

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION DE GRANULOCITOS CUTANEOS EN LA  
HIPERSENSIBILIDAD CUTANEA PRODUCIDA POR EL  
TRATAMIENTO DE ANHIDRIDO CITRACONICO E HISTAMINA  
EN AVES LEGHORN.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

**FRANCISCO ARTURO ORTIZ MEJIA**

ASESORES: MVZ., M.C. VICTOR MANUEL PETRONE GARCIA  
MVZ., M.C. MAGDALENA ESCORCIA MARTINEZ  
MVZ., Ph.D. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS



MEXICO, D. F.

AGOSTO, 1999.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

277419



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

*A Dios, a mis padres y a mis hermanos que me han acompañado toda la vida, que me han ayudado y apoyado para lograr una meta más en la vida.*

*A mamá Pavis, papá Tino, abuelito Goyo, Chucho y Rubén, que aunque ya no están conmigo, nunca los he olvidado.*

*A Carmen, una auténtica amiga que jamás olvidaré.*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios, por darme la vida y permitirme desarrollarme como persona.*

*A mis padres Juan y Tere, por guiarme en la vida, brindarme su apoyo incondicional, consejos y sobre todo por su amor y cariño.*

*A mis hermanos Juan, Raymundo, Yuriria y Nayeli, por su compañía en todo momento, ayuda, consejos y amistad*

*A Mireya por su compañía, apoyo y enseñanzas.*

*A Fabricio, por su alegría y cariño.*

*A mis amigos de toda la carrera y para toda la vida Beatriz, Sinhué y Javier.*

*A mis asesores:*

*Víctor Petrone, por su paciencia, ayuda y amistad.*

*Magdalena Escorcía, por su amistad y apoyo.*

*Guillermo Jellez, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.*

*A todo el departamento de aves, por contribuir en mi formación como universitario*

*A mi queridísima Facultad, por todo lo que me ha dado.*

*A mi igualmente querida Universidad Nacional Autónoma de México, a quien representaré con orgullo y honestidad.*

## **CONTENIDO**

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>2</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>13</b>
<b>Objetivo</b>	<b>13</b>
<b>Material y Métodos</b>	<b>14</b>
<b>Resultados</b>	<b>18</b>
<b>Discusión</b>	<b>20</b>
<b>Referencias</b>	<b>25</b>
<b>Figuras</b>	<b>29</b>

## RESUMEN

**ORTIZ MEJÍA FRANCISCO ARTURO.** Evaluación de granulocitos cutáneos en la hipersensibilidad cutánea producida por el tratamiento de Anhídrido Citracónico e histamina en aves Leghorn. (bajo la dirección de MVZ, MC Víctor Petrone ; MVZ, MC Magdalena Escorcía y MVZ, PhD Guillermo Téllez ).

En las aves, a comparación de los mamíferos el papel de la histamina en la inflamación e hipersensibilidad I no está comprendido totalmente, faltando definir el papel de la histamina sobre los granulocitos cutáneos. El Anhídrido Citracónico (AC) es un alérgeno que sensibiliza a las aves. Se emplearon 20 aves Leghorn distribuidas en 4 grupos, el A se inoculó con AC, al B con histamina, al C con AC+histamina y al D con Sulfóxido de Dimetilo (DOMOSO). Se tomó como día uno del experimento al día 28 de edad de las aves, aplicando el primer tratamiento en la piel del lado izquierdo del tórax, siete días después se aplicó un segundo tratamiento, pasados 30 min. se sacrificaron las aves, se tomó una muestra de la piel tratada (1cm<sup>2</sup>), se procesaron por el método de inclusión en parafina, se tiñeron con Ziehl Neelsen (ZN), hematoxilina y eosina (HE) y p-fenilenediamina dihidroclorido + pirocatecol (PPD+PC) para la identificación de basófilos, heterófilos y eosinófilos respectivamente. Las muestras se observaron al microscopio, a los valores totales de cada granulocito se aplicó un análisis de varianza, a las medias un análisis de Tukey, fijando la significancia estadística con  $P < 0.05$ . Observamos mayor cantidad de basófilos en dermis superficial (DS) y dermis profunda (DP) del grupo A, en comparación con la cantidad encontrada en las aves de los grupos B, C y D. La cantidad de heterófilos en DS es similar en todos los grupos; a nivel de DP hay menor diferencia ( $P > 0.05$ ) entre los grupos A y B, pero sí de estos dos con C y D. Los eosinófilos en DS presentan menor diferencia ( $P > 0.05$ ) entre los grupos A y B, pero sí de estos dos con C y D; en DP observamos menor diferencia ( $P > 0.05$ ) entre el grupo A con el C pero sí con los grupos B y D. En este trabajo se observó que los heterófilos participan en procesos inflamatorios como el presentado en todos los grupos de aves, los basófilos participan en procesos inmunológicos e inflamatorios, y los eosinófilos actúan regulando a los basófilos en el proceso de hipersensibilidad tipo I aviario como en el grupo de aves tratadas con AC. La histamina exógena no desempeña un papel fundamental en el proceso de hipersensibilidad en las aves como se puede ver en el grupo de aves tratadas con AC+histamina, lo que sugiere la importancia de otros factores como los leucotrienos, el mecanismo de retroalimentación negativa para el control de los procesos de hipersensibilidad e inflamación.

## INTRODUCCIÓN.

El organismo de los animales vertebrados superiores presenta dos mecanismos de defensa: los mecanismos inespecíficos o de resistencia y los específicos o inmunitarios.

Los mecanismos inespecíficos son de tres tipos

- a) Físicos como la piel, conjuntiva y mucosas.
- b) Bioquímicos incluye el complemento, el interferón y enzimas como la lisozima.
- c) Celulares como la fagocitosis.

Mientras que los específicos pueden ser :

- a) Inmunidad humoral, que se caracteriza por la producción de inmunoglobulinas (Igs) o también llamadas anticuerpos (Acs).
- b) Inmunidad celular, dada principalmente por los linfocitos.

Los Acs son proteínas que se combinan de manera específica con el antígeno (Ag). Este último es una sustancia capaz de inducir una respuesta inmunitaria en la hipersensibilidad tipo I por la sensibilización alérgica de anticuerpos IgE. Los Acs son moléculas que presentan afinidad bioquímica para unirse de manera específica con el antígeno y también desencadenan una amplia variedad de eventos como la fijación del complemento y la liberación de histamina por las células cebadas (1).

Cada anticuerpo contiene al menos una unidad básica llamada monómero que comprende cuatro cadenas polipeptídicas, de las cuales dos tienen un peso molecular alto y se llaman cadenas pesadas (H) y las otras dos por tener un peso molecular bajo se denominan cadenas ligeras (L). Cada cadena contiene una porción amino terminal llamada región variable (V) y otra carboxilo terminal denominada constante (C). La región dominio es globular y está plegada por puentes disulfuro, el número de dominios en la cadena H depende del tipo de anticuerpo y se denominan  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  y  $C_{H4}$ , mientras que los dominios de la cadena L se denominan  $V_L$  y  $C_L$ . Casi todas las IgG, IgM, IgD e IgE presentan una región

denominada "región de la bisagra" que se encuentra en la cadena H en la región C, entre los dominios  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ . Cuando un anticuerpo es expuesto a la acción de la enzima papaína, la región de la bisagra se rompe y se producen dos fragmentos Fab que son los captadores del antígeno y un fragmento Fc. Los anticuerpos poseen puentes disulfuro que son esenciales para darles la estructura tridimensional. La cadena J es una cadena polipeptídica que normalmente se encuentra en anticuerpos poliméricos secretados en mucosas como la IgA que es un dímero y en ocasiones un trímero y la IgM que es un pentámero (1,2).

Los Acs de los mamíferos son: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

A la IgG se le denomina Ac circulante, debido a que se encuentra en mayor concentración en la sangre, del 70-75 % de los Acs sanguíneos. Generalmente se le encuentra en forma de monómero, su bajo peso molecular le permite salir con facilidad de los vasos sanguíneos, esta inmunoglobulina opsoniza, aglutina y precipita a los Ag, además puede activar el complemento y participa en las reacciones de hipersensibilidad tipo II y tipo III (2, 3, 4).

La IgM representa aproximadamente el 10 % de los de Acs en sangre, su gran tamaño no le permite salir del torrente sanguíneo por lo que también es denominado como Ac circulante. Este Ac se presenta en forma de pentámero con una cadena J. Es el anticuerpo más eficiente para activar al complemento, también opsoniza bacterias y participa en las reacciones de hipersensibilidad tipo II y tipo III (3, 4).

