con 1% de NaCl en el agua de bebida. 5) 12 aves intoxicadas por 5 días, con 1% de NaCl en agua. 6) 10 aves tratadas cutáneamente 3 veces en 14 días con anhídrido citracónico (AC) al 1%. Se tomaron muestras fijándose en formalina al 10% en los siguientes tiempos posinoculación (Pi). Se tomaron ciegos a los 4, 8 y 12 h, 1, 3, 5, 7 y 14 días Pi en los experimentos 1), 2) y 3). Se tomó encéfalo y médula espinal de los experimentos 4) y 5), tomando muestras para el primero a los 7, 14, 21 y 28 días y para el segundo entre 3 y 5 días. Se tomó piel del apterilo torácico, del experimento 6), al día 14 Pi. Las muestras se tiñeron con HE para identificar heterófilos y eosinófilos, Ziehl-Neelsen para basófilos y *p*-fenilenediamina dihidroclorida más pirocatecol para eosinófilos. Las aves del experimento 1) no mostraron cambios en la cantidad de granulocitos ($P > 0.05$). Las de los experimentos 2) y 3) presentaron mayor cantidad de heterófilos en mucosa y submucosa cecal en los días 5 y 7 posinoculación ($P < 0.05$), mientras que en el experimento 3) tuvo disminución de basófilos en submucosa en el día 3 Pi. Los experimentos 2) y 3) exhibieron aumento de basófilos en mucosa entre los días 7 y 14 Pi, y de eosinófilos en el experimento 3) al día 5 Pi. No se apreciaron granulocitos en los experimentos 4) y 5). En el experimento 6) se encontró aumento de eosinófilos en dermis superficial y de basófilos en la dermis superficial y profunda ($P < 0.05$). En esta investigación se encontró que las tinciones empleadas diferenciaron correctamente a los granulocitos. Los heterófilos se observaron en la inflamación aguda producida por *S. enteritidis* y durante la liberación de merozoítos de *E. tenella*. Los basófilos estuvieron en el proceso inflamatorio agudo producido por *E. tenella* y en reacciones de hipersensibilidad cutánea. Los eosinófilos se encontraron en las reacciones de hipersensibilidad cutánea.

Palabras claves: inflamación, granulocito, heterófilos, basófilo, mastocito, eosinófilo, polimorfonuclear, *Salmonella enteritidis*, *Eimeria tenella*, NaCl, intoxicación, cloruro de sodio, anhídrido citracónico, hipersensibilidad, aves, pollos Leghorn.

**IDENTIFICATION AND CUANTIFICATION OF GRANULOCYTES IN THE
INFLAMMATORY PROCESS ASSOCIATED WITH EXPERIMENTAL INFECTION
OF *Salmonella enteritidis* PHAGOTYPE 13 AND *Eimeria tenella* MOR80, AND
ADMINISTRATION OF SODIUM CHLORIDE AND CITRACONIC ANHYDRIDE, IN
LEGHORN CHICKENS**

SUMMARY

Cellular inflammatory response in chicken has not been studied in detail, because avian granulocytes could not be distinguished clearly with hematoxylin and eosin (HE) staining method. Therefore, it is necessary to use histochemical techniques. Six experiments were carried out using 4 weeks old Leghorn chickens. Three groups of 80 chickens in each were orally inoculated with 1) 10^8 viable *Salmonella enteritidis*, 2) 10^4 sporulated oocyst of *Eimeria tenella* and 3) 10^8 viable *Salmonella enteritidis* and 10^4 sporulated oocyst of *Eimeria tenella*. 4) 60 chickens were intoxicated with 3.25% of NaCl in food for 28 days and with 1% NaCl in drinking water between 21 and 28 days. 5) 12 chickens were intoxicated for 5 days, with 1% NaCl in drinking water. 6) 10 chickens were treated by topical application using 1% citraconic anhydride three times in 14 days. Tissue samples were taken and fixed in 10% neutral formalin in different times after treatment. In experiments 1), 2) and 3), cecal samples were taken at 4, 8, 12 h, and 1, 3, 5, 7, 14 days postinoculation (Pi). Brain and spinal cord samples were taken in experiments 4) at 7, 14, 21 and 28 days Pi, and in experiment 5) between 3 and 5 days Pi. Samples of skin from thoracic apterium were taken in experiment 6), at day 14 Pi. The samples were stained with HE in order to identify heterophils and eosinophils, Ziehl-Neelsen was used for basophils and p-phenylenediamine dihydrochloride plus pyrocatechol was used for eosinophils. Birds of experiment 1) did not have change in granulocytes number ($P>0.05$). The number of cecal mucous and submucous heterophils increased on days 5 and 7 Pi in experiments 2) and 3) ($P<0.05$). Meanwhile, cecal submucosal basophils decreased in number on day 3 Pi in experiment 3). Cecal mucous basophils also increased between days 7 and 14 Pi in experiments 2) and 3). Eosinophils were expanded on day 5 Pi in experiment 3). Samples taken from experiments 4) and 5) did not have granulocytes. Superficial dermal eosinophils were an increase number in experiment 6). Superficial and deep dermal basophils showed an increase number in experiment 6) ($P<0.05$). This research demonstrated that the stains differentiated correctly the granulocytes. Heterophils were observed during the acute inflammation process yielded by *S. enteritidis*, as well as during the release period of merozoites of *E. tenella*. Basophils were seen during the acute inflammation and cutaneous hypersensitivity reactions. Eosinophils were observed in cutaneous hypersensitivity reactions.

Keywords: inflammation, polymorphonuclear granulocyte, heterophil, basophil, mast cell, eosinophil, *Salmonella enteritidis*, *Eimeria tenella*, NaCl, sodium chloride, intoxication, poisoning, citraconic anhydride, hypersensitivity, bird, Leghorn, chicken.

LISTA DE CONTENIDOS

	Página
Agradecimientos	ii
Declaración	iii
Resumen	iv
Summary	v
Lista de contenidos	vi
Lista de cuadros y figuras	viii
Lista de abreviaturas	ix
1.0 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Inflamación en mamíferos	1
1.1.1 Participación de los granulocitos en el proceso inflamatorio en mamíferos	3
1.2 Inflamación en aves	6
1.2.1 Participación de los granulocitos en el proceso inflamatorio en aves	6
1.2.2 Los granulocitos de las aves en distintos procesos patológicos	8
1.2.3 Distinción histoquímica de los granulocitos aviares	11
1.3 Objetivos	12
1.3.1 Objetivo general	12
1.3.2 Objetivos específicos	12
1.4 Hipótesis	13

	Página
2.0 MATERIAL Y MÉTODOS	14
2.1 Animales para experimentación	14
2.2 Diseño experimental	15
2.2.1 Experimento 1. Inoculación con <i>S. enteritidis</i> fagotipo 13	15
2.2.2 Experimento 2. Inoculación con <i>E. tenella</i> cepa MOR80	16
2.2.3 Experimento 3. Inoculación con <i>S. enteritidis</i> fagotipo 13 y <i>E. tenella</i> cepa MOR80	17
2.2.4 Experimento 4. Intoxicación con 3.25% de NaCl en el alimento y 1% de NaCl en el agua de bebida	18
2.2.5 Experimento 5. Intoxicación con 1% de NaCl en el agua de bebida	19
2.2.6 Experimento 6. Tratamiento con anhídrido citracónico	19
2.3 Procesamiento y tinción de las muestras para examen histológico	21
2.4 Identificación y cuantificación de granulocitos	21
2.5 Análisis estadístico	23
3.0 RESULTADOS	24
3.1 Análisis serológicos y bacteriológicos, previos a la etapa de experimentación	24
3.2 Identificación de granulocitos	24
3.3 Cuantificación de granulocitos	25
3.3.1 Experimentos 1, 2 y 3. Inoculación con <i>S. enteritidis</i> fagotipo 13, con <i>E. tenella</i> cepa MOR80 y con <i>S. enteritidis</i> fagotipo 13 y <i>E. tenella</i> cepa MOR80	25
3.3.2 Experimentos 4 y 5. Intoxicación con 3.25% de NaCl en el alimento y con 1% de NaCl en el agua de bebida	34
3.3.3 Experimento 6. Tratamiento con anhídrido citracónico	34
4.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	35
5.0 LITERATURA CITADA	44

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro 1. Tinciones utilizadas para la identificación de los granulocitos aviares	11
Cuadro 2. Número de aves, tratamiento y tiempo de muestreo posinoculación en pollos Leghorn de 28 días de edad	20
Cuadro 3. Granulocitos presentes en epidermis, dermis y totales en piel de pollos Leghorn, tratados con anhídrido citracónico (AC)	34
Figura 1. Heterófilos presentes en mucosa y en submucosa cecal de pollos Leghorn inoculados con <i>S.enteritidis</i> , <i>S.enteritidis+E. tenella</i> , <i>E. tenella</i> y PBS	26
Figura 2. Heterófilos presentes en mucosa cecal de pollos Leghorn inoculados con <i>S.enteritidis</i> , <i>S.enteritidis+E. tenella</i> , <i>E. tenella</i> y PBS	27
Figura 3. Heterófilos presentes en submucosa cecal de pollos Leghorn inoculados con <i>S.enteritidis</i> , <i>S.enteritidis+E. tenella</i> , <i>E. tenella</i> y PBS	28
Figura 4. Basófilos presentes en mucosa y en submucosa cecal de pollos Leghorn inoculados con <i>S.enteritidis</i> , <i>S.enteritidis+E. tenella</i> , <i>E. tenella</i> y PBS	30
Figura 5. Basófilos presentes en mucosa cecal de pollos Leghorn inoculados con <i>S.enteritidis</i> , <i>S.enteritidis+E. tenella</i> , <i>E. tenella</i> y PBS	31
Figura 6. Basófilos presentes en submucosa cecal de pollos Leghorn inoculados con <i>S.enteritidis</i> , <i>S.enteritidis+E. tenella</i> , <i>E. tenella</i> y PBS	32

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-FU. 5-fluorouracilo
- AC. Anhídrido citracónico
- AP. Aglutinación en placa
- BCM. Basófilos cecales de la mucosa
- BCS. Basófilos cecales de la submucosa
- BCT. Basófilos cecales totales (incluyen a los de la mucosa y submucosa)
- BI. Bronquitis infecciosa
- BPD. Basófilos cutáneos dérmicos (incluyen a los de dermis profunda)
- BPE. Basófilos cutáneos epidérmicos (incluyen a los de epidermis y dermis superficial)
- BPT. Basófilos cutáneos totales (incluyen a los de epidermis y dermis)
- BSA. Albúmina sérica bovina
- Con-A. Conavalina-A
- CHB. Hipersensibilidad basofílica cutánea
- DMS. Sulfóxido de dimetilo
- DNCB. Dinitroclorobenceno
- DPA:A. Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México
- ECM. Eosinófilos cecales de la mucosa
- ECS. Eosinófilos cecales de la submucosa
- ECT. Eosinófilos cecales totales (incluyen a los de la mucosa y submucosa)
- ENc. Enfermedad de Newcastle
- EnT. Enterotoxina de *E. coli*
- EPD. Eosinófilos cutáneos dérmicos (incluyen a los de dermis profunda)
- EPE. Eosinófilos cutáneos epidérmicos (incluyen a los de epidermis y dermis superficial)
- EPT. Eosinófilos cutáneos totales (incluyen los de epidermis y dermis)

HCM. Heterófilos cecales de la mucosa
HCS. Heterófilos cecales de la submucosa
HCT. Heterófilos cecales totales (incluyen a los de la mucosa y submucosa)
HE. Hematoxilina y eosina
HPD. Heterófilos cutáneos dérmicos (incluyen a los de dermis profunda)
HPE. Heterófilos cutáneos epidérmicos (incluyen a los de epidermis y dermis superficial)
HPT. Heterófilos cutáneos totales (incluyen a los de epidermis y dermis)
IA. Influenza aviar
IBF. Infección de la bolsa de Fabricio
IEL. Linfocitos intraepiteliales intestinales
Ig. Inmunoglobulina
IH. Inhibición de la hemaglutinación
IL-. Interleucina
NaCl. Cloruro de Sodio
PBE. Proteína básica de los eosinófilos
PBS. Solución estéril amortiguada de fosfatos
PC. Pirocatecol
PHA. Fitohemaglutinina
Pi. Posinoculación
PMN. Polimorfonucleares
PPD+PC. *p*-fenilenediamina dihidroclorida más pirocatecol
PPD. *p*-fenilenediamina dihidroclorido
SNC. Sistema nervioso central
SRS-A. Sustancia de reacción lenta de anafilaxia
TNF α . Factor de necrosis tumoral alfa
UFC. Unidades formadoras de colonias
VMP. Verde de metilo y pironina
ZN. Ziehl-Neelsen

1.0 INTRODUCCIÓN

La inflamación es un proceso dinámico de los organismos vivos, en el que suceden una serie de fenómenos, con participación de factores hemodinámicos y celulares. Estos factores tienen como ventajas selectivas eliminar el agente responsable y reparar el daño causado¹. Entre los animales domésticos la inflamación tiene similitudes, sin embargo, también existen diferencias, por ejemplo, en los mamíferos los granulocitos participantes en la inflamación son los neutrófilos, basófilos y eosinófilos², mientras que en las aves son los heterófilos, basófilos y eosinófilos³. Dependiendo de la etapa en que se encuentre el proceso se pueden utilizar los términos inflamación aguda y subaguda o crónica.

1.1 INFLAMACIÓN EN MAMÍFEROS

El proceso inflamatorio en los mamíferos ha sido extensamente revisado y ha servido como modelo para el estudio de la inflamación en otros animales. La inflamación aguda en los mamíferos se caracteriza por cambios vasculares, principalmente congestión, trombosis, edema, hemorragia, salida de fibrina y presencia de neutrófilos. Se considera aguda la reacción que dura entre horas y unos pocos días. No existe una separación precisa entre la inflamación aguda y la subaguda; sin embargo, en la subaguda se observa la disminución de los cambios vasculares y la exudación neutrofilica, así como el predominio de macrófagos y linfocitos. La duración del proceso subagudo va desde unos cuantos días hasta una o dos semanas. La principal característica de la inflamación crónica es la evidencia de reparación por parte del huésped. En la mayor parte de los casos, la inflamación crónica presenta las siguientes características: persistencia del estímulo dañino, por incapacidad del huésped para destruirlo; el proceso inflamatorio generalmente está aunado a respuesta inmunitaria y evidencia de

proceso de reparación por parte del huésped, ya sea por regeneración o sustitución por tejido fibroso y proliferación de vasos sanguíneos⁴.

