

01674

7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

**PATOGENESIS DE LAS HEMORRAGIAS EN LA
ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y LA SALUD ANIMAL: AVES**

PRESENTADA POR

FELIPA GALINDO MUÑIZ

293052

**TUTOR: NORMA LETICIA CALDERON APODACA
COMITE TUTORAL: GUILLERMO TELLEZ ISAIAS
TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**



MEXICO, D. F.

2001



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.

COMITÉ TUTORAL:

GUILLERMO TELLEZ ISAIAS

TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

INTEGRANTES DEL JURADO:

LEOPOLDO HENRI PAASCH MARTINEZ

GUILLERMO TÉLLEZ ISAIÁS

TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ

NORMA LETICIA CALDERÓN APODACA

DEDICATORIAS

A mis padres **Natividad Muñiz García** y **Pedro Galindo Rodríguez**, por que con su apoyo me permitieron concluir con esta etapa de mi preparación y de mi vida

A mis hermanos Guadalupe, Juan, Amalia y Bertin, a mis sobrinos Yolanda, Jose Juan, Angel, Ivonne y Mildred, y a mis familiares, en especial a mi abuelo **Juan Muñiz Granados†** por sus palabras de ánimo para seguir adelante

A Rosa Martínez Guzmán por su gran amistad

y

A todas las personas que han participado en mi formación de manera incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

AL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL: AVES

AL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y TISULAR DE LA FACULTAD DE MEDICINA

Por permitirme realizar y concluir mis estudios de maestría.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su disponibilidad aún en tiempos difíciles.

A la Secretaría de Superación e Intercambio Académico que ofrecen la oportunidad de continuar preparándose profesionalmente a muchos medico veterinarios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo que me ofrecieron al otorgarme la beca para estudios de posgrado.

A los integrantes de mi comité tutorial: MVZ, DCV Norma Leticia Calderón Apodaca, MVZ, PhD Guillermo Téllez Isaías y MC Teresa Imelda Fortoul van der Goes, por su gran orientación y disposición durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado: MVZ, PhD Leopoldo H. Paasch Martínez y Dr Andrés Eliú Castell Rodríguez, por sus valiosos consejos y puntos de vista.

A los técnicos del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina: MVZ Patricia Bizarro y Francisco Pasos por su apoyo para el estudio ultraestructural.

A la Dra. Luz Ma Charles Noriega por su ayuda en el estudio hematológico y a la Dra Magdalena Escorcia Martínez por su invaluable enseñanza y amistad.

A los académicos y administrativos del DPA:Aves.

A mis amigos y compañeros de trabajo del Departamento de Producción Animal: Aves, con quienes tuve la oportunidad de convivir: Mireya Ortiz, Libia Gutiérrez, Roberto Escamilla, Julio Alfaro, Cecilia Rosario, Donaji García, Blanca Bautista, Lilia Castellanos, Daniel Ortega, Rubén Merino, Xóchitl Hernández, Mónica Andrade, Rodrigo Cascante, Mireya Juárez, Adriana Barri, Gerardo Nava, Daniel Camacho, Juan Carlos, Ulises, Esmeralda, Blanca, Judith, Rosy Saldivar, José González, Elizabeth Abrego, Sr. Rodrigo Merino, Sr. Adelfo Juárez y en especial a todas las personas que de alguna forma han contribuido en mi superación personal y profesional y que tal vez olvido mencionar.

¡GRACIAS!

RESUMEN

GALINDO MUÑOZ FELIPA: PATOGÉNESIS DE LAS HEMORRAGIAS EN LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE. Tutor principal: Norma Leticia Calderón Apodaca. Comité tutorial: Guillermo Téllez Isaías, Teresa Imelda Fortoul van der Goes.