La IgA se encuentra básicamente en forma de dímero, aunque puede presentarse como trímero o polímero, representa del 15-20 % de los Acs en sangre. Este anticuerpo es el que se encuentra en mayor cantidad del total de Acs, aunque no siempre, además es el Ac de mayor importancia en las secreciones de vías respiratorias, digestivas, urogenitales, glándula mamaria y ojos. Este Ac activa el complemento por la vía alterna, pero no por la vía clásica, tampoco opsoniza pero sí puede aglutinar Ag y neutralizar virus, evitando su adherencia a superficies corporales (1, 3).

La IgD se encuentra en el suero, constituye el 1 % de los Acs en sangre, se presenta en



forma de monómero y se localiza sobre la superficie de linfocitos B, se sugiere que participa en la diferenciación de estas células y como receptor de antígenos (5).

La IgE se encuentra en bajas concentraciones en el suero, participa en reacciones de hipersensibilidad de tipo I, alergias y anafilaxia, ya que su región FC le permite unirse a las células cebadas y a los basófilos para mediar la liberación de agentes vasoactivos (3, 5).

## HIPERSENSIBILIDAD

La hipersensibilidad tipo I depende del tipo y la cantidad del antígeno y de factores genéticos del individuo (atopia). Este tipo de hipersensibilidad se puede presentar de dos maneras: la local y la sistémica, también llamada anafilaxia (2, 3, 5).

La hipersensibilidad es una respuesta inflamatoria inmunológicamente dirigida contra un antígeno, esta respuesta es una serie de reacciones que producen daño al individuo. La hipersensibilidad tipo I es descrita como un factor importante en enfermedades severas y de gran importancia económica, por ejemplo la enfermedad del edema del cerdo (6), la neumonía atípica bovina y el enfisema pulmonar equino (7); en las aves se ha informado que está íntimamente relacionada con enfermedades como son edema pulmonar, ataques cardiacos y muerte súbita en aves clínicamente sanas, también llamado "síndrome de muerte aguda". El pollo es susceptible a la anafilaxia, y se sensibiliza fácilmente por proteínas extrañas (8).

La hipersensibilidad tipo I es una reacción inflamatoria aguda, ya que presenta un inicio abrupto, generalmente en minutos a pocas horas y progresa hacia la muerte o recuperación en pocos días. Esta respuesta está asociada a la producción de anticuerpos de clase IgE que actúan contra un alérgeno. Estas Igs IgE se adhieren a receptores específicos en células como los basófilos y mastocitos (3).

Cuando se adhiere la IgE específica para un Ag a la membrana celular de los basófilos o células cebadas, se dice que las células se encuentran sensibilizadas y podrán liberar sus mediadores químicos al entrar de nuevo en contacto con el Ag. La respuesta de las células

cebadas es muy rápida, tarda solo unos segundos a partir de que los antígenos se unen a los anticuerpos de la membrana celular. La sensibilización de las células cebadas se da porque estas poseen receptores específicos para la porción Fc de la IgE, por medio de esta porción Fc el Ac se une a la célula cebada. Cuando los antígenos se unen a la IgE de la célula, se libera  $Ca^{++}$ , que influye sobre la estabilidad de los gránulos de las células cebadas, dando inicio a la degranulación, es decir, se produce una migración de los gránulos de histamina y heparina hacia la superficie celular, se fusionan a la membrana celular y salen de la célula liberando su contenido en los tejidos adyacentes, produciendo un efecto vasoactivo. Además la unión Ag-IgE provoca la síntesis y liberación de otras sustancias vasoactivas como las cininas, factor de agregación plaquetaria (FAP) y factores del complemento C3a y C5a y de esta manera se origina el proceso inflamatorio en la hipersensibilidad tipo I (3, 4).

Después de la agresión por un alérgeno se produce constricción transitoria en las arteriolas locales, esto es seguido por vasodilatación de los capilares adyacentes, lo que provoca aumento en el flujo sanguíneo de la zona durante varias horas, produciendo también aumento en la permeabilidad vascular y exudación de plasma rico en proteínas hacia el interior de los tejidos, dando origen a edema y tumefacción local. Horas después los leucocitos se adhieren al endotelio vascular, en un proceso llamado marginación. Los principales mediadores químicos que intervienen en el proceso inflamatorio son: leucotrienos  $LTB_4$ ,  $LTC_4$ ,  $LTD_4$  y  $LTE_4$ , histamina, serotonina, cininas, prostaglandinas, factor de activación plaquetaria, interleucina 1 y fracciones del complemento C3a y C5a. Los leucotrienos forman la antes llamada Sustancia de Reacción Lenta de Anafilaxia (SRS-A), que es un derivado del ácido araquidónico el cual se hace disponible por la activación del complemento o por estimulación antigénica, siendo más potentes que la histamina; la serotonina es un derivado del triptófano, que se encuentra en células cebadas, en plaquetas y en células argentófilas del intestino, produce aumento en la permeabilidad y vasoconstricción que desencadena aumento en la presión arterial; las cininas son péptidos básicos que se producen en el plasma y el suero, aumentan la permeabilidad vascular, producen disminución en la presión arterial y contraen al músculo liso; las prostaglandinas son lípidos derivados del ácido araquidónico y están ampliamente distribuidas en los tejidos, tienen acción

potencializadora de procesos alérgicos e inflamatorios, hay cuatro grupos, el PGE, PGF, los tromboexanos (TxA<sub>2</sub>) y las prostacilinas (PGI<sub>2</sub>). La PGF<sub>2</sub>α y el TxA<sub>2</sub> contraen el músculo liso y provocan vasoconstricción; la PGE<sub>1</sub>, la PGE<sub>2</sub> y la prostacilina relajan al músculo liso y producen vasodilatación, PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>1</sub> y PGF<sub>2</sub>α inhiben la agregación plaquetaria, en tanto que PGE<sub>2</sub> y TxA<sub>2</sub> la estimulan, otra forma de contribuir en la patogenia de reacciones inmunitarias es la producción de dolor; el FAP es un lípido de bajo peso molecular, produce agregación y liberación plaquetaria, además actúa como quimiotáctico de eosinófilos, aumenta la permeabilidad vascular y contrae al músculo liso; las fracciones del complemento C3a y C5a producen degranulación de mastocitos, quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos, contraen al músculo liso y aumentan la permeabilidad capilar; los leucotrienos son producto de la lipooxigenación del ácido araquidónico, son poderosos inductores de la contracción del músculo liso, producen constricción bronquial y secreción de moco de las vías respiratorias y la formación de máculas y pápulas en la piel, los leucotrienos son más poderosos en reacciones molares que la histamina, por lo que tienen un papel importante en el desarrollo de trastornos alérgicos (1, 9,10).

La gravedad de la presentación de los signos está relacionado con la liberación de sustancias vasoactivas por parte de los basófilos, esto está relacionado con el número y ubicación de las células, así como también la cantidad y vía de administración del antígeno. Cuando el antígeno se administra con rapidez y por vía intravenosa se produce una degranulación generalizada de los basófilos. Si los agentes vasoactivos se liberan con mayor velocidad a la capacidad del organismo para responder a los rápidos cambios que se producen en su sistema vascular, el animal sufrirá un choque de anafilaxia y puede morir (2, 3).

La hipersensibilidad tipo II es también llamada citotóxica o citolítica, el anticuerpo reacciona contra el Ag que se encuentra ligado a una membrana celular, o con algún componente antigénico de la misma, es decir, el anticuerpo se une tanto a un Ag propio como a un Ag presente en la célula, dando lugar a la fagocitosis de la célula que contiene al Ag por las células asesinas (NK) o por una lisis celular mediada por el complemento (1, 3, 11). Los neutrófilos, macrófagos y algunos linfocitos tienen receptores para las porciones FC de los

Acs, estas células pueden destruir a las células blanco cubiertas por complejos Ag-Ac por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Las células destruidas pueden iniciar una reacción inflamatoria aguda debido a la liberación de productos de la degranulación. Un ejemplo de este tipo de hipersensibilidad son los rechazos a los de trasplantes (1, 3, 11).

La hipersensibilidad tipo III es una reacción que se produce localmente. Aparece cuando el complejo Ag-Ac se forma en gran cantidad o estos complejos no son eliminados correctamente por el sistema fagocítico mononuclear creando depósitos de complejos inmunes en los órganos afectados. La reacción da inicio cuando el Ag y el Ac coinciden en los espacios tisulares formando microprecipitados hasta producir un proceso inflamatorio grave y consecuentemente lesiones celulares. El complejo inmune puede activar el sistema del complemento atrayendo neutrófilos por la producción de C5a, los neutrófilos tratarán de fagocitar a los complejos inmunes liberando enzimas proteolíticas como la colagenasa y la plasmina produciendo destrucción celular (3, 10, 11).