Según la naturaleza de la inflamación se presentan diferentes tipos de exudados. Éstos tienen un componente humoral y uno celular y se clasifican de acuerdo con el contenido y tipo de las proteínas, así como el tipo de células que los forma². Considerando exclusivamente su componente celular, los diferentes tipos de exudados, son purulento, caseoso o granulomatoso, linfocitario, eosinofílico y mixto⁴.

a) Exudado purulento.- Está compuesto principalmente por neutrófilos, primeros leucocitos atraídos al área de inflamación. El exudado purulento presenta una coloración amarillenta y consistencia cremosa. Por lo general este exudado se forma por reacción a infecciones por bacterias piógenas, esta respuesta está dada porque los neutrófilos liberan enzimas proteolíticas produciendo necrosis licuefactiva del tejido, formando pus. En casos crónicos, el pus es rodeado por tejido conectivo fibroso, constituyendo una cápsula o membrana piógena, con lo que se forman abscesos. Los abscesos así formados, pueden permanecer por largo tiempo, hasta que el agente causal pueda ser eliminado y el material del absceso sea reabsorbido lentamente hasta desaparecer⁵.

b) Exudado caseoso o granulomatoso.- Pertenece a un proceso crónico, las células que lo constituyen son macrófagos, linfocitos y pueden coexistir neutrófilos o eosinófilos, de ahí el nombre piogranuloma y granuloma eosinofílico. El exudado caseoso se observa macroscópicamente como un nódulo duro, que al corte presenta una apariencia granular. Los macrófagos en algunos casos se transforman en células epitelioides, las cuales presentan núcleo excéntrico vesiculado, citoplasma abundante y pálido. También los macrófagos pueden

transformarse en células gigantes, que son sincicios de estos leucocitos con citoplasmas fusionados y múltiples núcleos. Otra característica de este exudado en mamíferos es la persistencia del agente causal en el centro de la lesión, rodeado por macrófagos, linfocitos y una cápsula de tejido conectivo fibroso⁵.

c) Exudado linfocitario.- Este tipo de proceso, en la mayoría de los casos es de origen viral. En el sistema nervioso se caracteriza por acumulación de linfocitos alrededor de vasos sanguíneos. Este exudado sólo es visible microscópicamente y se le denomina proceso no supurativo⁵.

d) Exudado eosinofílico.- La respuesta inflamatoria contra gran cantidad de parásitos tisulares, tiende a estar constituida por eosinófilos. Así mismo en la intoxicación con sal en cerdos, la lesión característica consiste en la acumulación de una gran cantidad de eosinófilos alrededor de los vasos sanguíneos del encéfalo⁵.

e) Exudado mixto.- Se denominan exudados mixtos a los constituidos por diferentes tipos de leucocitos⁵.

1.1.1 Participación de los granulocitos en el proceso inflamatorio en mamíferos

El proceso inflamatorio agudo en los mamíferos, se caracteriza por cambios hemodinámicos, incremento en la permeabilidad vascular e infiltración leucocitaria. Los leucocitos constituyen la primera defensa celular de la respuesta inflamatoria, aunados a las enzimas liberadas por ellos y por las enzimas de células en necrosis¹.

En mamíferos, los granulocitos son de tres tipos, los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos o su equivalente tisular, los mastocitos o células cebadas. De estos, los

neutrófilos y eosinófilos presentan lobulaciones en su núcleo. En mamíferos, a los neutrófilos también se les denomina polimorfonucleares (PMN)⁶. Estos tipos celulares tienen características morfológicas, químicas y quimiotácticas distintas entre sí.

Los primeros leucocitos en llegar al área de inflamación son los neutrófilos. Estos leucocitos requieren entre 4 y 24 horas para alcanzar su mayor proporción en el área, mientras que los monocitos requieren alrededor de 18 a 24 horas¹. Existen algunas excepciones en cuanto a este patrón de migración celular, ya que los linfocitos pueden ser las primeras células en llegar en infecciones virales y los eosinófilos en algunas reacciones de hipersensibilidad y en la respuesta contra parásitos⁴.

Los neutrófilos en su citoplasma, presentan gran cantidad de gránulos esféricos que no tienen afinidad a la tinción de hematoxilina y eosina (HE). Sin embargo, algunos de sus gránulos se tiñen con los azules de metilo de la tinción de Romanowsky⁷. Los neutrófilos presentan receptores para las inmunoglobulinas y la fracción C3b del complemento. La principal función de los neutrófilos es fagocitar microorganismos (bacterias, hongos, parásitos), partículas virales y detritus celulares, así como liberar enzimas lisosomales líticas y factores quimiotácticos hacia otros leucocitos².

Otro tipo de granulocito es el eosinófilo, que tiene en su citoplasma abundantes gránulos acidófilos, que pueden ser esféricos, ovoides o elipsoidales. Los gránulos contienen enzimas similares a los del neutrófilo, pero los del eosinófilo en su centro, presentan un material cristalino central, compuesto principalmente por la proteína básica de los eosinófilos (PBE). Las funciones principales de esta proteína son lisar parásitos, liberar histamina por los mastocitos y neutralizar la heparina². Los eosinófilos en su superficie exhiben receptores para inmunoglobulinas G (IgG), IgE,

IgM, IgA, interleucina 2 (IL-2), IL-5, la fracción C3b del complemento, leucotrieno B4, histamina y glucocorticoides⁸. Las funciones de los eosinófilos en los mamíferos son combatir las infecciones por parásitos metazoarios⁹, regular el proceso anafiláctico e inflamatorio agudo, así como fagocitar y destruir bacterias⁸. Los eosinófilos también se han observado en procesos tóxicos como en la meningitis eosinofílica presente en la intoxicación por cloruro de sodio en los cerdos^{10,11}, y neoplasias como la leucemia eosinofílica¹².

El otro granulocito, el mastocito (célula cebada) reside en el tejido conectivo y su mayor número se ubica en piel y mucosas, pero se puede encontrar en la mayoría de los órganos. En el humano y en los roedores, los mastocitos forman dos poblaciones diferentes con base en su origen y función, los de los órganos parenquimatosos y los de las mucosas. Los gránulos de los mastocitos que se encuentran en los órganos, son ricos en histamina y heparina. Los gránulos del otro tipo de mastocitos, que se encuentran en las mucosas, tienen menor número y menos histamina y contienen condroitina E en lugar de heparina, exhiben mayor cantidad de receptores para la interleucina 3 y aparentemente responden de manera específica a los antígenos de los nemátodos^{13,14}. Becker *et al.*¹⁵ demostraron la presencia de diferentes poblaciones de mastocitos en la piel de perro, con base en la característica tintorial de sus gránulos. Los mastocitos de ambas poblaciones, tienen receptores específicos para la fracción cristalizable de la IgE. Cuando los antígenos se unen a dos moléculas de IgE que estén adheridas a la membrana del mastocito y cercanas entre sí, causan la liberación de las sustancias contenidas en los gránulos citoplasmáticos¹⁴. Las principales sustancias que contienen los gránulos de los mastocitos son la histamina, la sustancia de reacción lenta de anafilaxia (SRS-A), leucotrienos, la heparina y la condroitina E⁸.

1.2 INFLAMACIÓN EN AVES

El proceso inflamatorio en las aves es similar al de los mamíferos, sin embargo se pueden encontrar algunas diferencias. La inflamación aguda en las aves transcurre en horas o días, mientras que en los mamíferos requiere de horas hasta semanas^{3,16}. En este periodo de la inflamación, las aves presentan mayor cantidad de basófilos que los mamíferos¹⁷. En la inflamación subaguda y crónica de las aves, la acumulación de exudado heterofílico se transforma invariablemente en caseoso, en contraste con los mamíferos, donde los neutrófilos promueven licuefacción produciendo exudado purulento. Debido a estos hechos, la literatura reciente, recomienda usar el término heterofílico en lugar de supurativo¹⁷.

1.2.1 *Participación de los granulocitos en el proceso inflamatorio en aves*

A diferencia de los granulocitos de los mamíferos, las aves carecen de neutrófilos y en su lugar tienen heterófilos (granulocitos PMN seudoeosinófilos)¹⁸. Sin embargo, los heterófilos aviares se consideran análogos de los neutrófilos por su acción fagocítica y su importancia como barrera de defensa contra infecciones bacterianas¹⁹. Estos leucocitos se tiñen con la eosina de igual manera que los eosinófilos, de ahí que el término acidófilo sea aplicado para ambos³. Es importante considerar que en las aves, los eosinófilos y basófilos, se incluyen dentro del término PMN¹⁸. Los reptiles y peces, también, poseen heterófilos con las mismas propiedades que los de las aves. En cambio, en los conejos, debido a que los neutrófilos tienen afinidad por la eosina, algunos autores los consideran heterófilos, sin embargo, éstos tienen las mismas características enzimáticas que los neutrófilos²⁰.

Carlson y Allen²¹, demostraron que los PMN aviares están presentes en el proceso inflamatorio agudo en aves inoculadas en el pliegue del ala, con trementina o

Staphylococcus aureus. Los PMN se observaron a los primeros 30 minutos después de la inoculación, alcanzando su mayor número a las 12 horas; mientras que los linfocitos eran las células predominantes a las 36 horas. En un estudio posterior, Carlson²², observó en el músculo pectoral de aves inoculadas con *Staphylococcus aureus*, que las células inflamatorias predominantes, en las primeras 12 horas, eran los PMN. Después, a las 24 horas posinoculación (Pi), la mayor cantidad de leucocitos eran los linfocitos. En ambos trabajos se encontraron gran cantidad de basófilos durante las primeras 4 horas Pi.

Heterófilos

Los heterófilos tienen núcleo esférico o bilobulado y rara vez presentan más lobulaciones. Los gránulos de estos leucocitos son esféricos o fusiformes²³ y contienen fosfatasa ácida, β -glucuronidasa y esterase no específica²⁴. Atwal y McFarland²⁵, así como Brune y Spintzanagel²⁶, probaron que los heterófilos carecen de mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina, además no pudieron demostrar la presencia de muchas otras enzimas como las proteasas ácidas, entre las que se encuentran la catepsina. Estas enzimas si están presentes en los neutrófilos. A pesar de que los heterófilos aviares no presentan mieloperoxidasa se ha probado su poder lítico contra *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Candida albicans*²⁷, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*^{28,29} y *Salmonella enteritidis*³⁰. Los heterófilos son más eficientes que los monocitos en fagocitar y destruir bacterias incluso en ausencia de opsoninas³⁰. La diferencia entre la consistencia caseosa del exudado heterofilico y la cremosa del neutrofilico depende de la acción de la mieloperoxidasa y proteasas ácidas presentes en los neutrófilos³.

Basófilos

Los basófilos aviares se han encontrado en mayor cantidad entre las 2 y 4 horas de iniciar procesos inflamatorios cutáneos, producidos por trementina, endotoxina, albúmina sérica bovina³¹ o lesiones mecánicas³², mientras que con concavalina-A (Con-A) aumentaron hasta las 12 horas³¹. En duodeno de pavo se observó aumento de basófilos a los 4.5 días de inoculación con el virus de la enteritis hemorrágica del pavo³³.

Eosinófilos

La participación de los eosinófilos en el control de infecciones por parásitos en las aves, no está claro. En infecciones naturales por metazoarios, se ha observado eosinofilia severa como es el caso de gallos Bantam con infección cecal de *Trichostrongylus tenius*³⁴ o en gallinas infectadas experimentalmente con *Austrobilharzia variglandis*³⁵. Por otro lado, gallinas inoculadas intraperitonealmente con larvas vivas de *Ascaris summ*, *Toxocara canis* y *Ascaridia galli* no desarrollaron eosinofilia^{36,37}, resultados similares se observaron con *Railletinia tetragona*, mientras que con *Railletinia cesticillus* asociada con infecciones secundarias, se presentó eosinofilia^{38,39}. El mismo autor no encontró aumento en la cantidad de eosinófilos en la mucosa intestinal con la infección *R. cesticillus*⁴⁰. Es importante señalar que el autor buscó eosinófilos y no heterófilos, encontrando algunos eosinófilos que pudieron ser heterófilos puesto que no utilizó tinciones especiales. Rose *et al.*⁴¹ estudiaron el efecto de eosinófilos ante infección de coccidias, no encontrando eosinofilia.

1.2.2 Los granulocitos de las aves en distintos procesos patológicos

Para el estudio de los granulocitos aviares se utilizan como ejemplos de modelos de experimentación, infecciones por *Salmonella enteritidis* y *Eimeria tenella*,

intoxicación por cloruro de sodio e hipersensibilidad aviar, que a continuación se revisan.

Los granulocitos en la infección por Salmonella enteritidis

En una infección digestiva por *S. enteritidis* la respuesta inflamatoria inicial se caracteriza por la llegada de gran número de PMN y leucocitos mononucleares⁴². El origen de estas células inflamatorias es la médula ósea, de donde migran a la sangre y después a los tejidos a través de factores quimiotácticos^{43,44,45}. Lo anterior fue comprobado por Kogut *et al.*^{46,47}, al utilizar el 5-fluorouracilo (5-FU) que es una droga mielosupresora, con acción citolítica, principalmente contra las células multipotenciales de la serie de los PMN. Los pollos tratados con esta droga, en comparación con los testigos, sufrieron mayor invasión de *S. enteritidis* y lesiones con apariencia macroscópica de inflamación y hemorragia, más graves en intestino y ciego. Las lesiones fueron más severas aun cuando se les inocularon oralmente pocas unidades formadoras de colonias de *S. enteritidis*.

Los granulocitos en la infección por Eimeria tenella

En el ciego infectado por *Eimeria tenella*, se ha observado infiltración de heterófilos en la submucosa conforme se desarrollan los esquizontes de segunda generación en la lámina propia⁴⁸. Pero al igual que con *S. enteritidis*, no se usaron tinciones especiales para identificar los eosinófilos en el infiltrado heterofilico.

Los granulocitos en la intoxicación por Cloruro de Sodio

En cerdos está comprobado que la intoxicación por Cloruro de Sodio (NaCl) produce meningitis eosinofílica^{10,11}. Mientras que en aves hay publicaciones contradictorias, ya que Trainer y Karstad⁴⁹ observaron encefalitis eosinofílica en una intoxicación natural de NaCl, pero no la pudieron replicar experimentalmente. Mohanty y West⁵⁰, lograron desarrollar mielomeningitis eosinofílica en el 15% de los

pollos intoxicados experimentalmente con NaCl. Baze⁵¹ no informó infiltración de PMN en pollos intoxicados con NaCl y tratados con corticoesteroides o con una sustancia diurética (ácido etacrínico). Wages *et al.*⁵², en una intoxicación natural en pavos, encontraron encefalitis con infiltración perivascular de acidófilos y debido a que no utilizaron tinciones especiales no se realizó diferenciación entre heterófilos y eosinófilos.

Los granulocitos en la hipersensibilidad

En aves se pueden causar reacciones de hipersensibilidad retardada, después de varias inyecciones intradérmicas con sustancias químicas que tengan efecto de hapteno, como el dinitroclorobenceno (DNCB)^{53,54} y el anhídrido citracónico (AC)⁵⁵. Estas reacciones se caracterizan por la infiltración de heterófilos y eosinófilos. Ya que las aves carecen de IgE, la presencia de eosinófilos se puede explicar, porque la función de ésta inmunoglobulina está parcialmente cubierta por la inmunoglobulina Y (IgY)⁵⁶. Rose y Bradley⁵⁷, informaron que con el uso de *Mycobacterium avium* y del hapteno 2,4-dinitrofenil conjugado con γ -globulina de bovino, se presentó infiltración severa de leucocitos mononucleares y leve de PMN. Sin embargo, estos autores⁵⁷ mencionan que probablemente los PMN son heterófilos.