Para obtener más información acerca de la patogenia de las hemorragias en la enfermedad de Newcastle, se realizaron conteos de células sanguíneas con especial énfasis en los trombocitos en 25 aves libres de patógenos específicos infectadas experimentalmente por instilación ocular con 10^6 DLEP₅₀/ml de una cepa velogénica viscerotrópica del virus de la enfermedad de Newcastle (cepa Chimalhuacán); se incluyeron cinco aves testigos. Las aves se sacrificaron a las 24 horas posinfección (hpi), y posteriormente a intervalos de 12 hpi. Se obtuvieron muestras de sangre completa y tejido de médula ósea, encéfalo, riñón, pulmón y proventrículo; estos últimos fueron evaluados histológica y ultraestructuralmente. Se observó una disminución significativa en el número de trombocitos y necrosis multifocal en la médula ósea a las 72 hpi, así como una disminución en linfocitos y monocitos y un incremento en heterófilos. A las 60 hpi en las células de endotelios vasculares se observó tumefacción y vacuolización principalmente en el pulmón. En la médula ósea se presentó necrosis temprana (48 hpi) de los islotes hematopoyéticos y a las 72 hpi la necrosis fue multifocal. Los tromboplastos mostraron basofilia y vacuolización citoplásmica (60 hpi). Ultraestructuralmente a las 36 hpi, las células granulocíticas exhibieron modificaciones en su membrana sugestivas a partículas virales emergiendo, así como, degeneración mitocondrial y tumefacción del aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso. La necrosis de las células hematopoyéticas inició a las 48 hpi y avanzó progresivamente a una depleción celular severa de los islotes hematopoyéticos, esto fue observado hacia las 72 hpi. Los vasos sanguíneos de la médula ósea presentaron severa tumefacción de las células endoteliales, engrosamiento y degeneración de la membrana basal. Los resultados de este estudio demostraron que el virus de la enfermedad de Newcastle ocasiona daño severo y temprano a las células de los islotes hematopoyéticos en médula ósea, incluyendo las precursoras de los trombocitos, lo que explica la marcada trombocitopenia detectada en estadios iniciales de la enfermedad. Por lo tanto la trombocitopenia y el daño endotelial se consideran las causas principales de las hemorragias.

Palabras clave: Enfermedad de Newcastle, hemorragias, endotelio vascular, trombocitos, médula ósea.

ABSTRACT

GALINDO MUÑIZ FELIPA: PATHOGENESIS OF HAEMORRHAGES IN NEWCASTLE DISEASE. Advised by Norma Leticia Calderón Apodaca, Guillermo Téllez Isaías, Teresa Imelda Fortoul van der Goes.

To obtain more information about the pathogenesis of haemorrhages in Newcastle disease, blood cells counts with special emphasis on thrombocytes were performed in 25 specific pathogen-free chickens experimentally infected by ocular instillation of 10^6 embryo-lethal doses 50% of a velogenic viscerotropic strain of Newcastle disease virus (Chimalhuacan strain). Five control birds were included. Birds were killed at 24 h, followed by 12 h intervals. Whole blood and tissue samples were collected. The aforementioned studies were complemented with histological and ultrastructural evaluation of the bone marrow, brain, kidney, lung and proventriculus. A significant reduction of thrombocyte counts and multifocal necrosis in the bone marrow within 72 hours post infection (hpi) was observed. An increase in heterophils, and decrease in monocytes and lymphocytes, at 72 hpi was detected. Swelling and vacuolization of capillary endothelial cells were observed mainly in the lung at 60 hpi. In the bone marrow early necrosis of haematopoietic islands was presented within 48 hpi. At 72 hpi bone marrow necrosis was multifocal. The thromboblats at 60 hpi exhibited cytoplasmic vacuolation, and basophilia. Ultrastructurally at 36 hpi granulocytic presented modifications in cell membrane suggest viral particles in the process of budding as well as mitochondrial degeneration and swelling of the Golgi complex and rough endoplasmic reticulum. Necrosis of haematopoietic cells started at 48 hpi and progressively advanced to a severe cellular depletion of the haematopoietic islands until 72 hpi. Blood vessels suffered a severe swelling of endothelial cells and thickening and degeneration of the basement membrane. Our studies demonstrated that Newcastle disease virus produces an early and severe damage of the cells of the haematopoietic islands cells including thrombocyte precursors, which explains the marked thrombocytopenia characteristically detected in early stages of this disease. The thrombocytopenia and the endothelial damage are considered the main causes of haemorrhages.