La hipersensibilidad tipo IV, es una respuesta mediada por linfocitos sensibilizados, produciendo una reacción inflamatoria local que tarda 24 horas o más para expresarse. Los Ag más comunes en este tipo de hipersensibilidad son microorganismos intracelulares como virus, bacterias, hongos y protozoarios que al entrar en contacto con los linfocitos propician la liberación de linfocinas induciendo el acúmulo de mononucleares desencadenando un proceso inflamatorio subagudo (10, 11).

La hipersensibilidad basofílica cutánea es una reacción inmune que tarda de 24-48 horas para alcanzar su máxima expresión, y se caracteriza por un infiltrado de basófilos en la piel. (2)

Los granulocitos en los mamíferos son los basófilos o células cebadas, los eosinófilos y los neutrófilos (2, 5).

Los basófilos se encuentran en baja cantidad en el tejido conectivo y en la sangre circulante; presentan núcleo lobulado y el citoplasma contiene gránulos basófilos y

metacromáticos, los cuales igual que en los mastocitos contienen heparina e histamina; los basófilos del tejido conectivo se originan en médula ósea y en hígado fetal (2), e intervienen en las reacciones de hipersensibilidad moderadas por IgE liberando estos mediadores. Las células cebadas en los mamíferos contienen en sus gránulos histamina y serotonina que actúan como mediadores en el proceso inflamatorio; también presentan proteasas neutras como la tripsina y quimiotripsina, que pueden causar lisis en células vecinas y activar así los componentes C3a y C5a del complemento que actúan como anafilatoxinas y agentes vasoactivos; estas células también generan leucotrienos, prostaglandinas y cininasas (3, 12).

El neutrófilo se forma en la médula ósea. El neutrófilo maduro presenta un núcleo multilobulado, la cromatina se encuentra cerca de la membrana nuclear y presenta numerosos gránulos citoplasmáticos que son lisosomas y que contienen enzimas hidrolíticas, oxidativas y proteolíticas, además de sustancias bactericidas como la lisozima y la fagocitina. La vida media de los neutrófilos en la sangre es aproximadamente de 6 horas por lo que se están reemplazando continuamente, ante una lesión, los neutrófilos abandonan el torrente sanguíneo en grandes cantidades llegando a la zona afectada formando un exudado purulento. La función principal de los neutrófilos es la fagocitosis, principalmente de bacterias (3).

Los eosinófilos son producidos en la médula ósea. Tienen un papel importante en reacciones alérgicas, en la invasión por helmintos y artrópodos. En la mayoría de las especies los eosinófilos presentan un núcleo levemente lobulado; en el hombre, perro y caballo el núcleo tiene forma de dos gotas unidas por una hebra, en la rata tiene forma anular; los gránulos citoplasmáticos son eosinofílicos o acidifílicos e inusualmente grandes en el caballo, en forma de bastón en el gato, ovoides en el ovino, bovino, porcino y redondos en el perro. Los eosinófilos tienen altas concentraciones de peroxidasa e histaminasa, además de la proteína básica principal que se encuentra en los gránulos y que al unirse el eosinófilo al helminto se liberan estas enzimas y lesionan la membrana del parásito. La función del eosinófilo es fagocitar células muertas, bacterias y parásitos, además de secretar sustancias antagonistas de la histamina y serotonina regulando el proceso inflamatorio (1, 2, 4).

## INMUNOGLOBULINAS Y GRANULOCITOS EN AVES.

Las aves solo presentan tres tipos de anticuerpos IgM, IgA e IgY (13), careciendo de IgE e IgG. La IgY es fenotípicamente parecida a la IgE, pero tiene funciones de IgE e IgG; ya que participa en reacciones de hipersensibilidad tipo I, opsonización y neutralización del Ag. La inmunoglobulina sérica predominante en los pollos es la IgY. Este nombre de IgY fue propuesto en 1969 por Leslie y Clem, para diferenciarla de otros anticuerpos, sobre todo de la IgG de los mamíferos ya que las cadenas pesadas (H) de la IgY son más largas y antigénicamente distintas a la de la IgG (14). En la tabla uno se exponen las características fisicoquímicas de la IgE e IgG humanas y la IgY aviar (15).

**Tabla 1. Características fisicoquímicas de la IgE e IgG humanas y la IgY aviar (15).**

INMUNOGLOBULINA Ig	DOMINIOS CADENA H	REGIÓN BISAGRA	PESO MOLECULAR (KDa)
IgE	5	no	190
IgG	4	si	150
IgY	4	no	180

Los macrófagos forman parte del sistema regulador de las células del sistema inmune por medio de las citocinas como las interleucinas. Al comenzar el proceso inflamatorio las adrenales liberan corticosteroides por acción de la IL-1 y la ACTH, producida por la estimulación de los leucocitos, la corticosterona es componente importante de un mecanismo de retroalimentación negativa, modula al sistema inmune y a la respuesta inflamatoria (16, 17).

En las aves una reacción de anafilaxia sistémica se caracteriza por hipotensión arterial, hipertensión venosa central, bradicardia, broncoespasmo, sofocación, convulsiones y muerte repentina.(8)

La hipersensibilidad basofílica cutánea (HBC) originalmente se describió en el cobayo por Richerson (18), posteriormente en la gallina doméstica por Stadaker (19) y Kean (20),

quienes describen una hipersensibilidad caracterizada por la infiltración de basófilos al registrar una respuesta inflamatoria por la aplicación tópica de fitohemoaglutinina en barbillas y piel interdígital 24 horas postinoculación. En esta reacción de hipersensibilidad se ha visto que más del 50% de las células son basófilos. La reacción inflamatoria se caracteriza por una acumulación perivascular de heterófilos, linfocitos y basófilos, en la que se sugiere que los linfocitos sensibilizados posiblemente sean los responsables de la liberación de linfocinas quimiotácticas de basófilos<sup>1,2</sup>. Una hora postinoculación se observan numerosos heterófilos, en menor cantidad basófilos y ocasionalmente eosinófilos. Pero es hasta las 24 horas cuando se incrementa la infiltración de basófilos y eosinófilos, es decir la respuesta basofílica es lenta (19, 20, 21, 22).

En las aves los granulocitos participantes en el proceso inflamatorio son los leucocitos polimorfonucleares que circulan en la sangre, se originan en la médula ósea, e incluyen a los basófilos, heterófilos y eosinófilos (23).

Los basófilos y su equivalente en el tejido conjuntivo, las células cebadas (mastocitos), son los granulocitos más grandes con un diámetro de 9.1  $\mu\text{m}$ . Los basófilos y las células cebadas en las aves se originan de la médula ósea. Su vida media es de aproximadamente 6 meses. Estos basófilos tienen núcleo redondo, excéntrico y no presentan lóbulos, sin embargo en raras ocasiones presentan dos lóbulos. En su citoplasma tienen gránulos basófilos abundantes, grandes y esféricos que cubren parcial o totalmente al núcleo y se tiñen de color rojo o azul con la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) (22, 24). Por medio del microscopio electrónico estas células se observan redondas u ovals con pseudopodia periférica, sus gránulos presentan un diámetro de 0.1 a 0.8  $\mu\text{m}$ , y su imagen ultraestructural sugiere que contienen heparina. La presencia de heparina en los gránulos puede ser la causa de metacromasia. Los basófilos de la gallina no contienen peroxidasa ni fosfatasa alcalina en sus gránulos. Otros agentes quimiotácticos presentes en los gránulos de los basófilos aviares son la histamina, cininas, prostaglandinas y leucotrienos LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> (12, 24, 25).

Los heterófilos de las aves, corresponden a los neutrófilos de los mamíferos, ya que

poseen gran movilidad y capacidad fagocítica, funciones que les permiten ser la primera defensa celular al ser las primeras células en llegar al sitio de la inflamación (26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33). Además el heterófilo es el leucocito de mayor cantidad en la sangre periférica en las gallinas domésticas (15). Los heterófilos miden aproximadamente 8.8  $\mu\text{m}$  de diámetro; son células redondas con el citoplasma pálido, su núcleo es polimórfico, usualmente bilobulado y sus gránulos no contienen mieloperoxidasa. En el fagosoma del heterófilo existe un ambiente ácido y sustancias bactericidas como la lisosima y la lactoferrina (34).

Los eosinófilos contienen en su citoplasma gránulos eosinofílicos, su función es fagocitaria y citotóxica contra algunos parásitos y además actúan como células moduladoras de la respuesta inflamatoria. Poseen receptores en la membrana para IgY, pero no para el complemento; sus mediadores químicos como las proteínas básicas, arilsulfatasa B, histaminasa y fosfolipasa D tienen como función inactivar a los mediadores liberados por las células cebadas o basófilos. Los eosinófilos aviares son generalmente redondos, miden 7.9  $\mu\text{m}$  de diámetro (22), el citoplasma, con la tinción de hematoxilina y eosina (HE), es azul pálido. Los gránulos de los eosinófilos aviares tienen diferentes coloraciones y pueden ser más brillantes y alargados que los del heterófilo, el núcleo es lobulado y su cromatina se tiñe de color púrpura a azul (29). En contraste con los heterófilos, los eosinófilos son peroxidasa positivos (27, 33, 35).