En reacciones inmunológicas de las aves, los eosinófilos sólo han sido observados en reacciones de hipersensibilidad retardada^{53,55}. En procesos inflamatorios agudos, Carlson y Allen²¹, encontraron abundantes heterófilos pero no hicieron tinciones para diferenciar eosinófilos. Chand y Deroth⁵⁸, observaron niveles de histamina elevados y basofilia en pollos que sufrieron anafilaxia, pero no eosinofilia. Inyecciones intraperitoneales de suero de equino⁵⁹ y bovino causaron eosinofilia³⁶ lo que fue atribuido a una reacción anafiláctica que no se presenta cuando la vía de administración del antígeno es intramuscular⁶⁰.

1.2.3 Distinción histoquímica de los granulocitos aviáres

La distinción entre los heterófilos y los eosinófilos en preparaciones histológicas teñidas con HE es difícil, ya que ambos tienen morfología similar y la afinidad tintorial de sus gránulos es la misma⁵³. Debido a esto, existen pocos informes en la literatura que mencionen la presencia de eosinófilos en los procesos patológicos de las aves. Varias tinciones se han utilizado para teñir a los eosinófilos, algunas basadas en presencia de lípidos en sus gránulos, como lo es el "luxol fast blue"⁶¹ y el rojo oleoso⁶². Otra tinción utiliza como marcador de la peroxidasa presente en sus gránulos, es la *p*-fenilenediamina dihidroclorida más pirocatecol (PPD+PC)^{55,63}. Es importante recordar que los heterófilos carecen de peroxidasa en sus gránulos. Por lo que la tinción histológica para la distinción de eosinófilos es PPD+PC, mientras que la HE tiñe a los heterófilos y eosinófilos, sin poder distinguirlos (Cuadro 1). Debido a que la identificación de los basófilos puede ser difícil con la tinción de HE, se han utilizado las tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) y azul de toluidina para diferenciarlos de los demás granulocitos^{64,65}.

Cuadro 1. Tinciones utilizadas para la identificación de los granulocitos de las aves

TINCIÓN	CÉLULA BLANCO	ORGANELO BLANCO	TIPO DE REACCIÓN
Eosina	HETERÓFILOS Y EOSINÓFILOS	GRÁNULOS	QUÍMICA
Ziehl-Neelsen	BASÓFILOS	GRÁNULOS	QUÍMICA
Azul de toluidina	BASÓFILOS	GRÁNULOS	QUÍMICA
PPD+PC ¹	EOSINÓFILOS	GRÁNULOS	ENZIMÁTICA
Luxol fast blue	EOSINÓFILOS	GRÁNULOS	QUÍMICA
Rojo oleoso	EOSINÓFILOS	GRÁNULOS	QUÍMICA

¹ *p*-fenilenediamina dihidroclorida más pirocatecol

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 *Objetivo general*

- Identificar y cuantificar los heterófilos, basófilos y eosinófilos por medio de las tinciones histológicas de HE, PPD+PC y ZN, en ciegos, sistema nervioso central (SNC) y piel de pollos Leghorn de 4 semanas de edad, inoculados con *Salmonella enteritidis* fagotipo 13 y *Eimeria tenella* cepa MOR80 y la administración de NaCl y AC.

1.3.2 *Objetivos específicos*

- Identificar y cuantificar heterófilos, basófilos y eosinófilos en el proceso inflamatorio de mucosa y submucosa cecal en distintos periodos posteriores a la inoculación experimental de *S. enteritidis* fagotipo 13, en pollos Leghorn de cuatro semanas de edad.
- Identificar y cuantificar heterófilos, basófilos y eosinófilos en el proceso inflamatorio de mucosa y submucosa cecal en distintos periodos posteriores a la inoculación experimental de *E. tenella* cepa MOR80, en pollos Leghorn de cuatro semanas de edad.
- Identificar y cuantificar heterófilos, basófilos y eosinófilos en el proceso inflamatorio de mucosa y submucosa cecal en distintos periodos posteriores a la inoculación experimental de *S. enteritidis* fagotipo 13 y *E. tenella* cepa MOR80, en pollos Leghorn de cuatro semanas de edad.

- Identificar y cuantificar heterófilos, basófilos y eosinófilos en el proceso inflamatorio en sistema nervioso central, en distintos periodos posteriores a la administración de NaCl en pollos Leghorn de cuatro semanas de edad.
- Identificar y cuantificar heterófilos, basófilos y eosinófilos en el proceso inflamatorio cutáneo posterior a la administración de AC en pollos Leghorn de cuatro semanas de edad.

1.4 HIPÓTESIS

- Los heterófilos, basófilos y eosinófilos participan en el proceso inflamatorio causado por la inoculación experimental de *S. enteritidis* fagotipo 13, *E. tenella* cepa MOR80 y la administración de NaCl y AC en pollos Leghorn de cuatro semanas de edad.
- La proporción de heterófilos, basófilos y eosinófilos cecales, tiene un comportamiento diferente durante el curso del proceso inflamatorio asociado a la inoculación experimental de *S. enteritidis* fagotipo 13 y *E. tenella* cepa MOR80 en pollos Leghorn de cuatro semanas de edad.

2.0 MATERIAL Y MÉTODOS

Se prepararon inóculos de *S. enteritidis* fagotipo 13, *E. tenella* cepa MOR80, cloruro de sodio y de anhídrido citracónico y se les aplicó a pollos Leghorn a partir de los 28 días de edad. Los inóculos se suministraron por diferentes vías y en distintos tiempos. A las aves se les realizó eutanasia para obtener diferentes órganos para su proceso histoquímico con HE, ZN y PPD+PC. Posteriormente los heterófilos, eosinófilos y basófilos se identificaron y cuantificaron por medio de microscopía fotónica. A continuación se detallan los pasos de cada uno de los experimentos.

2.1 ANIMALES PARA EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 500 pollos Leghorn, machos, convencionales que fueron obtenidos inmediatamente después de su nacimiento de una incubadora comercial. Los pollos se mantuvieron hasta el día 28 de edad en jaulas en batería con piso de reja de alambre, con calentador eléctrico, ubicadas en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves (DPA:A) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A las aves se les proporcionó alimento balanceado comercial sin medicar de iniciación para polla de postura (Alimentos FLAGASA, S.A. de C.V., México D.F.), con 0.25% de NaCl y agua *ad libitum*. A cinco pollos al 1 y 28 días de edad se les realizó muestreo serológico, bacteriológico y necropsia. A las muestras para serología se les realizó aglutinación en placa (AP) para descartar *Salmonella* spp, así como *Mycoplasma synoviae* y *M. gallisepticum*. En los pollos de 28 días de edad, también se realizó prueba de ELISA para infección de bolsa de Fabricio (IBF), bronquitis infecciosa (BI) y reovirus, además de inhibición de la hemaglutinación (IH) de enfermedad de Newcastle (ENC) e influenza aviar (IA). Para bacteriología se

tomaron duodeno, ciego, hígado, bazo, corazón, médula ósea y saco vitelino para el aislamiento de *Salmonella* spp. Se consideró como el día 1 de la etapa de experimentación al día 28 de edad de los pollos. Para la obtención de las muestras, a todas las aves se les realizó eutanasia por dislocamiento cervical y se obtuvieron órganos según correspondiera a cada experimento.

2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

En los experimentos 1, 2 y 3, que a continuación se detallan, se utilizaron dos grupos de 80 pollos cada uno. El grupo 1 correspondió al inóculo del patógeno y el grupo 2, al inóculo de solución estéril amortiguada de fosfatos (PBS) a un pH de 7.4. A su vez cada grupo fue dividido aleatoriamente en dos repeticiones de 40 aves. Se utilizaron las mismas aves del grupo 2 para los tres experimentos. A las aves de los tres experimentos se les suministró su respectivo inóculo el primer día de la etapa de experimentación (Cuadro 2).

2.2.1 Experimento 1. Inoculación con *S. enteritidis* fagotipo 13

Preparación del inóculo

Se utilizó una cepa de *S. enteritidis* fagotipo 13, de baja virulencia y altamente invasiva para aves de más de 2 semanas de edad, donada por el "National Veterinary Services Laboratory", Ames, Iowa, USA. La bacteria fue ajustada, siguiendo la metodología descrita por Tellez *et al.*⁶⁶ a una concentración de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de PBS. Inmediatamente después de la utilización de este inóculo, se le verificó la concentración viable de UFC.

Inoculación de los pollos

A cada pollo del grupo 1 se le inoculó 1×10^8 UFC de *S. enteritidis* fagotipo 13 vía oral. A los pollos del grupo 2 se les inoculó 1 ml de PBS estéril vía oral (Cuadro 2).

Obtención, conservación de las muestras y recuperación de los inóculos

Al cabo de 4, 8 y 12 horas, así como 1,3, 5, 7 y 14 días después de la inoculación de los pollos, se obtuvo, para su análisis histológico, un segmento transversal de la parte media del ciego derecho, de 75 mm de largo. Las muestras se fijaron en formalina amortiguada a pH de 7.4, en una proporción 1:20 (tejido:formalina)⁶⁷, durante un mínimo de 24 h y un máximo de 14 días.

Para el aislamiento de *S. enteritidis* se tomó medio lóbulo izquierdo del hígado, el bazo y la porción sobrante de ciegos que se almacenaron en frascos estériles, en refrigeración a 4 C. Los órganos colectados se maceraron y se sembraron en caldo tetrionato y posteriormente en agar verde brillante, realizándose pruebas bioquímicas, con la técnica descrita por Mallinson y Snoeyenbos⁶⁸. Para descartar la presencia de *E. tenella*, se cosechó el contenido cecal y se mezcló en dicromato de potasio al 3% en una proporción 1:10 (contenido cecal:dicromato de potasio). Posteriormente, se observó conforme a la técnica de flotación en solución salina saturada descrita por Long *et al.*⁶⁹.

2.2.2 Experimento 2. Inoculación con *E. tenella* cepa MOR80.

Preparación del inóculo

Se utilizó la cepa virulenta, MOR80 de *E. tenella*, donada por el Dr. Reynaldo Moreno del DPA:A. Los ooquistes fueron cosechados, esporulados, almacenados y contados como lo describe Long *et al.*⁶⁹. La concentración del inóculo se ajustó a 1

X 10⁴ ooquistes esporulados/ml de PBS. Inmediatamente después de la utilización de este inóculo, se le verificó la concentración de ooquistes esporulados.

Inoculación de los pollos

A cada pollo del grupo 1 se le inoculó 1 X 10⁴ ooquistes esporulados de *E. tenella* cepa MOR80 vía oral. A los pollos del grupo 2 se les inoculó 1 ml de PBS estéril vía oral (Cuadro 2).

Obtención, conservación de las muestras y recuperación de los inóculos

La toma de muestras y la recuperación de los inóculos se realizaron de la misma manera que el experimento 1.

2.2.3 Experimento 3. inoculación con *S. enteritidis* fagotipo 13 y *E. tenella* cepa MOR80

Preparación de los inóculos

Los inóculos se prepararon de la misma manera que en los experimentos 1 y 2.

Inoculación de los pollos

A cada pollo del grupo 1 se le inoculó 1 X 10⁸ UFC de *S. enteritidis* fagotipo 13 vía oral e inmediatamente después se le inoculó 1 X 10⁴ ooquistes esporulados de *E. tenella* vía oral. A los pollos del grupo 2 se les inoculó 1 ml de PBS vía oral (Cuadro 2).

Obtención, conservación de las muestras y recuperación de los inóculos

La toma de muestras y la recuperación de los inóculos se realizaron de la misma manera que el experimento 1.

2.2.4 Experimento 4. Intoxicación con 3.25% de NaCl en el alimento y 1% de NaCl en el agua de bebida

Preparación del alimento y agua de bebida con NaCl

-Alimento con 3% de NaCl. Al alimento comercial se le adicionó 3% de NaCl al 99.5% (Laboratorio J. Baker, Edo. Mex.), para que contuviera en total 3.25%.

-Agua de bebida con 1% de NaCl. Al agua potable se agregó 1% de NaCl.

Intoxicación de los pollos

Se utilizaron dos grupos de 60 pollos cada uno, divididos en tres repeticiones por grupo. A los pollos del grupo 1 se les suministró alimento con 3.25% de NaCl durante 27 días y tomaron agua potable en proporción 1:2 (alimento:agua) los primeros 21 días y agua con 1% de NaCl de los 22 a los 27 días. Los pollos del grupo 2 consumieron alimento comercial sin suplemento extra de sal y agua potable en proporción 1:2 (alimento:agua) durante los 27 días (Cuadro 2).

Obtención de las muestras

A los 7, 14, 21 y 28 días del inicio de suministro de alimento con 3.25% de NaCl, se seccionó longitudinalmente al encéfalo y se cortó transversalmente a la médula espinal entre la 5a. y 6a. vértebras cervicales, obteniendo porciones de 3 mm de espesor, para su examen histológico. Las muestras se fijaron de la misma manera que en el experimento 1.

2.2.5 Experimento 5. Intoxicación con 1% de NaCl en el agua de bebida

Preparación del agua de bebida con NaCl

El agua de bebida se preparó de la misma manera que en el experimento 4.

Intoxicación de los pollos

Se utilizaron dos grupos de 12 pollos cada uno, divididos en tres repeticiones por grupo. Los pollos del grupo 1 tomaron agua con 1% de NaCl hasta que se les realizó eutanasia en el momento que presentaron signos clínicos. Los pollos del grupo 2 consumieron agua potable *ad libitum*, hasta que se les realizó eutanasia en el mismo tiempo que los del grupo 1 (Cuadro 2).

Obtención de las muestras

Después del suministro del agua con 1% de NaCl, a los pollos se les aplicó eutanasia cuando presentaron signología nerviosa como temores, movimientos de carrera o estado comatoso, lo que sucedió entre los 3 y 5 días de tratamiento y se tomaron las mismas muestras que para el experimento 4, fijándose de la misma manera que en el experimento 1.

2.2.6 Experimento 6. Tratamiento con anhídrido citracónico

Preparación de la solución de anhídrido citracónico

Se preparó una solución al 1% de AC (SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis MO) en sulfóxido de dimetilo (DMS) al 90% (Laboratorios CYANAMID, México D.F.).

Tratamiento de los pollos

Se utilizaron dos grupos de 10 pollos cada uno, divididos en dos repeticiones por grupo. A los pollos del grupo 1 en 1 cm² de piel del apterilo torácico izquierdo se les aplicó la solución de AC con hisopo, hasta humedecer la zona. La primera aplicación se realizó el primer día del experimento, seguido por otras dos, con siete días de intervalo. En los pollos del grupo 2 se utilizó la misma zona y metodología del anterior grupo, para la aplicación de DMS (Cuadro 2).

Obtención de las muestras

A los 30 min posteriores a la 3a aplicación de la solución de AC o DMS, se tomó 1 cm² de la piel tratada para su revisión histológica. Este fragmento de piel se colocó sobre una tarjeta de cartón para su fijación como en el experimento 1.