Key words: Newcastle disease, haemorrhages, vascular endothelium, thrombocyte, bone marrow.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
CONTENIDO	V
LISTA DE CUADROS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	IX
1. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	1
1.1 Características generales de la enfermedad de Newcastle.....	1
1.1.1 Definición.....	1
1.1.2 Etiología.....	1
1.1.3 Patogenia y signos clínicos.....	1
1.1.4 Lesiones macroscópicas.....	4
1.1.5 Lesiones microscópicas.....	4
1.2 Otras enfermedades aviares que cursan con hemorragias.....	5
1.3 La célula endotelial y sus funciones.....	6
1.4 El daño al endotelio vascular.....	7
1.5 La trombocitopoyesis y el trombocito.....	8
2. INTRODUCCION.....	11
2.1 Hipótesis.....	13
2.2 Objetivos.....	14
2.2.1 Objetivo general.....	14
2.2.2 Objetivos particulares.....	14
3. MATERIAL Y METODOS.....	15
3.1 Animales de experimentación y alojamiento.....	15
3.2 Propagación y titulación del virus de la enfermedad de Newcastle.....	15

3.3	Diseño experimental.....	15
3.4	Estudio hematológico.....	16
3.4.1	Conteo de trombocitos (método directo).....	16
3.5	Estudio histológico.....	16
3.6	Estudio ultraestructural.....	17
3.7	Estudio virológico.....	17
3.8	Análisis estadístico.....	18
4.	RESULTADOS.....	19
4.1	Signos clínicos.....	19
4.2	Hallazgos a la necropsia.....	19
4.3	Estudio hematológico.....	19
4.4	Estudio virológico.....	20
4.5	Estudio histológico.....	20
4.5.1	Pulmón.....	20
4.5.2	Proventrículo.....	20
4.5.3	Riñón.....	20
4.5.4	Médula ósea.....	21
4.5.5	Encéfalo.....	21
4.6	Estudio ultraestructural.....	21
5.	DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	23
6.	LITERATURA CITADA.....	29

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados del conteo de leucocitos en sangre de aves testigo e infectadas con el virus de la enfermedad de Newcastle.

Cuadro 2. Aislamiento viral y porcentaje de positividad a la hemoaglutinación en aves testigo e infectadas con el virus de la ENC.

Cuadro 3. Porcentaje de aves con lesiones en pulmón después de la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica.

Cuadro 4. Porcentaje de aves con lesiones en proventrículo después de la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica.

Cuadro 5. Porcentaje de aves con lesiones en riñón después de la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica.

Cuadro 6. Porcentaje de aves con lesiones en encéfalo después de la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica.

Cuadro 7. Porcentaje de aves con lesiones en médula ósea después de la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pulmón (36 hpi). Proliferación de tejido conectivo y capilares aéreos, presencia de infiltrado linfocitario perivascular e intersticial multifocal con edema perivascular. HE (250x).

Figura 2. Riñón (60 hpi). Infiltrado linfocitario intersticial y presencia de acúmulos linfoides que desplazan a los túbulos renales, algunos se observan dilatados (flecha). HE (250x).

Figura 3. Encéfalo (72 hpi). Presencia de infiltrado linfocitario perivascular con material hialino en vasos sanguíneos. HE (100x).

Figura 4. Médula ósea (36 hpi). Degeneración de célula endotelial, el núcleo presenta una hinchazón importante (flecha). Azul de toluidina (1000x).

Figura 5. Médula ósea (60 hpi). Células endoteliales con degeneración y fragmentación citoplásmica además de núcleos hinchados (puntas de flecha). Azul de toluidina (1000x).

Figura 6. Médula ósea (36 hpi). Foco de células inmaduras (centro) con degeneración citoplásmica avanzada, vacuolización, necrosis, presencia de prolongaciones y fragmentos citoplásmicos. Azul de toluidina (1000x).

Figura 7. Médula ósea. Células con cromatina densa y vacuolización citoplásmica (punta de flecha). Se observan abundantes restos celulares y en la célula inmadura procesos que sugieren la liberación del virus (flecha). Contraste acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynold's (9,135x).

Figura 8. Médula ósea. Granulocito con modificaciones en la superficie celular (flecha), lo cual sugiere partículas virales emergiendo de la membrana. Estos procesos se encontraron en granulocitos y células inmaduras. Contraste acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynold's (76,000x).