#### Anhídrido Citracónico

El anhídrido citracónico (AC) se sabe que es un agente que produce degranulación de basófilos, desencadenando una hipersensibilidad cutánea con la presencia de heterófilos y eosinófilos. En 1977 se describe al AC como un antígeno eficiente para producir hipersensibilidad en el cobayo, posteriormente ha sido empleado en la sensibilización en aves. El AC es clasificado como un hapteno, pues es una molécula no protéica que se combina con lugares de unión específicos para los anticuerpos, pero que no puede, por sí mismo, desencadenar una respuesta inmunitaria. El AC, al entrar en contacto con la colágena produce una reacción inmunológica, este alérgeno es muy raro en la naturaleza por lo que se facilita la sensibilización de las aves al entrar en contacto por primera vez con el agente (40).



El AC ha sido utilizado para producir eosinofilia y heterofilia en aves, pero no se ha utilizado en combinación con la histamina (39).

### Sulfóxido de Dimetilo

El sulfóxido de dimetilo (DOMSO), es un vehículo ideal por su alto poder de penetración. Penetra la piel sin alterar la integridad celular al modificar la permeabilidad de la membrana celular por ser muy liposoluble. El DOMSO lo mismo disuelve sustancias hidrosolubles que liposolubles y con o sin carga eléctrica (41).

### Histamina

La histamina es una amina producto de la descarboxilación del aminoácido histidina, es la iniciadora de la respuesta vascular, afecta a los vasos sanguíneos aumentando su permeabilidad, actúa sobre el músculo liso produciendo contracción en bronquios, útero, vejiga y en las glándulas exócrinas estimulando la producción de moco. Se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos, en los gránulos de los leucocitos basófilos y mastocitos que la liberan después de una agresión (36).

Está presente en tres formas: combinada, inestable y libre. La combinada solo se libera cuando hay destrucción celular, la inestable por factores de liberación y la libre se encuentra continuamente en forma de trazas en las células parietales del estómago (36). Estudios realizados sobre hipersensibilidad tipo I indican que la liberación inmunológica de la histamina es demostrable en la sangre completa de las aves sensibilizadas, así como también gran número de basófilos. La sangre de pollos sensibilizados con teratolina y propenidol tiene gran concentración de histamina, además los basófilos de los pollos presentan una degranulación ante la exposición a un antígeno, tanto *in vitro* como *in vivo* (37, 38). Otros estudios hechos con la aplicación intraperitoneal de histamina en aves indican que no tienen efecto en el proceso inflamatorio, limitando su efecto a vasos capilares (8, 39). Chand destaca el papel de los leucotrienos por encima del de la histamina al aplicar un receptor antagonista (FPL55712) de los leucotrienos después de la sensibilización con albúmina bovina (19).

El papel de la histamina en el proceso inflamatorio de los mamíferos está ampliamente descrito y es muy importante, mientras que en las aves aún no está muy bien definido, sobre todo su intervención en el proceso inflamatorio y en la HBC. La hipersensibilidad tipo I ha sido ampliamente estudiada en los mamíferos domésticos, esto ha servido como base para su estudio en el humano al traspolar los resultados obtenidos, pero no sucede lo mismo con las aves, campo en el que la falta de información es notoria, además de que la poca información existente es contradictoria, ya que por un lado se describe la importancia de la histamina y por otro lado se cuestiona su papel dentro del proceso inflamatorio (40), es decir no se sabe completamente el efecto de la histamina sobre los granulocitos cutáneos en procesos de hipersensibilidad.

## **HIPÓTESIS.**

- El anhídrido citracónico en aplicación local provoca aumento en la cantidad de basófilos, heterófilos y eosinófilos localmente en la piel de aves Leghorn de 28 días de edad.
- La histamina en aplicación local no influye en la acumulación de basófilos, heterófilos y eosinófilos cutáneos en aves Leghorn de 28 días de edad tratados con anhídrido citracónico.

## **OBJETIVO.**

Cuantificar el número de basófilos, heterófilos y eosinófilos en piel de aves Leghorn de 28 días de edad 30 minutos después del tratamiento con anhídrido citracónico, histamina y la combinación de ambos. Para definir el papel de la histamina dentro del proceso de hipersensibilidad tipo I.

El papel de la histamina en el proceso inflamatorio de los mamíferos está ampliamente descrito y es muy importante, mientras que en las aves aún no está muy bien definido, sobre todo su intervención en el proceso inflamatorio y en la HBC. La hipersensibilidad tipo I ha sido ampliamente estudiada en los mamíferos domésticos, esto ha servido como base para su estudio en el humano al traspolar los resultados obtenidos, pero no sucede lo mismo con las aves, campo en el que la falta de información es notoria, además de que la poca información existente es contradictoria, ya que por un lado se describe la importancia de la histamina y por otro lado se cuestiona su papel dentro del proceso inflamatorio (40), es decir no se sabe completamente el efecto de la histamina sobre los granulocitos cutáneos en procesos de hipersensibilidad.

## **HIPÓTESIS.**

- El anhídrido citracónico en aplicación local provoca aumento en la cantidad de basófilos, heterófilos y eosinófilos localmente en la piel de aves Leghorn de 28 días de edad.
- La histamina en aplicación local no influye en la acumulación de basófilos, heterófilos y eosinófilos cutáneos en aves Leghorn de 28 días de edad tratados con anhídrido citracónico.

## **OBJETIVO.**

Cuantificar el número de basófilos, heterófilos y eosinófilos en piel de aves Leghorn de 28 días de edad 30 minutos después del tratamiento con anhídrido citracónico, histamina y la combinación de ambos. Para definir el papel de la histamina dentro del proceso de hipersensibilidad tipo I.

El papel de la histamina en el proceso inflamatorio de los mamíferos está ampliamente descrito y es muy importante, mientras que en las aves aún no está muy bien definido, sobre todo su intervención en el proceso inflamatorio y en la HBC. La hipersensibilidad tipo I ha sido ampliamente estudiada en los mamíferos domésticos, esto ha servido como base para su estudio en el humano al traspolar los resultados obtenidos, pero no sucede lo mismo con las aves, campo en el que la falta de información es notoria, además de que la poca información existente es contradictoria, ya que por un lado se describe la importancia de la histamina y por otro lado se cuestiona su papel dentro del proceso inflamatorio (40), es decir no se sabe completamente el efecto de la histamina sobre los granulocitos cutáneos en procesos de hipersensibilidad.

## **HIPÓTESIS.**

- El anhídrido citracónico en aplicación local provoca aumento en la cantidad de basófilos, heterófilos y eosinófilos localmente en la piel de aves Leghorn de 28 días de edad.
- La histamina en aplicación local no influye en la acumulación de basófilos, heterófilos y eosinófilos cutáneos en aves Leghorn de 28 días de edad tratados con anhídrido citracónico.

## **OBJETIVO.**

Cuantificar el número de basófilos, heterófilos y eosinófilos en piel de aves Leghorn de 28 días de edad 30 minutos después del tratamiento con anhídrido citracónico, histamina y la combinación de ambos. Para definir el papel de la histamina dentro del proceso de hipersensibilidad tipo I.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

Se emplearon 4 grupos de aves Leghorn, cada uno de 5 aves. Al grupo A se le trató con AC, al B con Histamina, al C con AC + Histamina y al D con DOMOSO. Se tomó como día uno del experimento al día 28 de edad de las aves, en el cual se aplicó el primer tratamiento en la piel del lado izquierdo del tórax en la zona del apterilo con un hisopo hasta humedecer perfectamente toda el área, a los siete días se aplicó un segundo tratamiento exactamente en la misma zona. Pasados 30 min. después del segundo tratamiento se sacrificó a las aves y se tomó una muestra de piel del área tratada. Para su revisión histológica las muestras se procesaron por el método de inclusión en parafina, las secciones histológicas se tiñeron con Ziehl Neelsen (ZN), hematoxilina y eosina (HE) y p-fenilenediamina dihidroclorido (PPD) + pirocatecol (PC), para la identificación de basófilos, heterófilos y eosinófilos respectivamente, se observaron al microscopio y a los valores totales de cada granulocito se aplicó un análisis de varianza, a las medias un análisis de Tukey, fijando la significancia en  $P < 0.05$ .

### ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon 20 aves Leghorn, machos, convencionales, que se obtuvieron 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, 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.) y agua *ad libitum*. Se consideró como día 1 de la etapa experimental al día 28 de edad de los pollos.