Cuadro 2. Número de aves, tratamiento y tiempo de muestreo posinoculación en pollos Leghorn de 28 días de edad.

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO ¹	TIEMPO DE MUESTREO												
		HORAS			DÍAS									
		4	8	12	1	3	4	5	7	14	21	26	27	
1	<i>S. enteritidis</i>	10 ⁿ	10	10	10 ⁿ	10	-	10	10	10	-	-	-	
2	<i>E. tenella</i>	10	10	10	10	10	-	10	10	10	-	-	-	
3	<i>E. tenella/S. enteritidis</i>	10	10	10	10	10	-	10	10	10	-	-	-	
1, 2 y 3	PBS ²	10	10	10	10	10	-	10	10	10	-	-	-	
4	NaCl(alimento/agua) ³	-	-	-	-	-	-	-	15	15	15	7	8	
4	NaCl 0.25% (Alimento) ⁴	-	-	-	-	-	-	-	15	15	15	7	8	
5	NaCl 1% (agua) ⁵	-	-	-	-	3	4	5	-	-	-	-	-	
5	Agua potable	-	-	-	-	3	4	5	-	-	-	-	-	
6	Anhidrido citracónico	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	
6	Sulfóxido de dimetilo	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	

¹ El tratamiento consistió en inoculación de *E. tenella* o *S. enteritidis*, intoxicación con NaCl o aplicación de anhídrido citracónico

² Solución amortiguada con fosfatos

³ Las aves consumieron alimento con 3.25% de NaCl los 28 días del tratamiento y además tomaron agua con 1% de NaCl del 22 al 27 días.

⁴ Las aves consumieron alimento con 0.25% de NaCl y agua potable los 28 días del tratamiento

⁵ Las aves tomaron agua con 1% de NaCl del día 1 al 5

ⁿ Número de aves

2.3 PROCESAMIENTO Y TINCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU EXAMEN HISTOLÓGICO

Las muestras fijadas de todos los experimentos, se procesaron según el método convencional de inclusión en parafina⁷⁰, para obtener secciones histológicas de 4 μm de espesor. Estas secciones se tiñeron con HE⁷¹ y ZN⁷².

Para la identificación de eosinófilos una mitad de los órganos fijados, se incubó en un sustrato compuesto por 10 mg de *p*-fenilenediamina dihidroclorido (PPD) (SIGMA Chemical Co., St. Louis MO), 20 mg de pirocatecol (PC) (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg NJ), 10 ml del amortiguador Tris (0.1 M) a un pH de 7.6⁶³. La incubación duró 180 min cambiando el sustrato a los 90 min por uno fresco. Después de este proceso, se incluyeron en parafina⁷⁰ y se realizó una sección histológica por muestra de 4 μm de espesor que se contratiñó con hematoxilina de Harris⁷¹.

A los encéfalos de los pollos de los experimentos 4 y 5 que mostraron leucocitos mononucleares, además, se realizó en una sección extra con las mismas características de las anteriores, la tinción de verde de metilo y pironina (VMP)⁷³.

2.4 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GRANULOCITOS.

Por medio del objetivo de inmersión (100x) de microscopía fotónica, se identificaron heterófilos, basófilos y eosinófilos, utilizando áreas seleccionadas con muestreo aleatorio simple de los cortes teñidos con HE, PPD+PC y ZN, respectivamente. Para cuantificar a los granulocitos cecales de los experimentos 1, 2 y 3 se

observaron 0.464 mm² de cada corte divididos en 5 áreas de submucosa y 5 de las áreas más superficiales de mucosa. Por lo que se obtuvieron:

- a) Heterófilos cecales de la mucosa (HCM).
- b) Heterófilos cecales de la submucosa (HCS).
- c) Heterófilos cecales totales (HCT) que incluyen los de la mucosa y submucosa.
- d) Basófilos cecales de la mucosa (BCM).
- e) Basófilos cecales de la submucosa (BCS).
- f) Basófilos cecales totales (BCT) que incluyen los de la mucosa y submucosa.
- g) Eosinófilos cecales de la mucosa (ECM).
- h) Eosinófilos cecales de la submucosa (ECS).
- i) Eosinófilos cecales totales (ECT) que incluyen los de la mucosa y submucosa.

Para el estudio del SNC de los experimentos 4 y 5 se observó la presencia de granulocitos en toda la sección histológica. Para cuantificar a los granulocitos cutáneos del experimento 6 se observaron 0.464 mm² de cada corte divididos en 5 áreas que incluían epidermis y dermis superficial, así como 5 áreas de dermis profunda. Utilizando el mismo criterio que para los granulocitos cecales se obtuvieron:

- a) Heterófilos cutáneos epidérmicos (HPE).
- b) Heterófilos cutáneos dérmicos (HPD).
- c) Heterófilos cutáneos totales (HPT) que incluyen los de epidermis y dermis.
- d) Basófilos cutáneos epidérmicos (BPE)
- e) Basófilos cutáneos dérmicos (BPD).
- f) Basófilos cutáneos totales (BPT) que incluyen los de epidermis y dermis.
- g) Eosinófilos cutáneos epidérmicos (EPE).
- h) Eosinófilos cutáneos dérmicos (EPD).
- i) Eosinófilos cutáneos totales (EPT) que incluyen los de epidermis y dermis.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los valores totales de granulocitos se les aplicó análisis de varianza multivariado, donde las variables de respuesta fueron la cantidad de los diferentes granulocitos, mientras que las variables explicativas fueron los factores causales, así como, el curso y la distribución de los granulocitos. A las cantidades de granulocitos por órgano se les aplicó una transformación logarítmica, sumándoles una unidad para evitar las cantidades cero. A las medias se les aplicó análisis Tukey para sus diferencias^{74,75}. La significancia estadística se fijó con una $P < 0.05$.

3.0 RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS SEROLÓGICOS Y BACTERIOLÓGICOS, PREVIOS A LA ETAPA DE EXPERIMENTACIÓN

En los pollos de 1 y 28 días de edad las pruebas de AP resultaron negativas para *Salmonella* spp, *M. synoviae* y *M. gallisepticum*. Así como, las pruebas de IH para la ENc e IA. Los aislamientos bacteriológicos a partir de muestras de duodeno, ciego, hígado, bazo, corazón, médula ósea y saco vitelino resultaron negativos para *Salmonella* spp. En los pollos de 28 días de edad, las pruebas de ELISA no mostraron anticuerpos contra IBF, BI y reovirus.

3.2 IDENTIFICACIÓN DE GRANULOCITOS

Heterófilos. Estas células se observaron con la tinción de HE, como células de redondas a ovales, con núcleo basofílico monolobulado o bilobulado y con abundante citoplasma que contenía gránulos, eosinofílicos, circulares y en forma de bastón, que fueron mieloperoxidasa negativos con la tinción de PPD+PC.

Basófilos. Estos leucocitos cuando se localizaron en piel se apreciaron, con la tinción de ZN, como células redondas con núcleo en su mayoría monolobulado, aunque algunos eran bilobulados. Estas células presentaban citoplasma de escaso a moderado, con gránulos de esféricos a ovales que en su mayoría eran de color azul y algunos rojos. Los basófilos cecales eran de ovales a fusiformes con núcleo en su mayoría monolobulado, aunque algunos presentaban dos lóbulos y abundante citoplasma magenta. La mayoría de los basófilos en tejido conjuntivo de la submucosa presentaban gránulos azules y rojos, mientras que los gránulos de los BCM podían o no ser aparentes.

Eosinófilos. Éstos se observaron con la tinción de PPD+PC, como células esféricas con núcleo monolobulado o bilobulado y con abundante citoplasma que contenía abundantes gránulos café oscuro, circulares.

3.3 CUANTIFICACIÓN DE GRANULOCITOS

3.3.1 Experimentos 1, 2 y 3. Inoculación con *S. enteritidis* fagotipo 13, con *E. tenella* cepa MOR80 y con *S. enteritidis* fagotipo 13 y *E. tenella* cepa MOR80

CUANTIFICACIÓN DE HETERÓFILOS

Efecto del curso de la infección sobre la presencia de heterófilos cecales totales, en mucosa y en submucosa

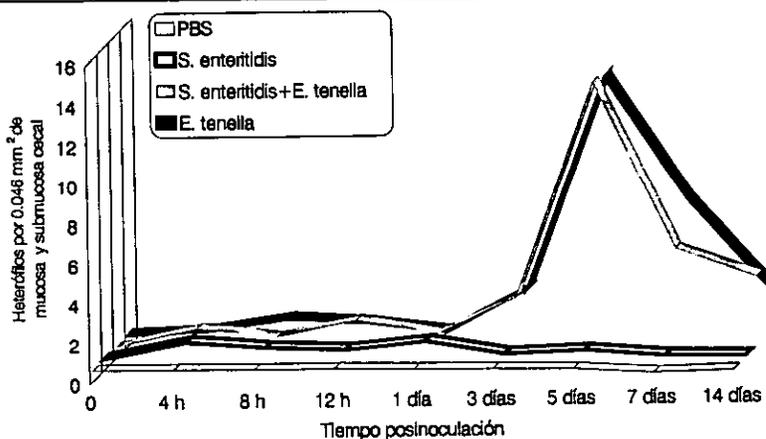
La cantidad de HCT, HCM y HCS, en los pollos inoculados con *S. enteritidis*, no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las diferentes tomas (Figuras 1, 2 y 3). En los pollos inoculados con *E. tenella*, los HCT de la toma del día 5 estaban en mayor cantidad ($P < 0.05$), disminuyendo ($P < 0.05$) el día 7 y decreciendo ($P < 0.05$) aún más el día 14, hasta llegar a la cantidad de las primeras 5 tomas (Figura 1). Mientras que los HCM tuvieron su mayor cantidad ($P < 0.05$) los días 5 y 7 Pi (Figura 2). Los HCS presentaron su mayor cantidad ($P < 0.05$) en el día 5 Pi, disminuyendo ($P < 0.05$) el día 7 y decreciendo ($P < 0.05$) aún más el día 14, hasta llegar a la cantidad de las primeras 5 tomas (Figura 3). Los pollos inoculados con *S. enteritidis* y *E. tenella* presentaron la mayor cantidad ($P < 0.05$) de HCT en el día 5 Pi, disminuyendo ($P < 0.05$) los días 7 y 14 (Figura 1). Estas aves presentaron la mayor cantidad ($P < 0.05$) de HCM el día 5 Pi, decreciendo ($P < 0.05$) los días 7 y 14 hasta el nivel de las 12 h de inoculación (Figura 2). Mientras que los HCS tuvieron su mayor cantidad ($P < 0.05$) a los 5 días Pi, disminuyendo ($P < 0.05$) hasta su nivel anterior en la siguiente toma (Figura 3).

Efecto de los diferentes inóculos sobre la presencia de heterófilos cecales totales, en mucosa o en submucosa

Los pollos inoculados con *E. tenella* y con *E. tenella* y *S. enteritidis* tuvieron mayor cantidad de HCT ($P < 0.05$) en los días 5 y 7 Pi con respecto a los inoculados con *S. enteritidis* y PBS (Figura 1). Mientras que los HCM de estos pollos, mostraron su

mayor cantidad ($P<0.05$) en los días 5, 7 y 14 con respecto a los inoculados con *S. enteritidis* y PBS (Figura 2). Los HCS de las aves inoculadas con *E. tenella* mostraron su mayor cantidad ($P<0.05$) en los días 5 y 7 Pi con respecto a los inoculados con *S. enteritidis* y PBS, mientras que los inoculados con *E. tenella* y *S. enteritidis* presentaron su mayor cantidad en el día 5 Pi con respecto a los inoculados con *S. enteritidis* y con PBS (Figura 3).

Figura 1: Heterófilos presentes en mucosa y en submucosa cecal de pollos Leghorn inoculados con *S. enteritidis*, *S. enteritidis* + *E. tenella*, *E. tenella* y PBS.



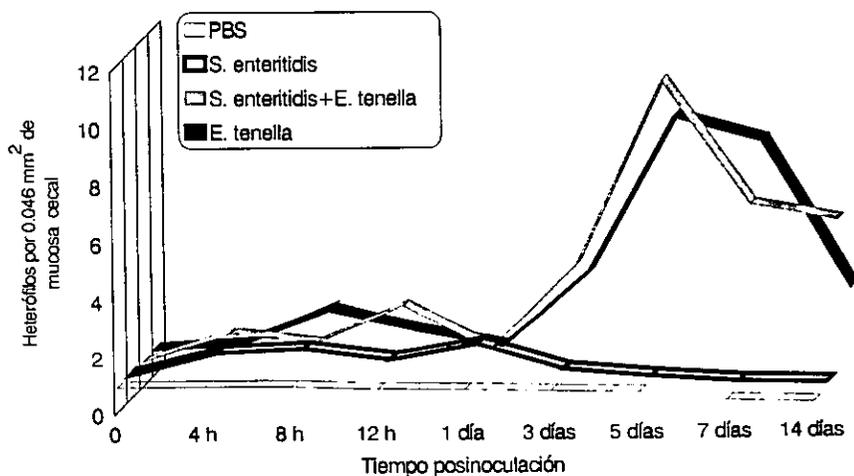
MUESTREO POSINOCULACIÓN	INÓCULO			
	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. tenella</i>	<i>S. enteritidis</i> + <i>E. tenella</i>	PBS ¹
4 h	1.35 (0.65) ^{a (a)}	0.71 (0.41) ^{a (a)}	1.44 (1.53) ^{a (a)}	0.55 (0.29) ^{a (a)}
8 h	1.03 (0.79) ^{a (a)}	1.28 (1.44) ^{a (a)}	0.98 (0.55) ^{a (a)}	0.52 (0.58) ^{a (a)}
12 h	0.90 (0.46) ^{a (a)}	1.03 (0.79) ^{a (a)}	1.77 (1.37) ^{a (a)}	0.53 (0.50) ^{a (a)}
1 día	1.28 (0.89) ^{a (a)}	0.54 (0.39) ^{a (a)}	1.04 (0.63) ^{a (a)}	0.46 (0.47) ^{a (a)}
3 días	0.60 (0.71) ^{a (a)}	2.63 (2.50) ^{a (a)}	2.80 (3.21) ^{a (a b)}	0.45 (0.29) ^{a (a)}
5 días	0.74 (0.75) ^{a (a)}	13.28 (6.29) ^{b (b)}	13.64 (3.93) ^{b (c)}	0.39 (0.16) ^{a (a)}
7 días	0.43 (0.16) ^{a (a)}	7.15 (4.20) ^{b (c)}	5.22 (2.73) ^{b (b)}	0.17 (0.20) ^{a (a)}
14 días	0.37 (0.15) ^{a (a)}	2.61 (1.87) ^{a (a)}	3.73 (2.38) ^{a (b)}	0.27 (0.16) ^{a (a)}

* Media (desviación estándar)

¹ Solución amortiguada con fosfatos

Literales distintas fuera del paréntesis señalan diferencia significativa ($P<0.05$) dentro del mismo renglón
 Literales distintas entre paréntesis señalan diferencia significativa ($P<0.05$) dentro de la misma columna