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

ENC	Enfermedad de Newcastle
ARN	Acido ribonucleico
VENC	Virus de la enfermedad de Newcastle
hpi	Horas posinfección
pi	Posinfección
CID	Coagulación intravascular diseminada
IBF	Infección de la bolsa de Fabricio
IAAP	Influenza aviar de alta patogenicidad
IH	Inhibición de la hemoaglutinación
LPE	Libres de patógenos específicos
DLEP₅₀	Dosis letal en embrión de pollo 50 porciento.
SSF	Solución salina fisiológica
LPE	Libres de patógenos específicos
EDTA	Etilendiaminotetracético
HA	Hemoaglutinación

1. REVISIÓN DE LA LITERATURA

1.1 Características Generales de la Enfermedad de Newcastle

1.1.1 Definición

La Enfermedad de Newcastle (ENC) es un padecimiento infeccioso viral específico de las aves, caracterizado por ocasionar mortalidad elevada en 2-15 días después de la infección natural, signos respiratorios y neurológicos, así como lesiones hemorrágicas en el aparato digestivo, acompañadas de otras infecciones intestinales (Lancaster 1981; Kouwenhoven 1993; Alexander 1997).

1.1.2 Etiología

La causa es un Paramixovirus aviar-1 del género Rubulavirus, con genoma de ácido ribonucleico (ARN), demostrable mediante tinción negativa con microscopía electrónica. En secciones finas los viriones se observan como partículas pleomórficas, redondas, de 100-500 nm de diámetro, con una envoltura que consiste en una membrana densa (6 nm de grosor) rodeada por una capa de 12.5 nm. La replicación tiene lugar en el citoplasma de las células infectadas y las partículas virales son liberadas por exocitosis (Cheville et al 1972; Mc Ferran y Mc Cracken 1988; Kingsbury 1991; Alexander 1997).

1.1.3 Patogenia y signos clínicos

En condiciones de infección natural el virus de la Enfermedad de Newcastle (VENC) ingresa por vía oronasal, mediante aerosoles. En vías respiratorias altas el virus se propaga por acción ciliar y fusión de células epiteliales, formando sincicios o células gigantes multinucleadas, lo que se conoce como efecto citopático (Mc Ferran y Mc Cracken 1988; Kouwenhoven 1993).

Los virus aislados se han clasificado en categorías dependiendo de la patogenicidad en el campo, de la severidad de los signos y lesiones, así como la mortalidad que ocasiona el virus:

Doyle o velogénica viscerotrópica (VV): infección aguda y letal en aves de todas las edades; las aves manifiestan indiferencia, taquipnea, debilidad, postración y muerte, edema en cabeza y periorcular, diarrea verde, temblores musculares, tortícolis, parálisis de patas y alas, opistótonos, bradistótonos y epistótonos. La mortalidad alcanza el 100% en aves susceptibles. Se presentan lesiones hemorrágicas en el aparato digestivo, también se conoce como velogénica viscerotrópica y es ocasionada por cepas como Querétaro, Chimalhuacán, CU, Milano y Herts 33.

Beach o velogénica neurotrópica (VN): infección letal en pollos de diversas edades, inicia con un problema respiratorio grave seguido de signos nerviosos después de 1-2 días posinfección (dpi). La diarrea no es frecuente, pero la disminución en la producción de huevo es marcada. La morbilidad puede llegar al 100% y la mortalidad puede ser del 50% en aves adultas y 90% en aves jóvenes, involucra a la cepa Texas.

Los virus de cepas velogénicas pueden encontrarse, en 22 a 44 horas posinfección (hpi), en todos los tejidos; con elevados títulos en timo y bajos títulos en músculo y cerebro. Después de la replicación inicial en el sitio de entrada, los virus velogénicos son llevados por vía hematogena al bazo, hígado, riñón y pulmón y a las 36 hpi comienza a declinar el título viral (Kouwenhoven 1993).

Los virus invaden el cerebro después de replicarse en los tejidos no nerviosos (entre las 60 hpi), con lo cual las aves comienzan a morir. Durante la segunda replicación el virus es liberado al torrente circulatorio, coincidiendo con la aparición de signos generales de la enfermedad y excreción hacia el ambiente por medio de las heces. Los virus de algunas cepas velogénicas viscerotrópicas alcanzan órganos vitales como hígado y riñón ocasionando la muerte de las aves antes de que los signos de la enfermedad se manifiesten (Kouwenhoven 1993).

Los títulos más elevados se encuentran 24-96 horas posinfección (hpi) en los cornetes nasales, de ahí en adelante el título declina, probablemente debido a la formación de anticuerpos al día 5 posinfección (pi), pero el virus está aun presente al día 12 pi. Algunas cepas se replican sólo en el tracto intestinal y son excretadas con las heces. En gran parte la propagación depende de la virulencia de la cepa (Alexander 1997, Kouwenhoven 1993).