## **DISEÑO DE TRATAMIENTOS**

Se formaron 4 grupos, cada uno de 5 aves. Las aves de todos los grupos fueron sensibilizadas en 1 cm<sup>2</sup> de piel del lado izquierdo del tórax en la zona del apterilo, entre las venas torácicas externa dorsal y la vena torácica externa ventral (22) en el día 1; se aplicó un segundo tratamiento a los 7 días, exactamente en el mismo lugar. 30 minutos posteriores del 2º tratamiento, se sacrificaron las aves por émbolo gaseoso, se tomó una muestra de piel (1 cm<sup>2</sup>) del área en donde se sensibilizó a cada ave para su revisión histológica, la muestra se colocó sobre una tarjeta de cartón para su fijación en formol al 10%.

### **Tratamiento N° 1. Anhídrido Citracónico.**

Preparación de la solución de AC.

Se preparó una solución al 1% de AC (SIGMA CHEMICAL Co., St Louis MO) en DOMOSO (SYNAMID Co., Mexico DF.) al 90%.

Tratamiento de las aves:

Usando la solución de AC se sensibilizó a las aves en el día 1, se aplicó con un hisopo hasta humedecer la zona. La siguiente aplicación fue igual a la primera.

### **Tratamiento N° 2. Histamina.**

Preparación de la solución de histamina.

Se preparó una solución al 1% de histamina (BAKER CHEMICA Co.) en DOMOSO al 90%.

Tratamiento de las aves:

Usando la solución de histamina se sensibilizó a las aves en el día 1, se aplicó con un hisopo hasta humedecer la zona. La siguiente aplicación fue igual a la primera.

### **Tratamiento N°3. AC + histamina.**

Preparación de la solución de AC + Histamina.

Se preparó una solución al 1% de AC en DOMOSO al 90%. y también se preparó una solución al 1% de histamina en DOMOSO al 90%.

#### **Tratamiento de las aves:**

Primero se sensibilizó con la dilución al 1% de AC y al día siguiente con la solución de histamina al 1%. Al día siete se aplicó el mismo tratamiento, untando las dos diluciones al mismo tiempo.

#### **Tratamiento N°4. Sulfóxido de dimetilo (DOMOSO).**

##### **Preparación del sulfóxido de dimetilo.**

Se empleó DOMOSO al 90 %.

##### **Tratamiento de las aves:**

El grupo cuatro se sensibilizó con DOMOSO al 90 % en el día 1, se aplicó con un hisopo, hasta humedecer la zona. La siguiente aplicación fue igual a la primera.

#### **PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.**

Cada una de las muestras fijadas en formalina se dividió en dos partes, una mitad se procesó según el método convencional de inclusión en parafina (42), para obtener secciones histológicas de 4  $\mu$ m de espesor. Estas secciones se tiñeron con HE y ZN según lo descrito por Allen (43) y Arrington (44), respectivamente.

Para la identificación de los eosinófilos por medio del marcaje enzimático de la peroxidasa de sus gránulos (45), la otra mitad de las muestras se incubaron en un sustrato compuesto por 10 mg de p-fenilenediamina dihidroclorido (PPD) (SIGMA Chemical Co., St Louis MO), 20 mg de pirocatecol (PC) (Mallinkrodt Baker, Philipsburg NJ), 10 ml de amortiguador Tris (0.1) a un pH de 7.6 (46). La incubación duró 180 minutos cambiándose el sustrato a los 90 minutos. Después de este proceso, se incluyeron en parafina y se realizó una sección histológica por muestra de 4  $\mu$ m de espesor y se contratiñeron con hematoxilina de Harris (47).

#### **CUANTIFICACIÓN DE GRANULOCITOS.**

Por medio del objetivo de inmersión (100 X) de microscopía fotónica, se identificaron

basófilos, heterófilos y eosinófilos, utilizando áreas seleccionadas por un muestreo aleatorio simple de los cortes teñidos con HE, PPD+PC y ZN respectivamente, se evaluó una área de  $0.92 \text{ mm}^2$  observando 10 campos que incluían epidermis y dermis superficial, así como 10 campos de dermis profunda.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

A los valores totales de cada granulocito se les aplicó un análisis de varianza, a las medias se les aplicó análisis de Tukey para sus diferencias. A las cantidades de granulocitos se les aplicó transformación logarítmica sumándoles una unidad para evitar cantidades cero. La significancia estadística se fijó con  $P < 0.05$ . En el análisis estadístico de la proporción de granulocitos se realizó la transformación de los datos a través de la raíz cuadrada del arcoseno, a los datos transformados se les aplicó un análisis de Kruskal - Wallis, fijando la significancia en ( $P < 0.05$ )



## RESULTADOS.

Se observó mayor cantidad de basófilos tanto en dermis superficial, dermis profunda, así como en el promedio en el grupo de aves tratadas con Anhídrido Citracónico (AC), seguido por las aves tratadas con histamina, AC + histamina y Sulfóxido de dimetilo (DOMOSO). Presentándose mayor diferencia ( $P < 0.05$ ) entre el grupo tratado con AC con respecto a los grupos tratados con histamina, AC + histamina y DOMOSO. También los basófilos cuantificados en el grupo tratado con histamina presentaron mayor diferencia con respecto a los basófilos observados en los grupos tratados con AC + histamina y DOMOSO. Mientras que entre los grupos tratados con AC + histamina y DOMOSO se observó una menor diferencia ( $P > 0.05$ ) (Fig. 1, 4 y 5).

La cantidad de heterófilos encontrados en la dermis superficial muestra menor diferencia ( $P > 0.05$ ) entre los grupos de aves tratadas con AC, histamina, AC + histamina y DOMOSO. En la dermis profunda se encontró una cantidad de heterófilos con menor diferencia ( $P > 0.05$ ) del grupo tratado con AC y el grupo tratado con histamina, pero estos dos grupos presentan mayor diferencia ( $P < 0.05$ ) con respecto a los grupos tratados con AC + histamina y DOMOSO; se encontró menor diferencia ( $P > 0.05$ ) entre los grupos tratados con AC + histamina y DOMOSO. En el promedio de heterófilos hay una menor diferencia entre el grupo tratado con AC y los grupos tratados con histamina AC + histamina y DOMOSO, pero no entre los grupos tratados con histamina, AC + histamina y DOMOSO (Fig. 2 y 5).

En la dermis superficial de las aves tratadas con AC se observó una mayor cantidad de eosinófilos con mayor diferencia ( $P < 0.05$ ) con relación a los grupos tratados con histamina, AC + histamina y DOMOSO. Se observó menor diferencia ( $P > 0.05$ ) entre los grupos tratados con histamina, AC + histamina y DOMOSO. Mientras que en la epidermis profunda y en el promedio se observó menor diferencia entre todos los grupos (Fig. 3, 4 y 5)

En el grupo de aves inoculado con AC se presentó una mayor relación ( $P < 0.05$ ) en la proporción celular heterófilos:basófilos en comparación a los grupos de aves inoculadas con

histamina, AC+histamina y DOMOSO; mientras que entre los grupos de aves inoculadas con histamina, AC+histamina y DOMOSO se encontró una relación menor ( $P>0.05$ ) en la proporción celular heterófilo:basófilo (Fig. 6).

Se observó una mayor relación ( $P<0.05$ ) en la proporción celular heterófilo:eosinófilo en el grupo de aves inoculadas con histamina en comparación a las proporciones observadas en los grupos de aves inoculadas con AC, AC+histamina y DOMOSO; mientras que entre estos grupos de aves se encontró una menor diferencia ( $P>0.05$ ) (Fig 6).

El grupo de aves inoculadas con AC presentó una mayor relación ( $P<0.05$ ) en la proporción basofilo:eosinófilo en comparación a la observada en los grupos de aves inoculadas con histamina, AC+histamina y DOMOSO, pero entre estos grupos se encontró una menor relación ( $P>0.05$ ) (Fig 6).

## DISCUSIÓN.

En los grupos tratados con AC, histamina, AC+histamina y DOMOSO, se pudieron cuantificar basófilos después de la primera media hora de la segunda inoculación, lo que concuerda con el trabajo realizado por Katiyar (32) quien informó la presencia de basófilos dentro de la primera media hora después de la aplicación de endotoxina de *Eschereichia coli*, y también con el trabajo de Chansoriya (28) quien encontró que al aplicar trementina se puede detectar la presencia de basófilos a los 30 minutos después de la inoculación, alcanzando su concentración máxima a las 12 horas.

La presencia de basófilos en el grupo tratado con AC sugiere un proceso inflamatorio agudo, Chand (37) demostró la presencia de basófilos capaces de participar en reacciones inflamatorias e inmunológicas; este proceso inflamatorio es más evidente en este grupo de aves tratadas con AC que en el resto de los grupos, ya que el AC está desencadenando un proceso inflamatorio compatible con hipersensibilidad. Esta alta cantidad de basófilos se puede deber a la acción de los leucotrienos que favorecen el incremento de la permeabilidad vascular después de haber entrado en contacto con el Ag.