Figura 2: Heterófilos presentes en mucosa cecal de pollos Leghorn inoculados con *S. enteritidis*, *S. enteritidis* + *E. tenella*, *E. tenella* y PBS



INÓCULO

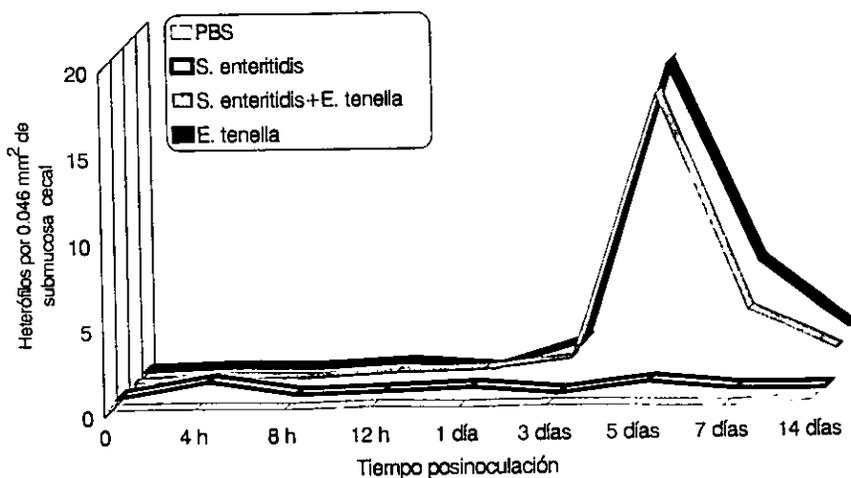
MUESTREO POSINOCULACIÓN	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. tenella</i>	<i>S. enteritidis</i> + <i>E. tenella</i>	PBS ¹
4 h	1.62 (0.66) ^{a(a)}	1.02 (0.54) ^{a(a)}	1.84 (1.53) ^{a(a,b)}	0.86 (0.50) ^{a(a)}
8 h	1.76 (1.63) ^{a(a)}	2.24 (2.76) ^{a(a)}	1.50 (1.09) ^{a(a,b)}	0.86 (0.98) ^{a(a)}
12 h	1.36 (0.80) ^{a(a)}	1.49 (0.40) ^{a(a)}	2.82 (2.25) ^{a(a,b,c)}	0.76 (0.88) ^{a(a)}
1 día	1.88 (1.58) ^{a(a)}	0.90 (0.71) ^{a(a)}	1.24 (0.88) ^{a(a)}	0.72 (0.88) ^{a(a)}
3 días	0.98 (1.37) ^{a(a)}	3.47 (4.06) ^{a(a)}	4.16 (4.50) ^{a(a,b,c)}	0.65 (0.59) ^{a(a)}
5 días	0.72 (0.40) ^{a(a)}	8.86 (4.82) ^{b(b)}	10.58 (4.91) ^{b(d)}	0.60 (0.34) ^{a(a)}
7 días	0.52 (0.21) ^{a(a)}	8.00 (6.44) ^{b(b)}	6.24 (4.30) ^{b(c)}	0.29 (0.43) ^{a(a)}
14 días	0.44 (0.18) ^{a(a)}	2.90 (1.99) ^{a(b)}	5.67 (3.90) ^{b(b,c)}	0.20 (0.21) ^{a(a)}

* Media (desviación estándar)

¹ Solución amortiguada con fosfatos

Literales distintas fuera del paréntesis señalan diferencia significativa (P<0.05) dentro del mismo renglón
Literales distintas entre paréntesis señalan diferencia significativa (P<0.05) dentro de la misma columna

Figura 3: Heterófilos presentes en submucosa cecal de pollos Leghorn inoculados con *S. enteritidis*, *S. enteritidis*+*E. tenella*, *E. tenella* y PBS.



INÓCULO

MUESTREO POSINOCULACIÓN	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. tenella</i>	<i>S. enteritidis</i> + <i>E. tenella</i>	PBS ¹
4 h	1.08 (0.81) ^{a (a)}	0.40 (0.41) ^{a (a)}	0.53 (0.57) ^{a (a)}	0.24 (0.21) ^{a (a)}
8 h	0.31 (0.20) ^{a (a)}	0.32 (0.25) ^{a (a)}	0.46 (0.28) ^{a (a)}	0.18 (0.22) ^{a (a)}
12 h	0.44 (0.30) ^{a (a)}	0.58 (0.39) ^{a (a)}	0.72 (0.75) ^{a (a)}	0.30 (0.22) ^{a (a)}
1 día	0.62 (0.60) ^{a (a)}	0.18 (0.15) ^{a (a)}	0.84 (0.80) ^{a (a)}	0.20 (0.19) ^{a (a)}
3 días	0.22 (0.18) ^{a (a)}	1.70 (1.22) ^{a (a)}	1.41 (2.08) ^{a (a)}	0.25 (0.18) ^{a (a)}
5 días	0.82 (1.45) ^{a (a)}	17.70 (9.50) ^{b (b)}	16.71 (5.33) ^{b (b)}	0.18 (0.20) ^{a (a)}
7 días	0.34 (0.23) ^{a (a)}	6.30 (4.52) ^{b (c)}	4.20 (2.70) ^{a b (a)}	0.06 (0.10) ^{a (a)}
14 días	0.30 (0.22) ^{a (a)}	2.32 (2.09) ^{a (a)}	1.80 (2.01) ^{a (a)}	0.34 (0.30) ^{a (a)}

* Media (desviación estándar)

¹ Solución amortiguada con fosfatos

Literales distintas fuera del paréntesis señalan diferencia significativa ($P < 0.05$) dentro del mismo renglón
 Literales distintas entre paréntesis señalan diferencia significativa ($P < 0.05$) dentro de la misma columna

CUANTIFICACIÓN DE BASÓFILOS

Efecto del curso de la infección sobre la presencia de basófilos cecales totales, en mucosa y en submucosa

En los pollos inoculados con *S. enteritidis* no se apreció cambio significativo ($P>0.05$) en la cantidad de BCT, BCM y BCS entre las tomas (Figuras 4, 5 y 6). Las aves inoculadas con *E. tenella* no presentaron diferencia ($P>0.05$) en la cantidad de BCT y BCS entre las tomas. Sin embargo, si tuvieron mayor cantidad de BCM en los días 7 y 14 Pi con respecto a las tomas anteriores (Figura 5). En los pollos inoculados con *S. enteritidis* y *E. tenella* se observó que los BCT disminuyeron ($P<0.05$) su cantidad a los 3 y 5 días Pi con respecto a las tomas anteriores y recuperaron ($P<0.05$) su cantidad hasta los 7 días Pi (Figuras 4). Sin embargo, los BCM aumentaron ($P<0.05$) su cantidad en los días 7 y 14 Pi con respecto a las tomas anteriores (Figuras 5). Mientras que los BCS disminuyeron su cantidad ($P<0.05$) al día 3 Pi, con respecto al día 1 Pi y recuperaron ($P<0.05$) su cantidad hasta el día 7 Pi (Figura 6).

Efecto de los diferentes inóculos sobre la presencia de basófilos cecales

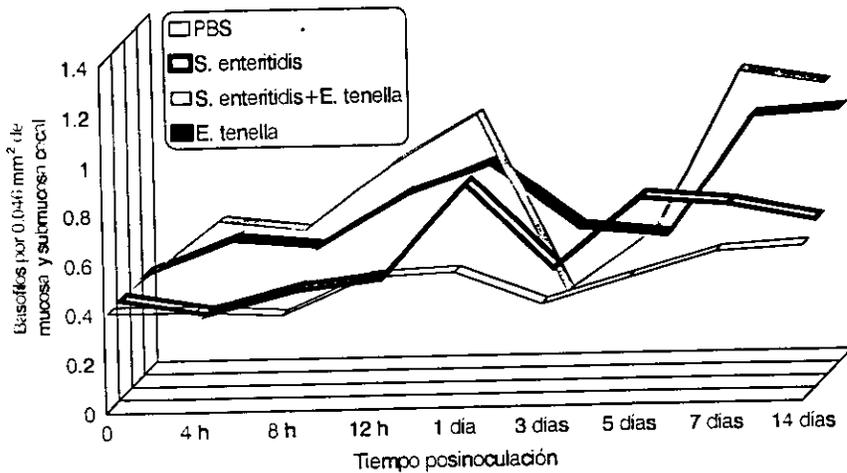
Los pollos inoculados con *S. enteritidis* tuvieron mayor cantidad de BCT ($P<0.05$) que los inoculados con PBS al día 1 Pi. Las aves inoculadas con *E. tenella* presentaron más BCT ($P<0.05$) que los inoculados PBS en los días 1, 7 y 14 Pi. Los pollos inoculados con *S. enteritidis* y *E. tenella* mostraron mayor cantidad de BCT ($P<0.05$) que los inoculados con PBS a las 4 y 12 h, así como en los días 1, 7 y 14 Pi. Estos pollos también presentaron mayor cantidad de BCT que los inoculados con *S. enteritidis* a las 4 y 12 h, así como a los 7 y 14 días (Figura 4).

Efecto de los diferentes inóculos sobre la presencia de basófilos cecales totales, en mucosa o en submucosa

Los pollos inoculados con *S. enteritidis* y *E. tenella* presentaron mayor cantidad de BCT ($P<0.05$) que los inoculados con PBS en los 7 y 14 días Pi (Figura 4). Sin

embargo, las aves inoculadas con *E. tenella* y con *S. enteritidis* y *E. tenella* mostraron mayor cantidad ($P<0.05$) de BCM que los inoculados en los días 7 y 14 con *S. enteritidis* y con PBS (Figura 5). Mientras que los BCS no tuvieron diferencia ($P>0.05$) entre los distintos tratamientos (Figura 6).

Figura 4: Basófilos presentes en mucosa y en submucosa cecal de pollos Leghorn inoculados con *S. enteritidis*, *S. enteritidis*+*E. tenella*, *E. tenella* y PBS.



INÓCULO

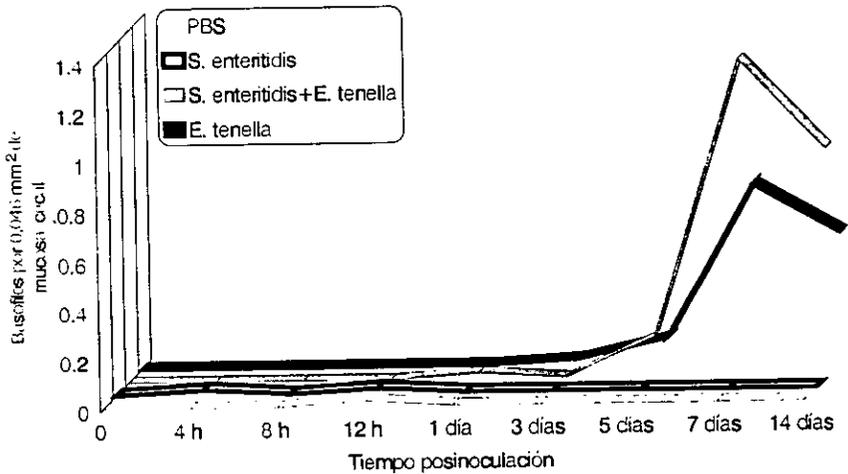
MUESTREO POSINOCULACIÓN	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. tenella</i>	<i>S. enteritidis</i> + <i>E. tenella</i>	PBS
4 h	0.33 (0.15) ^{a (a)}	0.52 (0.32) ^{a (a)}	0.65 (0.29) ^{a (a b c)}	0.39 (0.13) ^{a (a)}
8 h	0.42 (0.16) ^{a (a)}	0.49 (0.22) ^{a (a)}	0.61 (0.36) ^{a (a b c)}	0.37 (0.22) ^{a (a)}
12 h	0.46 (0.23) ^{a (a)}	0.69 (0.33) ^{a (a)}	0.87 (0.39) ^{a (a b c)}	0.52 (0.19) ^{a (a)}
1 día	0.85 (0.47) ^{a (a)}	0.82 (0.28) ^{a (a)}	1.07 (0.38) ^{a (a b)}	0.54 (0.29) ^{a (a)}
3 días	0.49 (0.22) ^{a (a)}	0.55 (0.40) ^{a (a)}	0.34 (0.26) ^{a (c)}	0.40 (0.34) ^{a (a)}
5 días	0.77 (0.40) ^{a (a)}	0.51 (0.28) ^{a (a)}	0.58 (0.32) ^{a (c b)}	0.50 (0.49) ^{a (a)}
7 días	0.74 (0.46) ^{a b (a)}	0.99 (0.57) ^{a b (a)}	1.22 (0.66) ^{a (a)}	0.60 (0.24) ^{b (a)}
14 días	0.67 (0.39) ^{a b (a)}	1.01 (0.38) ^{a b (a)}	1.16 (0.48) ^{a (a b)}	0.62 (0.16) ^{b (a)}

* Media (desviación estándar)

¹ Solución amortiguada con fosfatos

Literales distintas fuera del paréntesis señalan diferencia significativa ($P<0.05$) dentro del mismo renglón
Literales distintas entre paréntesis señalan diferencia significativa ($P<0.05$) dentro de la misma columna

Figura 5: Basófilos presentes en mucosa cecal de pollos Leghorn inoculados con *S. enteritidis*, *S. enteritidis*+*E. tenella*, *E. tenella* y PBS



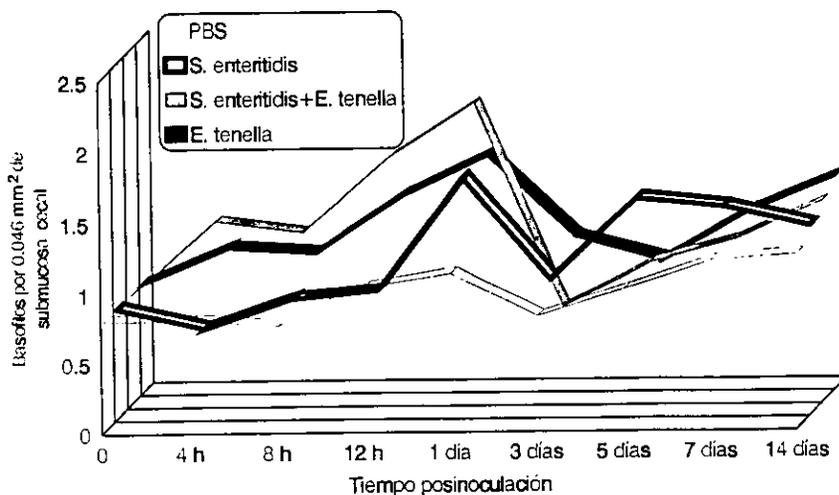
MUESTREO POSINOCULACIÓN	INÓCULO			
	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. tenella</i>	<i>S. enteritidis</i> + <i>E. tenella</i>	PBS ¹
4 h	0.02 (0.06) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}
8 h	0 (0) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}
12 h	0.02 (0.06) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}	0.02 (0.06) ^{a (a)}
1 día	0 (0) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}	0.02 (0.06) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}
3 días	0 (0) ^{a (a)}	0.02 (0.06) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}
5 días	0 (0) ^{a (a)}	0.10 (0.10) ^{a (a)}	0.16 (0.18) ^{a (a)}	0 (0) ^{a (a)}
7 días	0 (0) ^{a (a)}	0.72 (0.51) ^{b (b)}	1.28 (0.85) ^{b (b)}	0 (0) ^{a (a)}
14 días	0 (0) ^{a (a)}	0.52 (0.38) ^{b (b)}	0.91 (0.62) ^{b (b)}	0 (0) ^{a (a)}

^a Media (desviación estándar)

¹ Solución amortiguada con fosfatos

Literales distintas fuera del paréntesis señalan diferencia significativa ($P < 0.05$) dentro del mismo renglón
 Literales distintas entre paréntesis señalan diferencia significativa ($P < 0.05$) dentro de la misma columna

Figura 6: Basófilos presentes en submucosa cecal de pollos Leghorn inoculados con *S. enteritidis*, *S. enteritidis*+*E. tenella*, *E. tenella* y PBS.