La disminución del número de basófilos en el grupo de aves tratadas con AC+histamina, se puede deber a un mecanismo de retroalimentación negativa de la histamina que bloquea a los receptores  $H_2$  como lo informa Chand (37) en sus trabajos al utilizar teratolina, cimetidina y propenidol, además los eosinófilos liberan enzimas como la histaminasa que contrarrestan la acción de la histamina (3), estos dos mecanismos pueden estar interactuando e influir en la disminución en número de basófilos cuantificado en este grupo de aves.

La presencia de heterófilos en todos los grupos es debido a su papel como una de las primeras células en formar parte dentro del proceso inflamatorio como lo indican Carlson (26), Kirk (49) y Chansoriya (28), en todos los grupos se registró un mayor número de heterófilos en la dermis profunda que en la dermis superficial, posiblemente debido a una

mayor irrigación que favorece la quimiotaxia en este estrato cutáneo, coincidiendo con lo informado por Maxwell (39), quien también trabajó con aves aplicando una solución de AC en la piel. Katiyar (32), Stadaker (19) y Chansoriya (28) también reportan una mayor cantidad de heterófilos en los primeros 30 minutos posinoculación en aves, los alérgenos empleados por estos autores fueron trementina, concavalamina, endotoxina de *E coli*, fitohemoaglutinina y dinitroclorobenceno. La menor cantidad de heterófilos en el grupo de aves inoculado con AC+histamina en comparación con los grupos inoculados con AC e histamina se puede deber a la activación del sistema de retroalimentación negativa que modula al sistema inmune y a la respuesta inflamatoria por acción de la IL I (16, 17) o bien por la activación de los receptores H2 de los basófilos (37).

La técnica de PPD + PC fué útil para diferenciar los eosinófilos de los heterófilos y se pudo cuantificar a los eosinófilos 30 minutos postratamiento debido a un proceso de hipersensibilidad concordando con lo informado por Maxwell (39). Debido a la dificultad para distinguir a los eosinófilos de los heterófilos con técnicas histológicas de rutina, son pocos los autores que han informado cuantificaciones de cada una de estas células, solo Ahuadiya (45), Singhi (35) y Maxwell (39) han hecho esta diferenciación. Maxwell (39) describió la presencia de los eosinófilos en la dermis dentro de los primeros 30 minutos después del tratamiento con AC y su número disminuye hasta desaparecer dentro de las 24 horas. Los resultados en la cuantificación de eosinófilos en la dermis superficial del grupo de aves tratadas con AC y el grupo de aves tratadas con histamina corresponden a un proceso inmunológico, ya que los eosinófilos participan en la regulación de los basófilos; lo cual es más notorio en el grupo tratado con AC, siendo este el grupo con más eosinófilos. Este proceso no corresponde a uno de Hipersensibilidad Basofílica Cutánea, en el cual la respuesta de los basófilos tarda en expresarse hasta 24 horas postratamiento y la presencia de eosinófilos es nula, como lo reportan Maxwell (39) y Stadaker (19), quienes además describen un infiltrado caracterizado por la presencia de heterófilos, basófilos y células mononucleares en la HBC. En el grupo tratado con DOMOSO no se presentó un proceso inmunológico ya que no se registró un aumento en la cantidad de eosinófilos y basófilos debido posiblemente a que el DOMOSO no es un alérgeno, pero el DOMOSO si es capaz de desencadenar un proceso

inflamatorio ya que se registraron cantidades importantes de heterófilos, como lo informa Maxwell (39), quien inoculó S.S.F. en la cavidad peritoneal de las aves y Chansoriya (28) quien también informa de la presencia de heterófilos en cantidades importantes tras inocular S.S.F. por vía subcutánea.

Los basófilos, heterófilos y eosinófilos cuantificados en los grupos tratados con histamina, AC+histamina, no fueron superiores a los encontrados en el grupo de aves tratadas con AC, lo cual nos sugiere un papel no determinante de la histamina exógena dentro del proceso inflamatorio de hipersensibilidad inmediata en las aves, al no influir en el número de granulocitos del grupo de aves tratadas con AC+histamina en forma significativa, lo cual coincide con los estudios de Chand (37), quien además ha determinado la presencia de los receptores  $H_2$  Histaminérgicos y  $\beta_2$  Adrenérgicos, la acción del sistema de retroalimentación negativa para el control de la liberación de histamina, destacando el papel de los leucotrienos (SRL-A) al aumentar la permeabilidad vascular y al tener funciones de quimiotaxis (9), mientras que Awadiya (45) y Chansoriya (28) han informado de un efecto de la histamina limitado únicamente sobre las vénulas aumentando su permeabilidad.

Aunque la histamina se encuentra en la sangre de aves sensibilizadas (37) y en los basófilos, no tiene un papel determinante en la quimiotaxis hacia los eosinófilos en la hipersensibilidad tipo I (37), lo que concuerda con los resultados observados en los grupos de aves tratadas con AC, histamina y AC+histamina. El AC como alérgeno en la hipersensibilidad tipo I produjo una respuesta celular superior a la de la histamina, excepto en el número de eosinófilos de la dermis profunda, donde el número de eosinófilos es mayor en el grupo tratado con histamina, esto se puede explicar o atribuir a la acción que ejerce la histamina sobre las vénulas de la dermis profunda al aumentar su permeabilidad. En la actividad celular registrada en el grupo de aves inoculadas con AC, puede estar interviniendo la IgY en un proceso de hipersensibilidad, esta inmunoglobulina en las aves, realiza las funciones de la IgG e IgE de los mamíferos, es decir participa en reacciones de hipersensibilidad, en la opsonización y la neutralización de Ag.

En lo que corresponde a las proporciones entre los granulocitos; se presentó una alta proporción de heterófilos en su relación con los basófilos en los grupos de aves inoculadas con AC, histamina y AC+histamina que nos indica un proceso primordialmente inflamatorio. En el grupo de aves inoculadas con AC, además del proceso inflamatorio ya descrito, encontramos un proceso inmunológico por la actividad de los basofilos.

La proporción de heterófilos con relación a los basófilos nos indica un proceso inflamatorio acompañado por un inmunológico, la mayor cantidad de heterófilos es normal ya que estos participan tanto en procesos inmunológicos como inflamatorios, además de ser una de las primeras células en tomar parte en el proceso inflamatorio (26, 27, 28, 29, 30, 31, 32).

En los grupos de aves inoculadas con AC+histamina y DOMOSO la relación celular es alta por la mayor cantidad de heterófilos que de eosinófilos correspondiendo esto básicamente a un proceso inflamatorio; mientras que en los grupos de aves inoculadas con AC e histamina presentan un proceso inmunológico. La proporción heterófilo:eosinófilo nos indica un proceso inmunológico, en el cual los eosinófilos regulan a los basófilos, la mayor cantidad de heterófilos con relación a los eosinófilos coincide con los resultados encontrados por Maxwell (39) quién también informa de esta mayor cantidad de heterófilos con relación a los eosinófilos.

La cantidad de basófilos encontrada en el grupo de aves inoculadas con AC se debe a un proceso inflamatorio acompañado por eosinofilia; mientras que en los grupos inoculados con histamina, AC+histamina y DOMOSO la relación celular heterófilo:eosinófilo fue más baja, no por que se haya registrado un aumento en el número de eosinófilos, sino porque estos grupos registraron un número reducido de basófilos, los cuales participan en procesos inmunológicos e inflamatorios como ocurre en el grupo inoculado con AC (39).

En los trabajos que informan sobre los resultados de cuantificaciones celulares no se realizaron tinciones específicas para identificar a los basófilos, pero sí realizaron tinciones especiales para diferenciar a los eosinófilos de los heterófilos, siendo esto su objetivo

principal, por esta razón no hay puntos para comparar las cuantificaciones de los basófilos encontrados en este trabajo con los resultados encontrados en trabajos hechos por otros autores. (39, 22)

En este trabajo se puede concluir que los basófilos participan en procesos de hipersensibilidad tipo I e inflamatorios y los eosinófilos actúan regulando a los basófilos en el proceso de hipersensibilidad aviar como en el grupo de aves tratadas con AC los heterófilos participan en procesos inflamatorios como los que se observaron en todos los grupos de aves inoculadas con AC, histamina, AC+histamina y DOMOSO. El AC actúa produciendo un aumento en el número de basófilos, eosinófilos y heterófilos, dentro de un proceso de hipersensibilidad tipo I. Por otro lado podemos decir que la histamina exógena no desempeña un papel fundamental dentro del proceso de hipersensibilidad en las aves como se puede ver en el grupo de aves tratadas con AC+histamina, lo que sugiere la importancia de otros factores como los leucotrienos, el mecanismo de retroalimentación negativa para el control de los procesos de hipersensibilidad e inflamación.

## REFERENCIAS

1. Stites D, Terr A. Inmunología básica y clínica. 7ª ed. México (DF): El Manual Moderno, 1993.
2. Roitt I. Inmunología, fundamentos. 7ª ed. México (DF): Médica Panamericana, 1994
3. Tizard I. Inmunología Veterinaria. México (DF): Interamericana Mc Graw-Hill, 1992.
4. Barret J. Inmunología médica. 5ª ed. México (DF): Interamericana Mc Graw-Hill, 1991.
5. Rojas W. Inmunología. 9ª ed. Bogota: Corporación para las investigaciones biológicas, 1993.
6. Ramirez NR, Piojan AC. Enfermedades de los Cerdos. México (DF): Diana, 1993.
7. Olsen RG, Krakowka S. Inmunología e Inmunopatología de los animales domésticos. México (DF): El Manual Moderno, 1983.
8. Chand N, Eyre P. Immunological release of histamine and slow-reacting substance in domestic fowl. *Can J Com Med* 1978;42:519-524.
9. Trigo FT. El ácido araquidónico en la inflamación. Memorias de VII Congreso de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C; 1998 junio 3-6; Manzanillo (Colima) México. México DF Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, AC, 1998:73-75
10. Bellanti J. Inmunología. 3ª ed. México (DF): Nueva Editorial Interamericana, 1986.
11. Carda AP, Gómez CG. Patología General Veterinaria. México (DF): El Manual Moderno, 1993
12. Trigo TF, Inmunopatología. En: Trigo TF, Mateos PA, editores. Patología General. 2ª ed. México (D.F.): Interamericana Mc Graw-Hill, 1993.
13. Chen-lo H, Pikel J, Jill M, Cooper M. Surface markers b on avian cells. In: Sharma J. editor Avian cellular immunology. Florida: CRC Express, 1991.
14. Warr G. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 1995;16:392-399.
15. Petrone VM, Casaubon MT, Juarez MA, Ledesma N, Cabriales J. Del Rio J.C. Inflamación e inmunología celular en aves. Memorias de VI Jornada Médico Avícola; 1997 marzo 12-14; México (DF) México. México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, A.C. 1997:117-122.
16. Klasing KC. Avian Macrophages: regulators of local an systemic Immune Responses. *Poul*



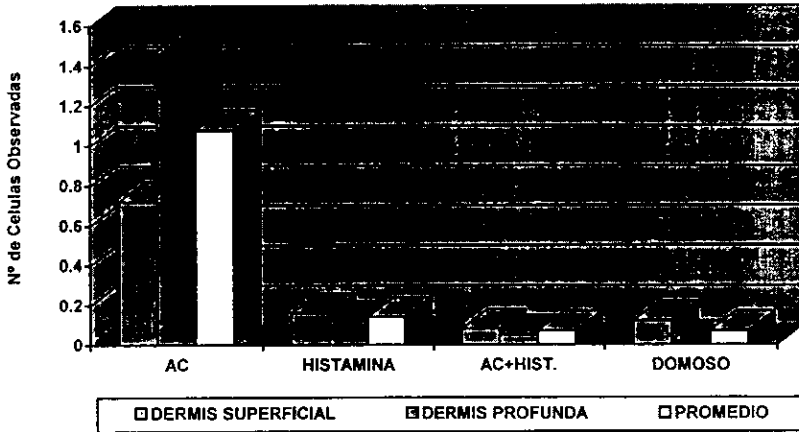
- Sci 1998;77:983-989.
17. Qureshi MA. Role of macrophages in avian health and disease. *Poult Sci* 1998;77:978-982.
  18. Carlson H. The acute inflammatory reaction in chicken skin: blood cellular response. *Avian Dis* 1969;13:817-833.
  19. Stadecker MJ, Lukic M, Dvorak Ann, Leskowitz S. The cutaneous basophil response to phytohemagglutinin in chickens. *J Immunol* 1977;118:1564-1568.
  20. Kean RP, Lamont SJ. Effect of injection site on cutaneous basophil hypersensitivity response to phytohemagglutinin. *Poult Sci* 1994;13:1763-1765.
  21. Scott RP, Siopes TD. Evaluation of cell mediated incompetence in mature turkey breed hens using a dwalp skin test. *Avian Dis* 1994;38:161-164.
  22. Maxwell M H, Robertson GW. The avian basophilic leukocyte: a review. *Word Poult Sci J* 1995;51:307-325.
  23. Hernández VX, Garcia G, Téllez G, Navarro JA, Quintana JA, Kogut M. Adaptación de un modelo para inducir granulocitopenia en sangre periférica en pollos de engorda. *Memorias de VI Jornada Médico Avícola*; 1997 marzo 12-14; México (DF) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, A.C. 1997:205-214.
  24. Adum D. Przydatnosc metod barwienia komorek tucznych w diagnostyce roznicowej zlosliwych nowotworow skory u psa. *Medycyna Weterynaryjna* 1991;47:181.
  25. Halliwell RE, Gorman N. Mecanismo de lesión inmunológica en las reacciones de hipersensibilidad. En: Halliwell RE, Gorman N, editores. *Inmunología Clínica Veterinaria*. Zaragoza: Acribia, 1992;231.
  26. Carlson HC, Allen JR. The acute inflammatory reaction in chicken skin: blood cellular response. *Avian Dis* 1969;13:817-833.
  27. Montali RJ. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates. (Reptiles, Birds and Mammals). *J Comp Pathol* 1988;99:1-26.
  28. 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.
  29. Campbell TW. *Avian hematology and cytology*. Iowa: State University Press/Ames 1988.

30. Huynh V, Cubb RC. The induction of delayed type hypersensitivity to dinitrochlorobenzene in the chicken. *Avian Pathol* 1987;16:383-393.
31. Topp RC, Carlson HC. Studies on avian heterophils III. Phagocytic properties. *Avian Dis* 1972;16:374-380.
32. Katiyar AK, Vegar JL, Awadhiya RP. Pathology of inflammatory - reparative response in punched wounds of chicken skin. *Avian Pathol* 1992;21:471-480.
33. Harmon GB. Avian Heterophils in inflammation and disease resistance. *Poul Sci* 1998;77:972-977
34. Topp RC, Carlson HC. Studies on avian heterophils II. Histochemistry. *Avian Dis* 1972;16:369-373.
35. Shing SD, Mohanty GC. Histochemical method for identification of tissue eosinophils in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Indian J Anim Sci* 1992;62:424-426.
36. Movat HZ, editor. *Inflammation, Immunity and Hypersensitivity*. Harper & Row Publishers, 1971.
37. Chand N, De Roth L. Acute systemic anaphylaxis in adult domestic fowl: evidence for the protective role of H<sub>2</sub> Histaminergic and  $\beta$ <sub>2</sub>-Adrenergic receptors. *Am J Vet R* 1980;41:101-105.
38. Müller HJ, Vallota E, Götze, Zimmermen T. Mediators of the Inflammatory Response. Complement. In: Lepow YH, Ward PA. editors. *Inflammation Mechanisms and Control*. New York: Academic Press, 1972:83-91.
39. Maxwell MH. Histochemical identification of tissue eosinophils in the inflammatory response of the fowl (*Gallus domesticus*). *Res Vet Sci* 1984;37:7-11.
40. Maxwell MH. Attempted induction of an avian eosinophilia using various agents. *Res Vet Sci* 1980;29:293-297
41. Sumano H, Ocampo CL. *Farmacología Veterinaria*. México (DF): Mc Graw Hill 1987.
42. Hall J. Inclusión de Tejidos. Prophet EB, Mill B, Arrington J B, Sobin L H editores. *Métodos Histotecnológicos*. Washington (DC): Instituto de patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995:41-46.
43. Allen TC. Hematoxilina y eosina . En: Prophet EB, Mills B, Arrington J B, Sobin L H editores. *Métodos Histotecnológicos*. Washington (DC): Instituto de patología de las

- fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995:55-60.
44. Arrington JB. Bacterias, hongos y otros microorganismos. En: Prophet EB, Mills B, Sobin L H editores. Métodos Histotecnológicos. Washington (DC): Instituto de patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995:209 -240.
  45. Awadhiya RP, Vegad JL, Kolt GN. Eosinophil Leukocytic response in dinitrochlorobenzene skin hypersensitivity reaction in the chicken. Avian Pathology 1982;11:187-194.
  46. Hanker J S, Yates P J, Metz CB, Rustioni A. A new specific, sensitive and non carcinogenic reagent for the demonstration of horse radish peroxidase. Histochemical. J. 1977;9:789-792.
  47. Hall J, Inclusión de Tejidos. En: Prophet EB, Mill B, Arrington J B, Sobin L H editores. Métodos Histotecnológicos. Washington (DC): Instituto de patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995:
  48. Lizárraga MI, Sumano LH. Farmacología clínica de los antihistamínicos en Medicina Veterinaria. Vet Mex 1998;29:369-383.