MUESTREO POSINOCULACIÓN	INÓCULO			
	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. tenella</i>	<i>S. enteritidis</i> + <i>E. tenella</i>	PBS ¹
4 h	0.64 (0.30) ^{a (a)}	1.02 (0.59) ^{a (a)}	1.30 (0.57) ^{a (a,b)}	0.78 (0.26) ^{a (a)}
8 h	0.84 (0.34) ^{a (a)}	0.98 (0.44) ^{a (a)}	1.22 (0.71) ^{a (a,b)}	0.74 (0.43) ^{a (a)}
12 h	0.90 (0.42) ^{a (a)}	1.38 (0.66) ^{a (a)}	1.74 (0.78) ^{a (a,b)}	1.02 (0.37) ^{a (a)}
1 día	1.69 (0.90) ^{a (a)}	1.66 (0.53) ^{a (a)}	2.13 (0.73) ^{a (a)}	1.12 (0.65) ^{a (a)}
3 días	0.98 (0.44) ^{a (a)}	1.09 (0.79) ^{a (a)}	0.68 (0.51) ^{a (b)}	0.80 (0.68) ^{a (a)}
5 días	1.54 (0.80) ^{a (a)}	0.92 (0.55) ^{a (a)}	1.00 (0.57) ^{a (b)}	1.00 (0.98) ^{a (a)}
7 días	1.48 (0.93) ^{a (a)}	1.26 (0.77) ^{a (a)}	1.16 (0.69) ^{a (a,b)}	1.20 (0.48) ^{a (a)}
14 días	1.34 (0.79) ^{a (a)}	1.50 (0.56) ^{a (a)}	1.42 (0.67) ^{a (a,b)}	1.24 (0.33) ^{a (a)}

^a Media (desviación estándar)

¹ Solución amortiguada con fosfatos

Literales distintas fuera del paréntesis señalan diferencia significativa ($P < 0.05$) dentro del mismo renglón
 Literales distintas entre paréntesis señalan diferencia significativa ($P < 0.05$) dentro de la misma columna

CUANTIFICACIÓN DE EOSINÓFILOS

En los pollos tratados con *S. enteritidis* y *E. tenella* sólo se encontró un promedio de 0.02 ECM y ECT en el día 5 Pi, cantidad significativamente mayor ($P < 0.05$) con respecto a ECM y ECT del resto de las tomas e inóculos con excepción ($P > 0.05$) de los ECT de la misma toma de los pollos inoculados con *E. tenella*. Los pollos tratados con *E. tenella* presentaron 0.01 de ECS y ECT, cantidad sin diferencia significativa ($P > 0.05$) con respecto al resto de las tomas e inóculos. En la toma del día 5 de inoculación con *E. tenella* y con *S. enteritidis* y *E. tenella* se apreciaron áreas amplias y abundantes de hemorragias, las cuales contenían los eosinófilos.

AISLAMIENTO DE *S. enteritidis*

Se aisló *S. enteritidis* de los pollos inoculados con *S. enteritidis* y con *S. enteritidis* y *E. tenella* de todas las tomas de ciego a partir de las 8 h, mientras que de hígado y bazo a partir de los 3 días. De los pollos inoculados con *E. tenella* y PBS, no se aisló *Salmonella* sp.

RECUPERACIÓN DE LA *E. tenella*

Se observaron ooquistes de *E. tenella* de los pollos inoculados con *E. tenella* y con *S. enteritidis* y *E. tenella* de todas las tomas de contenido ciego a partir de los 5 días. De los pollos inoculados con *S. enteritidis* y PBS, no se observaron *E. tenella*.

3.3.2 Experimentos 4 y 5. Intoxicación con 3.25% de NaCl en el alimento y con 1% de NaCl en el agua de bebida

Ninguna de las secciones de encéfalo o médula espinal presentaron algún tipo de granulocito. Sin embargo, en la toma 4 de los experimentos 4 y 5 se encontraron 2 y 10 encéfalos, respectivamente, con infiltrado de leve a severo de células inflamatorias mononucleares, con pleomorfismo celular, abundante citoplasma vacuolado. El citoplasma de estas células con tinción de VMP, fue pironino débilmente positivo, por lo que estas células son compatibles con linfocitos T inmaduros.

3.3.3 Experimento 6. Tratamiento con anhídrido citracónico

La cantidad de heterófilos no mostraron diferencia ($P>0.05$) entre los pollos tratados con AC o DMS. Los BPE, BPD y BPT, se encontraron en mayor cantidad ($P<0.05$) en los pollos tratados con AC que en los tratados con DMS. Mientras que las aves tratadas con AC presentaron mayor cantidad ($P<0.05$) de EPE que las tratadas con DMS (Cuadro 3).

Cuadro 3: Granulocitos presentes¹ en epidermis, dermis y totales en piel de pollos Leghorn, tratados con anhídrido citracónico (AC).

GRANULOCITO	TRATAMIENTO	
	AC	DMS ²
Heterófilos cutáneos epidérmicos ³	0.68 (0.56) ^{*a}	0.64 (0.24) ^a
Heterófilos cutáneos dérmicos	4.83 (2.67) ^a	1.69 (1.28) ^a
Heterófilos cutáneos totales	2.76 (2.84) ^a	1.16 (1.03) ^a
Basófilos cutáneos epidérmicos ³	0.72 (0.28) ^a	0.12 (0.18) ^b
Basófilos cutáneos dérmicos	1.45 (1.16) ^a	0.03 (0.06) ^b
Basófilos cutáneos totales	0.89 (1.08) ^a	0.07 (0.13) ^b
Eosinófilos cutáneos epidérmicos ³	0.07 (0.08) ^a	0.00 (0.00) ^b
Eosinófilos cutáneos dérmicos	0.05 (0.06) ^a	0.02 (0.05) ^a
Eosinófilos cutáneos totales	0.06 (0.07) ^a	0.01 (0.03) ^a

¹ Área de tejido evaluada: 0.046 mm²

² Sulfóxido de dimetilo

³ Incluye granulocitos de epidermis y dermis superficial

* Media (desviación estándar)

Literales distintas señalan diferencia significativa ($P<0.05$) dentro del mismo renglón

4.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En los experimentos realizados con pollos Leghorn inoculados con *S. enteritidis*, con *E. tenella*, con *S. enteritidis* y *E. tenella* y tratados con AC, los heterófilos se observaron redondos, con núcleo monolobulado o bilobulado y sus gránulos eran esféricos o en forma de bastón y mieloperoxidasa negativos. Lo anterior concuerda con Montali³, quien informa que los heterófilos de la mayoría de las aves, son células redondas que presentan una o varias lobulaciones del núcleo y sus gránulos son acidófilos, peroxidasa negativos, esféricos o en forma de bastón. Sin embargo, Montali³ no especifica el tipo de ave que presenta este tipo de granulación, ya que los heterófilos de los patos presentan granulaciones esféricas¹⁷. En esta investigación, la mayoría de los heterófilos encontrados en los procesos inflamatorios causado por *E. tenella* o por *S. enteritidis*, se hallaban degenerados y con sus gránulos tumefactos. Esta tumefacción producía que los gránulos mostraron aspecto esférico. Estas observaciones concuerdan con Barnes¹⁷ y Latimer *et al.*⁷⁶, quienes informan que en pollos y pavos, los heterófilos maduros tienen gránulos en forma de bastón. Sin embargo, cuando estos leucocitos están degenerados, autolíticos o son inmaduros, sus gránulos se aprecian esféricos¹⁷. Cuando existen estas similitudes morfológicas entre heterófilos y eosinófilos es necesario hacer tinciones especiales para distinguir heterófilos de eosinófilos.

En esta investigación, los basófilos se colorearon adecuadamente con la tinción de ZN, hallazgo observado por Adamu⁶⁴, quien comprobó que la tinción de ZN es más efectiva que la de azul de toluidina para teñir basófilos cutáneos en perro. Los basófilos cutáneos se apreciaron, con la tinción de ZN, como células redondas con núcleo en su mayoría monolobulado. Estas células presentaban citoplasma de escaso a moderado, con gránulos de esféricos a ovals que en su mayoría

eran de color azul y algunos rojos. Los basófilos cecales eran de ovales a fusiformes con núcleo en su mayoría monolobulado, aunque algunos presentaban dos lóbulos, y abundante citoplasma magenta, con gránulos azules y rojos. Estos hallazgos discrepan con Rose *et al.*⁷⁷, quienes no observó diferencia tintorial entre los gránulos de los basófilos de piel con los de intestino. La discrepancia entre lo encontrado en este trabajo y lo observado por Rose *et al.*⁷⁷, se puede deber a que Rose *et al.*⁷⁷, utilizaron la tinción de azul alciano con safranina para evidenciar a los basófilos. Becker *et al.*¹⁵, encontraron diferentes afinidades tintoriales de los gránulos de basófilos en la piel de perro, estos autores también utilizaron azul alciano y safranina. Por otra parte, la ausencia de gránulos en los BCM se puede deber al estímulo antigénico producido por los inóculos de *E. tenella* o de *E. tenella* y *S. enteritidis*. Esto se ha comprobado en mamíferos, donde los basófilos tienen receptores específicos para la fracción cristalizable de la IgE. Cuando los antígenos se unen a dos moléculas de IgE que estén adheridas a la membrana del basófilo y cercanas entre sí, causan la liberación de las sustancias contenidas en gránulos citoplasmáticos¹⁴.

La tinción de PPD+PC resultó fácil, segura y específica para la mieloperoxidasa contenida en los gránulos de los eosinófilos en pollos tratados con AC, hallazgos que concuerdan con Hanker⁶³, quien encontró que este cromógeno es fácil de preparar, no es carcinogénico y marca la peroxidasa de los granulocitos de rata. Montali³ también encontró que esta tinción es eficaz para identificar a los eosinófilos en procesos inflamatorios aviares. Los eosinófilos se observaron redondos, con núcleo monolobulado o bilobulado con abundantes gránulos café oscuros, observados con la tinción de PPD+PC, características que concuerdan con lo informado por Maxwell⁵⁵, quien señala que son células redondas con gránulos esféricos y cafés oscuros con la tinción de PPD+PC.

En la respuesta inflamatoria exhibida en los pollos inoculados con *S. enteritidis*, no se encontró participación estadísticamente significativa de los heterófilos. Pero se observó aumento importante de heterófilos, similar al descrito por Kogut *et al.*⁴⁷ en la fase aguda de la infección por *S. enteritidis*. También, Porter y Holt⁴², hallaron heterófilos dentro de los 4 días Pi por *S. enteritidis* en gallinas de postura. Otro hallazgo que demuestra esta participación de los heterófilos es el informado por Kogut *et al.*⁴⁷, quienes encontraron que pollos Leghorn de 2 semanas de edad, tratados con 5-FU, droga que produce reducción en la cantidad de heterófilos, necesitaban 4,000 veces menos cantidad de *S. enteritidis* para provocarles septicemia.

Los resultados de este trabajo demuestran la participación de los heterófilos cecales en el proceso inflamatorio, a los 5 y 7 días Pi oral de *E. tenella* en pollos Leghorn. Estos días Pi coinciden con la liberación de merozoitos y con la ruptura y necrosis del epitelio cecal⁴⁸. Los heterófilos se encontraron tanto en mucosa como en submucosa. Estos resultados concuerdan con los de McDougald y Reid⁴⁸, quienes encontraron infiltrado heterófilico en la submucosa cecal, en pollos infectados con *Eimeria tenella*, conforme se desarrollan los esquizontes de segunda generación en la lámina propia. También Rose *et al.*⁴¹ encontraron aumento en los heterófilos sanguíneos, a los 3 y 10 días de la inoculación con *Eimeria maxima* en pollos Leghorn. En otra investigación, Rose *et al.*⁷⁸, observaron aumento de los heterófilos sanguíneos a los 150 min Pi de *E. maxima* y su disminución a los días 1, 2 y 3 Pi. Huff y Clark⁷⁹, demostraron la presencia de heterófilos en exudado peritoneal en pollos Leghorn a los 15 min de la inoculación intraperitoneal con *E. tenella*. La diferencia en los tiempos de aparición de los heterófilos se pudiera deber a la muestra examinada y a la especie de *Eimeria* empleada. No hubo diferencia entre la cantidad de heterófilos entre los pollos inoculados con *E. tenella* y los inoculados con *S. enteritidis* y *E. tenella*, por lo que la combinación de estos dos

microorganismos no parecen formar sinergismo para la atracción de heterófilos. La falta de sinergismo se pudiera deber a que la infección con *E. tenella* induce resistencia a la invasión por *S. enteritidis* de hígado y bazo de pollos Leghorn⁸⁰. En esta investigación se observó que a pesar de que la *S. enteritidis* produjo menor infiltrado de heterófilos que la *E. tenella*, la *S. enteritidis* pudo causar septicemia al haber colonizado hígado y bazo.

La llegada de heterófilos al área de infección de *E. tenella* se puede deber a factores quimiotácticos liberados por la necrosis del epitelio, por las distintas fases de maduración de la *E. tenella* y por la penetración bacteriana hacia el interior de la mucosa⁸¹. La necrosis del epitelio puede liberar sustancias quimiotácticas para los heterófilos como la IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Además los macrófagos de pollos infectados con *E. tenella* o *E. maxima* tienen mayor capacidad de producir IL-1 y TNF α ⁸². Klasing¹⁶, menciona que la IL-1 produce heterofilia en pollos. Otra citocina liberada en infecciones por protozoarios son el factor estimulante de colonias de granulocitos⁸³, que al parecer explicaría el aumento de HCT y del aumento de heterófilos circulantes en pollos infectados con *E. tenella*^{16,41}. Hernández *et al.*⁸⁴, demostraron en pollos de engorda tratados con 5-FU e inoculados con *E. tenella*, que la ausencia de heterófilos aumenta la cantidad de ooquistes y el grado de severidad de las lesiones producidas por *E. tenella*. Huff y Clark⁷⁹, observaron que los heterófilos de pollos Leghorn son capaces de fagocitar esporozoitos de *E. tenella*. Stabler *et al.*³⁰, probaron en pollos de engorda, que los heterófilos pueden fagocitar y lisar a la *S. enteritidis*, aún en ausencia de opsoninas.