## FIGURAS

Figura 1. Media de los basófilos cuantificados en la dermis superficial, dermis profunda y promedio en aves Legornh inoculadas con AC, histamina, AC+histamina y DOMOSO.



GRUPO	AC*	HISTAMINA	AC*+HISTAMINA	DOMOSO†
DERMIS SUPERFICIAL	0.72 <sup>a</sup> (0.2787) <sup>‡</sup>	0.16 <sup>b</sup> (0.1517)	0.08 <sup>c</sup> (0.0983)	0.12 <sup>c</sup> (0.1789)
DERMIS PROFUNDA	1.45 <sup>a</sup> (1.1572)	0.12 <sup>b</sup> (0.0837)	0.05 <sup>c</sup> (0.0837)	0.02 <sup>c</sup> (0.0447)
PROMEDIO	1.08 <sup>a</sup> (0.8892)	0.14 <sup>b</sup> (0.1174)	0.07 <sup>c</sup> (0.0888)	0.07 <sup>c</sup> (0.1337)

\* Anhídrido Citracónico.

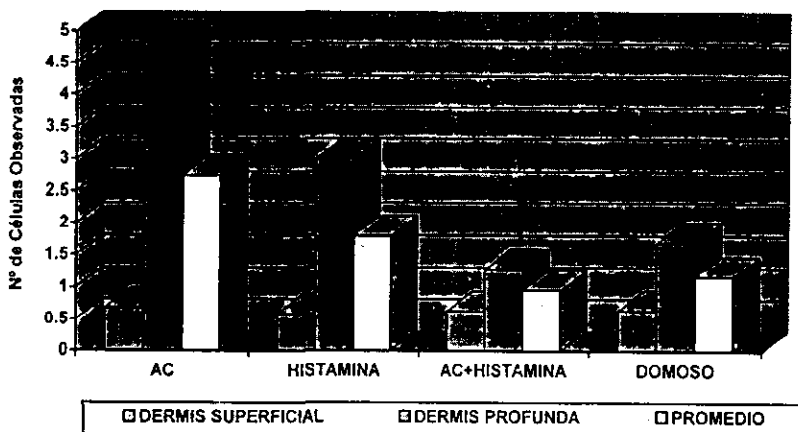
† Sulfóxido de dimetilo.

‡ Desviación estandar

Literales diferentes (a, b y c) señalan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) dentro del mismo renglón.

ESTA TESIS NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura 2. Media de los heterófilos cuantificados en la dermis superficial, dermis profunda y promedio en aves Legornh inoculadas con AC, histamina, AC+histamina y DOMOSO.



GRUPO	AC*	HISTAMINA	AC+HISTAMINA	DOMOSO <sup>†</sup>
DERMIS SUPERFICIAL	0.6833 <sup>a</sup> (0.5636) <sup>‡</sup>	0.58 <sup>a</sup> (0.3899)	0.633 <sup>a</sup> (0.43)	0.64 <sup>a</sup> (0.2408)
DERMIS PROFUNDA	4.8333 <sup>a</sup> (2.6741)	3.06 <sup>a</sup> (1.1718)	1.28 <sup>b</sup> (0.6369)	1.7 <sup>b</sup> (1.2629)
PROMEDIO	2.7583 <sup>a</sup> (2.8446)	1.82 <sup>a</sup> (1.5447)	0.96 <sup>a</sup> (0.6215)	1.17 <sup>a</sup> (1.0231)

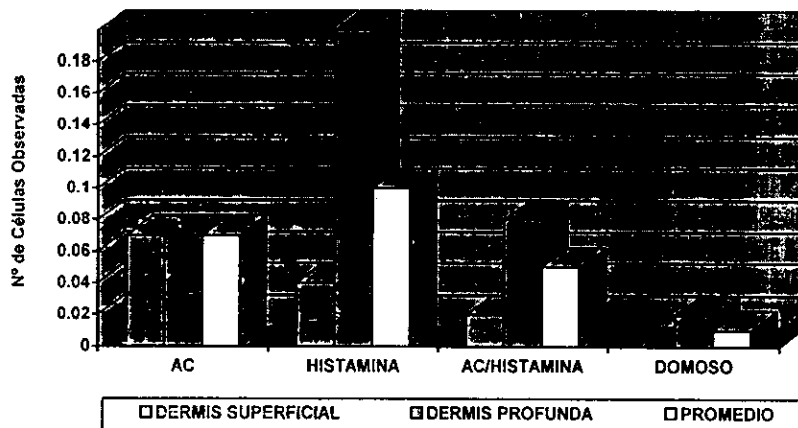
\* Anhídrido Citracónico.

<sup>†</sup> Sulfóxido de dimetilo.

<sup>‡</sup> Desviación estandar

Literales diferentes (a, b y c) señalan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) dentro del mismo renglón.

Figura 3. Media de los eosinófilos cuantificados en la dermis superficial, dermis profunda y promedio en aves Legornh inoculadas con AC, histamina, AC+histamina y DOMOSO.



GRUPO	AC*	HISTAMINA	AC*+HISTAMINA	DOMOSO†
DERMIS SUPERFICIAL	0.07 <sup>a</sup> (0.08165) <sup>‡</sup>	0.04 <sup>b</sup> (0.0547)	0.02 <sup>b</sup> (0.04082)	0.0 <sup>b</sup> (0.0)
DERMIS PROFUNDA	0.07 <sup>a</sup> (0.08165)	0.2 <sup>a</sup> (0.01732)	0.08 <sup>a</sup> (0.13292)	0.02 <sup>a</sup> (0.04472)
PROMEDIO	0.07 <sup>a</sup> (0.07785)	0.1 <sup>a</sup> (0.1475)	0.05 <sup>a</sup> (0.1)	0.01 <sup>a</sup> (0.03162)

\* Anhídrido Citracónico.

† Sulfóxido de dimetilo

‡ Desviación estandar

Literales diferentes (a, b y c) señalan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) dentro del mismo renglón.

**Figura 4.**

**A) Basófilos observados en la dermis de aves Legornh inoculadas con Anhídrido Citracónico. Tinción de Ziehl Neelsen X1000.**



**B) Eosinófilo observado en la dermis de aves Legornh inoculadas con Anhídrido Citracónico. Tinción p fenilenediamina dihidroclorhido + pirocatecol X1000.**



Figura 5. Promedio de los basófilos, heterófilos y eosinófilos cuantificados en la dermis superficial y dermis profunda en aves Legornh inoculadas con AC, histamina, AC+histamina y DOMOSO.

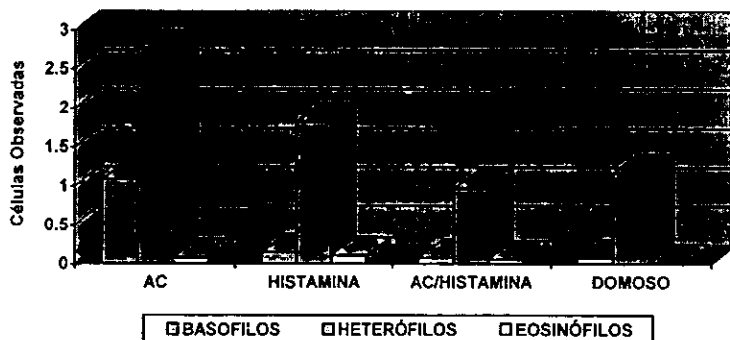


Figura 6. Mediana (mediana) de las proporciones observadas entre los granulocitos cuantificados en la piel de aves Leghorn inoculadas con AC, histamina, AC+histamina y DOMOSO.

GRUPO	AC*	HISTAMINA	AC+HISTAMINA	DOMOSO*
HET/BAS	2.73 <sup>&amp;a</sup> (1.66)	110.49 <sup>b</sup> (11.84)	101.07 <sup>b</sup> (51.0)	137.6 <sup>b</sup> (91)
HET/EOS	236.18 <sup>a</sup> (42.33)	66.2 <sup>b</sup> (13.6)	125 <sup>a</sup> (71)	193.9 <sup>a</sup> (141)
BAS/EOS	101.3 <sup>a</sup> (62.29)	14.9 <sup>b</sup> (1.29)	6.02 <sup>b</sup> (1)	14.2 <sup>b</sup> (1)

\* Anhidrido Citracónico.

\*\* Sulfoxido de Dimetilo.

& Mediana de las proporciones, expresa el valor de la célula encontrada en mayor cantidad. Literales diferentes en un mismo renglón indican diferencia (P<0.05).