En los pollos inoculados con *S. enteritidis* y *E. tenella* se observó disminución en la cantidad de BCS y BST en los días 3 y 5 Pi, con aumento de BCM en los días 7 y 14 Pi. La disminución de basófilos concuerda con Rose *et al.*⁷⁷, quienes observaron su disminución en duodeno, entre los días 4 y 11 Pi con *Eimeria acervulina* a pollos

Leghorn. También Gray⁴⁰ encontró disminución de basófilos entéricos a los 4 días de la infección secundaria con *Raillietinia cesticillus* de pollos, sin embargo, a los 8 días de la infección encontró mayor abundancia de estos granulocitos.

La mayor cantidad de BCM encontrados al séptimo día Pi de *E. tenella* con la disminución de BCS y BCT sugieren la posible migración de estos granulocitos hacia la mucosa, lo que concuerda con Natt⁸⁵, quien no observó variación en la cantidad de basófilos circulantes en la infección por *E. tenella*. También la disminución de BCM concuerda con Opengart *et al.*³³, quienes encontraron mayor cantidad de basófilos en la mucosa duodenal de pavos inoculados con el virus de la enteritis hemorrágica. La mayor cantidad de HCM al 5 día Pi con *E. tenella* sugiere que los heterófilos liberen sustancias quimiotácticas para la llegada de basófilos dos días después de los heterófilos. También se debe tomar en cuenta que los basófilos fagocitan bacterias⁸⁶, por lo que la mayor cantidad de BCM en aves inoculadas con *E. tenella* se pudiera deber a la necrosis de la mucosa cecal causada por la *E. tenella*. La necrosis crea una vía de entrada para bacterias cecales⁸¹ que los basófilos fagocitan. Esta observación concuerda con Tellez *et al.*⁸⁷, quienes encontraron disminución en la susceptibilidad a la infección por *S. enteritidis* en pollos ligeros inoculados con 10, 100 y 1000 ooquistes de *E. tenella*. Estas inoculaciones no produjeron lesiones macroscópicas en ciego. Los basófilos también pueden estar involucrados mediante la liberación de histamina, heparina, cininas y prostaglandinas⁸⁸ en el proceso hemorrágico producido por *E. tenella* entre los 5 y 7 días Pi y los BCM inician su aumento en el día 5, teniendo su mayor cantidad ($P < 0.05$) al día 7 Pi. Estas observaciones confirman lo descrito por Rose *et al.*⁷⁷, quienes encontraron disminución de basófilos en duodeno de pollos, entre los 4 y 11 días Pi de *Eimeria acervulina*. Por lo que, el aumento o la disminución de basófilos parece estar relacionado con el proceso necrótico y hemorrágico producido por la *E. tenella*, ya que la *E. acervulina* sólo produce hiperplasia del

epitelio intestinal e infiltración mononuclear con gran cantidad de linfocitos intraepiteliales intestinales (IEL)⁸⁹. Finkelman y Urban⁹⁰ informaron que la IL-3, IL-4 e IL-5 son quimiotácticas para los basófilos. Por lo que se pudiera considerar que en la migración de basófilos estén involucrados los IEL, ya que estos también liberan esas interleucinas⁹¹. Sin embargo, no se observan mayor cantidad de basófilos duodenales en pollos infectados con *E. acervulina*⁷⁷. Además, Rose *et al.*⁹², probaron que los basófilos no son necesarios para la migración linfocitaria en la infección en ratón con *E. vermiformis*.

Aunque, en la toma del día 5, los pollos inoculados con *S. enteritidis* y *E. tenella* presentaron escasos ECM y ECT. Estos granulocitos estuvieron en cantidad significativamente mayor que el resto de las tomas y tratamientos, con excepción de los ECT de la misma toma de los pollos inoculados con *E. tenella*. Este hallazgo se pudo deber a que los eosinófilos, salieron de los vasos sanguíneos por rexis, ya que únicamente se encontraron dos eosinófilos y estaban dentro de dos áreas de hemorragia cecal de los pollos inoculados con *S. enteritidis* y *E. tenella*. Sturkie y Griminger¹⁸, informaron que el promedio de eosinófilos con respecto al total de leucocitos circulantes es 2.7%. Por lo que no se puede considerar que los eosinófilos observados en los pollos inoculados con *S. enteritidis* y *E. tenella*, participen activamente en el proceso inflamatorio. Este hecho concuerda con Rose *et al.*⁴¹, quienes no encontraron eosinofilia en pollos Leghorn inoculados con *E. maxima*. Broaddus *et al.*⁹³, Ramirez *et al.*⁹⁴ y Upton *et al.*⁹⁵ tampoco encontraron aumento de eosinófilos en ratones y ratas infectadas con *Eimeria nieschulzi* y *Eimeria separata* respectivamente. Los hallazgos en este trabajo discrepan de los de Vervelde *et al.*⁹⁶, quienes encontraron en pollos Leghorn, gran cantidad de granulocitos peroxidasa positivos, probablemente eran eosinófilos. Pero, estos autores utilizaron 3-amino-9-carbazol, para marcar la peroxidasa y este cromógeno

produce reacción cruzada con los heterófilos³, por lo que no se puede asegurar que esas células sean eosinófilos.

Los pollos intoxicados con NaCl presentaron infiltrado mononuclear y no granulocítico en SNC lo que concuerda con Baze⁵¹, quien no observó infiltración granulocítica en pollos intoxicados con 1 y 1.5% de NaCl en agua de bebida. También Sinovek *et al.*⁹⁷ no encontraron eosinofilia en codornices intoxicadas con 0.6, 1.0, 2.0 y 3.0% de NaCl en el alimento. Sin embargo, los hallazgos de esta investigación, no concuerdan con Mohanty y West⁵⁰, Trainer y Karstad⁴⁹, y Wages *et al.*⁵², quienes observaron infiltrado granulocítico en SNC en pollos, palomas y pavos, respectivamente, intoxicados con NaCl. Las diferencias observadas se pudieran deber a enfermedades secundarias a la intoxicación por NaCl, como en el caso de esta investigación, donde se observó infiltrado encefálico de linfocitos T pleomórficos. Este infiltrado es característico de la enfermedad de Marek⁹⁸.

Aunque no se encontró diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de heterófilos cutáneos en los pollos tratados con AC. La menor cantidad de HPE, así como el mayor número de HPD y de HPT en los pollos tratados con AC, concuerda con Maxwell⁵⁵, quien observó menos heterófilos en la dermis superficial y mayor abundancia en la dermis profunda a los 30 min de la inoculación con AC. Huynh y Chubb⁵⁴, también observaron mayor cantidad de heterófilos dérmicos en la fase aguda de pollos tratados con DNCB, otro agente inductor de hipersensibilidad. Los heterófilos además han sido encontrados en su mayor cantidad, entre las 4 y 48 h de la inoculación en pollos con trementina, Con-A, endotoxina de *E. coli* (EnT), albúmina sérica bovina (BSA) y fitohemaglutinina (PHA)^{31,76,99,100}. Estos hallazgos sugieren que los heterófilos encontrados en los pollos tratados con sustancias causantes de hipersensibilidad, migran no sólo por la reacción inmune, sino también como una de las primeras células participantes en el proceso inflamatorio.

Chand *et al.*¹⁰¹ probaron que los basófilos aviares contienen histamina y SRS-A. Mientras que Chand y Deroth⁵⁸, así como Chand y Eyre¹⁰² demostraron que estos mediadores químicos son capaces de producir reacciones inmunológicas sistémicas en las aves. Por lo que la infiltración de basófilos, en los pollos tratados con AC, se puede atribuir a una reacción inmunológica. Esta infiltración no se ha informado en investigaciones realizadas en aves inoculadas con AC o DNCB. Sin embargo, Parish *et al.*¹⁰³ encontraron infiltrado de basófilos dérmicos en cobayos tratados con estos haptenos. En aves inoculadas con PHA se ha descrito hipersensibilidad basofílica cutánea (CHB)^{100,104}. Esta hipersensibilidad se caracteriza por el infiltrado de basófilos, heterófilos, macrófagos, linfocitos y ocasionalmente eosinófilos¹⁰⁰. El infiltrado observado en los pollos tratados con AC, tiene como componente importante a los eosinófilos, por lo que no se puede considerar como CHB. También se han encontrado cantidades significativas de basófilos dentro de las 4 h de tratamiento con EnT, trementina y BSA^{31,32,76,100}. Con base en lo anterior, se demuestra que los basófilos aviares tienen un papel importante tanto en reacciones inmunológicas como en las reacciones inflamatorias agudas.

La mayor cantidad de EPE observada en esta investigación es similar a la encontrada por Huynh y Chubb⁵⁴, Maxwell⁵⁵, así como por Singh y Mohanty⁶². Lo que demuestra que los eosinófilos están involucrados en el proceso de hipersensibilidad cutánea aviar. Latimer *et al.*⁷⁶ observaron en pollos tratados vía subcutánea con trementina que la cantidad de eosinófilos no variaba. Tomando en cuenta estos hallazgos, parece que los eosinófilos únicamente regulan a los basófilos en las reacciones de hipersensibilidad aviar. En mamíferos, los eosinófilos aparecen en las inflamaciones agudas y al final de las subagudas, además de procesos de hipersensibilidad⁹. Sin embargo, estos eosinófilos presentan PBE. Las funciones principales de esta proteína son lisar parásitos, producir liberación de

histamina y neutralizar la heparina de los basófilos². Los gránulos de estos leucocitos también contienen histaminasa, cininasas y peroxidasa entre otras enzimas. Además, exhiben receptores de membrana para IgG, IgE, IgM, IgA, IL-2, IL-5, la fracción C3b del complemento, leucotrieno B4, histamina y glucocorticoides⁸. En las aves los eosinófilos no contienen PBE, sin embargo, se han encontrado grandes niveles de histamina circulante en pollos que sufren un proceso anafiláctico^{58,102}. En las aves no existen la IgG y la IgE, pero tienen la IgY que interviene en procesos de hipersensibilidad⁵⁶. Por lo que es posible que los eosinófilos aviares tengan receptores para algún subtipo de IgY, pero carezcan de algunos de otros receptores y enzimas que intervengan en las reacciones inflamatorias.

Con base en los hallazgos de esta investigación, se concluye que las tinciones utilizadas diferenciaron correctamente a los granulocitos de pollos Leghorn de 4 semanas de edad, inoculados con *S. enteritidis* fagotipo 13, con *E. tenella* MOR80 y con *S. enteritidis* fagotipo 13 y *E. tenella* MOR80, así como, los granulocitos de los tratados con AC. También se encontró que la función de los heterófilos es principalmente en la fase aguda de la inflamación producida por *S. enteritidis* y por AC. Así como, en la fase de liberación de merozoítos de la infección por *E. tenella*. Sin embargo, los heterófilos no parecen tener papel importante en la reacción de hipersensibilidad cutánea producida por AC. Los basófilos parecen tener importancia tanto en procesos inflamatorios agudos como en reacciones de hipersensibilidad cutánea. Además, los basófilos pudieran estar regulados en los procesos inflamatorios por los heterófilos y en las reacciones de hipersensibilidad por los eosinófilos. Los eosinófilos solo juegan un papel importante en las reacciones de hipersensibilidad cutánea y no parece que intervengan en los procesos inflamatorios asociados a agentes infecciosos como *S. enteritidis* y *E. tenella*.

5.0 LITERATURA CITADA

1. Ryan GB, Majno G. Acute inflammation. *Am J Pathol* 1977; 86: 183-276.
2. Slauson DO, Cooper BJ. *Mechanisms of Diseases: A Textbook of Comparative General Pathology*. 2nd ed. Baltimore (USA): Williams and Wilkins, 1990.
3. Montali RJ. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (Reptiles, Birds and Mammals). *J Comp Pathol* 1988; 99: 1-26.
4. Mateos PA, Méndez MD. Proceso Inflamatorio. En: Trigo JT y Mateos, PA, editores. *Patología General Veterinaria*. 2ª ed. México (DF): Interamericana MacGraw-Hill, 1993: 83-121.
5. Thomson RG. *General Veterinary Pathology*. 2nd ed. Philadelphia (USA): WB Saunders Co, 1984.
6. Cormack DH. *Histología de Ham*. 9ª ed. México (DF): Harla, 1988.
7. Junqueira LC, Carneiro J. *Histología básica*. 3ª ed. Barcelona (España): Salvat Editores SA, 1987.
8. Jain NC. A brief review of the pathophysiology of eosinophils. *Compend Contin Edu. Pract Vet* 1994; 16: 1212-1218.
9. Capron M. Eosinophils and parasites. *Ann Parasitol Hum Comp* 1991; 66 (suppl 1): 41-45.
10. Jubb KVF, Huxtable CR. The nervous system. In: Jubb, KVF, Kennedy PC, Palmer, editors. *Pathology of domestic animals*. 4th ed. San Diego (Cal): USA, Academic Press Inc, 1993; I: 267-439.
11. Taylor DJ. *Pig diseases*. 6th ed. Cambridge (UK): Book Production Consultans PLC, 1995.
12. Moulton JE, Harvey JW. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: Moulton J.E, editor. *Tumors in domestic animals*. 3th California: University of California Press. 1990: 231-307.
13. Razin E, Pecht I, Rivera J. Signal transduction in the activation of mast cell and basophils. *Immunol Today* 1995; 16: 370-373.

14. Tizard I. *Inmunología Veterinaria*. 3ª ed. México (DF): Interamericana MacGraw-Hill, 1989.
15. Becker AB, Chung KF, McDonald DM, Lazarus SC, Frick OL, Gold WM. Mast cell heterogeneity in dog skin. *Anat Rec* 1985; 213: 477-480.
16. Klasing KC. Avian inflammatory response: mediation by macrophages. *Poultry Sci* 1991; 70:1176-1186.
17. Barnes HJ. Hemic sistem In: Riddell C, editor. *Avian histopathology*. 2nd ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, 1996: 1-16.
18. Sturkie PD, Griminger P. Body Fluid: Blood. In: Sturkie PD, editor. *Avian Physiology*. 4th ed. New York (USA): Springer-Verlag, 1986: 102-121.
19. Topp RC, Carlson HC. Studies on avian heterophils. III. Phagocytic properties. *Avian Dis* 1972; 16: 374-380.
20. Cohn ZA, Hirsche JG. The isolation and properties of the specific cytoplasmatic granules of the rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1960; 112: 983-1004.
21. Carlson HC, Allen JR. The acute inflammatory reaction in chicken skin: Blood cellular response. *Avian Dis* 1969; 13: 817-833.
22. Carlson HC. The acute inflammatory reaction in chicken breast muscle. *Avian Dis* 1972; 16: 553-558.
23. Maxwell MH, Trejo F. The ultrastructure of white blood cells and thrombocytes of the domestic fowl. *Br Vet J* 1970; 126: 583-592.
24. Topp RC, Carlson HC. Studies on avian heterophils. II. Histochemistry. *Avian Dis* 1972a; 16: 369-373.
25. Atwal OS, McFarland LZ. A morphologic and cytochemical study of erythrocytes and leukocytes of *Coturnix coturnix japonica*. *Am J Vet Res* 1966; 27: 1059-1065.
26. Brune K, Spitznagel JK. Peroxidaseless chicken leukocytes: Isolation and characterization of antibacterial granules. *J Infect Dis* 1973; 127: 84-94.
27. Brune K, Lefflell MS, Spitznagel JK. Microbicidal activity of peroxidaseless chicken heterophile leukocytes. *Infect Immun* 1972; 5: 283-287.

28. Andreasen CB, Latimer KS, Harmon BG, Glisson JR, Golden JM Brown, J. Heterophil function in healthy chickens and in chickens with experimentally induced Staphylococcal Tenosynovitis. *Vet Pathol* 1991; 28: 419-427.
29. Harmon BG, Glisson JR, Nunnally JC. Turkey macrophage and heterophil bactericidal activity against *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* 1992; 36: 986-991.
30. Stabler JG, McCormick TW, Powell KC, Kogut MH. Avian heterophils and monocytes: Phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*. *Vet. Microbiol* 1994; 38: 293-305.
31. Chansoriya M, Awadhiya RP, Vegad JL, Katiyar AK. Studies on the cellular response in avian inflammation using a simple subcutaneous pouch model. *Avian Pathol* 1993; 22: 591-603.
32. Katiyar AK, Vegad JL, Awadhiya RP. Pathology of inflammatory-reparative-response in punched wounds of the chicken skin. *Avian Pathol* 1992; 21: 471-480.
33. Opengart K, Eyre P, Domermuth CH. Increased number of duodenal mucosal mast cells in turkeys inoculated with hemorrhagic enteritis virus. *Am J Vet Res* 1992; 53: 814-819.
34. Maxwell MH, Burns RB. Blood eosinophilia in adult bantams naturally infected with *Trichostrongylus tenius*. *Res Vet Sci* 1985; 39: 122-123.
35. Ferris M, Bacha WJ. A new method for the identification and enumeration of chicken heterophils. *Avian Dis* 1984; 28: 179-182.
36. Maxwell MH. Attempted induction of an avian eosinophilia using various agents. *Res Vet Sci* 1980; 29: 293-297.
37. Nair MK. The early inflammatory reaction in the fowl. A light microscopical, ultrastructural and autoradiographic study. *Acta Vet Scand* 1973; 42 (Suppl):1-103.
38. Gray JS. Studies on host resistance to secondary infections of *Raillietina cesticillus* (Molin, 1858) in the fowl. *Parasitology* 1973; 67: 375-382.

39. Nair KV, Nadakal AM. Haematological changes in domestic fowl experimentally infected with the Cestode *Raillietina tetragona* (Molin, 1858). *Vet Parasitol* 1981; 8: 49-58.
40. Gray JS. The cellular response of the fowl small intestine to primary and secondary infections of the Cestode *Raillietina cesticillus* (Molin). *Parasitology* 1976; 73: 189-204.
41. Rose ME, Hesketh P, Ogilvie BM. Peripheral blood leukocyte response to coccidial infection: A comparison of the response in rats and chickens and its correlation with resistance to Re-Infection. *Immunology* 1979; 36: 71-79.
42. Porter RE, Holt PS. Effect of induced molting on the severity of intestinal lesions caused by *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Avian Dis* 1993; 37: 1009-1016.
43. Glick B, Rose C. Cellular composition of the bone marrow in the chicken and Identification of the Cells. *Anat Rec* 1976; 185: 235-245.
44. Rose ME, Hesketh P. Fowl peritoneal exudate cells: Collection and use for the macrophage migration test. *Avian Pathol* 1974; 3: 297-304.
45. Toth TE, Siegel PB. Cellular defenses of the avian respiratory tract: Paucity of freeresiding macrophages in the normal chicken. *Avian Dis* 1986; 30: 67-75.
46. Kogut MH, Téllez GI, Hargis BM, Corrier DE, DeLoach JR. The Effect of 5-Fluorouracil treatment of chicks: A cell depletion model for the study of avian polymorphonuclear leukocytes and natural host defenses. *Poultry Sci* 1993; 72: 1873-1880.
47. Kogut MH, Téllez GI, McGruder ED, Hargis BM, Williams JD, Corrier DE, DeLoach, JR. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. *Microbial Pathogenesis* 1994; 16: 141-151.
48. McDougald LR, Reid WM. Coccidiosis. In: Calnek, B.W., Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW, editors. *Diseases of the Poultry*. 9th ed. Iowa (USA): Iowa State University Press, 1991: 780-797.

49. Trainer DO, Karstad L. Salt poisoning in Wisconsin wildlife. J Am Vet Med Assoc 1960;136: 14-17.
50. Mohanty GC, West JL. Pathologic features of experimental sodium chloride poisoning in chicks. Avian Dis 1969; 13: 762-773.
51. Baze WB. The pathogenesis of sodium chloride toxicity in the young chickens. Diss Abs Int B 1986: 47- 97.
52. Wages DP, Ficker MD, Cook ME, Mitchell J. Salt toxicosis in commercial turkeys. Avian Dis 1995; 39: 158-161.
53. Awadhiya RP, Vegad JL, Kolte GN. Eosinophil leukocytic response in Dinitrochlorobenzene skin hypersensitivity reaction in the chicken. Avian Pathol 1982; 11: 187-194.
54. Huynh V, Chubb RC. The induction of delayed type hypersensitivity to dinitrochlorobenzene in the chicken. Avian Pathol 1987; 16: 383-393.
55. Maxwell MH. Histochemical identification of tissue in the inflammation response of the fowl (*Gallus domesticus*). Res Vet Sci 1984; 37: 7-11.
56. Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: Clues to the origins of modern antibodies. Immunol Today 1995; 16: 392-398.
57. Rose ME, Bradley JWA. Delayed hypersensitivity in the fowl, turkey and quail. Avian Pathol 1977; 6: 313-326.
58. Chand N, DeRoth L. Acute systemic anaphylaxis in adult domestic fowl: Evidence for the protective role of H₂-Histaminergic and β₂-Adrenergic receptors. Am J Vet Res 1980; 41: 101-105.
59. Maxwell MH, Burns RB. Experimental eosinophilia in domestic fowl and ducks following horse serum stimulation. Vet Res Comm 1981/1982; 5: 369-376.
60. Maxwell MH. The avian Eosinophil-A review. World's Poultry Sci J 1987; 43: 190-207.
61. Mateo MR, Roberts ED, Enright FM. Morphologic, cytochemical, and functional studies of peripheral blood cells of young healthy american alligator (*Alligator mississippiensis*). Am J Vet Res 1984; 45: 1046-1053.

62. Singh, SD, Mohanty GC. Histochemical method for identification of tissue eosinophils in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). Indian J Ani Sci 1992; 62: 424-426.
63. Hanker JS, Yates PJ, Metz CB, Rustioni A. A new specific, sensitive and Non-Carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. Histochemical J 1977; 9: 789-792.
64. Adamu D. Przydatnosc metod barwienia komorek tucznych w diagnostyce roznicowej zlosliwych nowotworow skory u psa. Medycyna Weterynaryjna 1991; 47:181.
65. Bancroft JD, Stevens A. Cytoplasmatic Granules, Organelles and Special Tissues. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. Theory and practice of histological techniques. 2nd ed. Edinburgh (Scotland): Churchill Livingstone, 1982: 364-378.
66. Tellez GI, Dean CE, Corrier DE, DeLoach JR, Jeager L, Hargis BM. Effect of dietary lactose on cecal morfology, pH, organic acids, and *Salmonella enteritidis* organ invasion in Leghorn chicks. Poultry Sci 1993; 72:636-642.
67. Hopwood D. Fixation and Fixatives. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. Theory and practice of histological techniques. 2nd ed. Edinburgh (Scotland): Churchill Livingstone, 1982: 20-40.
68. Mallinson ET, Snoeyenbos GH. Salmonellosis. In: Purchase HG, Arp LH, Domermuth CH, Pearson JE, editors. Isolation and identification of avian pathogens. 3th ed. Pennsylvania: The American Association of Avian Pathologists, 1989:3-11.
69. Long PL, Joyner PJ, Millard BJ, Norton CC. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. Folia Vet Latina 1976; 6: 201-217.
70. Hall J. Inclusión de tejidos. En: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editores. Métodos histotecnológicos. Washigton (DC): Instituto de Patologia de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995: 41-46.

71. Allen TC. Hematoxilina y eosina. En: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editores. Métodos histotecnológicos. Washigton (DC): Instituto de Patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995: 55-60.
72. Arrington JB. Bacterias, hongos y otros microorganismos. En: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editores. Métodos histotecnológicos. Washigton (DC): Instituto de Patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995; 209-240.
73. McElroy DA. Tejido conectivo. En: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editores. Métodos histotecnológicos. Washigton (DC): Instituto de Patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995: 129-150.
74. Marriott FHC. The Interpretation of Multiple Observations. Londres (UK): Academic Press, 1974.
75. Méndez RI. Modelos Estadísticos Lineales. 2a. ed. México (DF): CONACYT, 1981.
76. Latimer KS, Tang KN, Goodwin MA, Steffens WL, Brown J. Leucocyte changes associated with acute inflammation in chickens. Avian Dis 1988; 32:760-772.
77. Rose ME, Ogilvie BM, Bradley WA. Intestinal mast cells in rats and chickens to coccidiosis, with some properties of chickens mast cells. Int Archs Allergy Appl Immunol 1980; 63: 21-29.
78. Rose ME, Hesketh P, Rennie M. Coccidiosis: rapid depletion of circulating lymphocytes after of immune chickens with parasite antigens. Infect Immunol 1984; 45:166-171.
79. Huff D, Clark DT. Cellular aspects of the resistance of chickens to *Eimeria tenella* infections. J Protozool 1970; 17:35-39.
80. Tellez GI, Kogut MH, Hargis BM. *Eimeria tenella* or *Eimeria adenoeides*: induction of morphological changes and increased resistance to *Salmonella enteritidis* infection in Leghorn chicks. Poultry Sci 1994; 73:396-401.

81. Baba E, Wakeshima H, Fukui K, Fukata T, Arakawa A. Adhesion of bacteria to the cecal mucosal surface of conventional and germ-free chickens infected with *Eimeria tenella*. Am J Vet Res 1992; 53:194-197.
82. Byrnes S, Eaton R, Kogut M. *In vitro* interleukyn-1 and tumor necrosis factor-alpha production by macrophages from chickens infected with either *Eimeria maxima* or *Eimeria tenella*. Int J Parasitol 1993; 23:639-645.
83. Barcinski MA, Costa-Moreira ME. Cellular response of protozoan parasites to host-derived cytokines. Parasitol Today 1994; 10:352-355.
84. Hernández VX, García EG, Tellez IG, Navarro JA, Quintana JA, Kogut MH. Comportamiento de los leucocitos polimorfonucleares en la infección por *E. tenella* en un modelo *in vivo* en pollo de engorda (tesis de maestría) México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1997.
85. Natt MP. The effect of cecal coccidiosis on the blood cells of the domestic fowl 3. The changes in the leukocyte picture during the course of the infection. Experimental Parasitol 1959; 8: 182-187.
86. Malaviya R, Twesten JN, Ross AE, Abraham NS, Pfeifer DJ. Mast cell process bacterial ags trough a phagocytic route for class I MHC presentation to T Cells. J Immunology 1996; 156: 1490-1496.
87. Tellez GI, Hargis BM, Lindsey DG, Hinton A, Powell K, Kogut MH. Subclinical coccidiosis does not increase susceptibility of layer chicks to *Salmonella enteritidis* colonization. Abstracts of 80th Annual Meeting of the Poultry Science Associaton, Inc; 1991 August 12-14; USA. Poultry Sci 1991; 70:120.
88. Maxwell HM, Robertson WG. The avian basophilic leukocyte: a review. Worlds Poultry Sci J 1995; 51: 307-325.
89. Goodwin MA. Alimentary system. In: Riddell C, editor. Avian histopathology. 2nd ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, 1996:111-141.
90. Finkelman FD, Urban FJ. Cytokines: Making the right choice. Parasitol Today 1992; 8: 311-314.

91. Barrett TA, Gajewski TF, Danielpour D, Chang EB, Beagley KW, Bluestone JA. Differential function of intestinal intraepithelial lymphocyte subsets. *J Immunol* 1992; 149: 1124-1130.
92. Rose ME, Wakelin, Joysey SH, Heskett P. Immunity to coccidiosis: T-cell control of infection with *Eimeria vermiformis* in mice does not require co-operation with inflammatory cells. *Parasitol Immunol* 1989; 11: 231-239.
93. Broadbudd RR, Mayberry LF, Bristol JR, Upton SJ. Suppression of *Nippostrongylus brasiliensis* (nematoda)-induced lysophospholipase activity and peripheral eosinophilia by *Eimeria nieschulzi* (apicomplexa). *J Parasitol* 1987; 73:739-742.
94. Ramirez MT, Mayberry LF, Bristol JR. Effects of *Eimeria separata* on eosinophilia induced by *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitol Res* 1991; 77:367-368.
95. Upton SJ, Mayberry LF, Bristol JR, Favela SH, Sambrano GR. Suppression of peripheral eosinophilia by the coccidian *Eimeria nieschulzi* (apicomplexa: eimeriidae) in experimentally infected mice. *J Parasitol* 1987; 73:300-308.
96. Vervelde L, Vermeulen AN, Jeurissen SHM: *In situ* characterization of leucocyte subpopulations after infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasite Immunol* 1996; 18:247-256.
97. Sinovek Z, Petrovic R, Javanovic N. Kryna slika japanskih prepelica hranjenih smesama sa povecanim sadrzajem soli. *Peradarstvo* 1992; 27:37-41 (Abst).
98. Swayne DE. Nervous system. In: Riddell C, editor. *Avian histopathology*. 2nd ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, 1996: 183-201.
99. Katiyar AK, Vegad JL, Awadhiya RP. Increased vascular permeability and leucocyte emigration in *Escherichia coli* endotoxin injury in the chicken skin. *Res Vet Sci* 1992; 52: 154-161.
100. McCorkle F, Olah I, Glick B. The morphology of the phytohemagglutinin-induced cell response in the chicken's wattle. *Poultry Sci* 1980; 59:616-623.

101. Chand N, Carlson HC, Eyre P. Passive cutaneous anaphylaxis in the domestic fowl. *Internal Arch Allergy and Appl Immunol* 1976; 51:508-517.
102. Chand N, Eyre P. Immunological release of histamine and slow-reacting substance in domestic fowl. *Can J Comp Med* 1978; 42:519-524.
103. Parish WE, Luckhurst E, Cowan SI. V. Delayed hypersensitivity, blood and bone marrow eosinophilia, induced in normal Guinea-pig by adoptive transfer of lymphocytes from syngeneic donors. *Clin Exp Immunol* 1977; 29:75-83.
104. Corrier DE, DeLoach JR. Evaluation of cell-mediated. Cutaneous basophil hypersensitivity in young chicken by an interdigital skin test. *Poultry Sci* 1990; 69:403-408.