Beaudette o mesogénica: ocasiona problemas respiratorios, la producción de huevo disminuye durante varias semanas y los signos nerviosos no son comunes. La mortalidad es elevada en aves muy jóvenes y susceptibles. Los virus pertenecientes a esta presentación pueden utilizarse en revacunaciones a partir de vacunas activas, las cepas relacionadas con esta presentación son: Roakin, Haifa-komarov, Krananueid, cepa H y Mukteswar.

Las cepas mesogénicas se propagan en riñón, pulmón, bolsa de Fabricio y bazo, y son capaces de producir enfermedad respiratoria primaria, pero en pollos jóvenes pueden ocasionar enfermedad letal por afección del sistema nervioso central. (Kouwenhoven 1993).

Hitchner o lentogénica: generalmente afecta aves jóvenes y susceptibles presentándose signos respiratorios graves que pueden complicarse con colisepticemia o aerosaculitis ocasionando mortalidad y decomisos. Los virus pertenecientes a esta presentación se emplean en la elaboración de vacunas activas e incluye a las cepas F (Asplin), Hitchner B1, La Sota y Clon 30 y llegan a ocasionar signos respiratorios moderados como respuesta posvacunal (Alexander 1997, Kouwenhoven 1993, Lancaster 1981).

Entérica o asintomática: se caracteriza por la presencia de infecciones intestinales y respiratorias con virus del patotipo lentogénico que no ocasionan enfermedades aparentes, en esta presentación las cepas involucradas son: Ulster 2C, V4, Queensland y VG/GA (Kouwenhoven 1993).

1.1.4 Lesiones macroscópicas

En infecciones por cepas velogénicas viscerotrópicas a la necropsia se observan lesiones hemorrágicas en la unión del esófago con proventrículo y proventrículo con molleja, la mitad posterior del duodeno, yeyuno e ileón, en particular en la mucosa. Estas hemorragias pueden evolucionar a inflamaciones fibrinonecróticas, posteriormente a necrosis y ocasionalmente se desarrollan úlceras. En casos severos, las hemorragias están presentes en piel, músculos, laringe, tejidos peritraqueales y esofagales, membranas serosas, tráquea, pulmones, sacos aéreos, pericardio y miocardio. En gallinas de postura las hemorragias se presentan en los folículos ováricos (Kouwenhoven 1993; Alexander 1997).

1.1.5 Lesiones microscópicas

Las lesiones observadas después de infecciones con cepas velogénicas viscerotrópicas pueden deberse a cuatro mecanismos: necrosis difusa de las células fagocíticas mononucleares, lisis intravascular de eritrocitos y subsecuente eritrofagocitosis, focos de necrosis en tejidos parenquimatosos e hiperemia y edema general en todos los tejidos intersticiales. Al parecer la mayoría de las lesiones hemorrágico-necróticas intestinales se presentan en los agregados linfoides, sin embargo, descripciones detalladas de la naturaleza y desarrollo de estas aún no han sido publicadas. Otras lesiones observadas incluyen hialinización de capilares y arteriolas, trombos hialinos y necrosis de células endoteliales con la presencia de vasculitis (Cheville et al 1972; Mc Ferran y Mc Cracken 1988; Alexander 1997).

En el curso de la ENC, además de hemorragias múltiples se presenta trombosis en diversos órganos y tejidos. (Ojok y Brown 1996, Alexander 1997). Cabe mencionar que la hemostasia como respuesta normal a daño vascular, involucra vasoconstricción, edema tisular, activación de la cascada de la coagulación y trombosis (formación de un coágulo sanguíneo in situ), adherencia y agregación plaquetaria, así como la participación de elementos celulares del sistema monocito-macrófago y funciones de las células endoteliales. La trombosis es un elemento determinante durante la hemostasia pero en

ocasiones es responsable de morbilidad y mortalidad significativa, ya que puede producir disminución o pérdida de la irrigación en un órgano y efectos sistémicos marcados (Benditt et al 1988).

1.2 Otras enfermedades aviares que cursan con hemorragias

En mamíferos la presencia de hemorragias y trombosis diseminada puede ser considerada como sugestiva de coagulopatía por agotamiento de los factores de coagulación (Robinson y Grant Maxie 1993). Esta condición se presenta en enfermedades sistémicas graves en las que se activan los mecanismos de coagulación que resultan en la formación de microtrombos en arteriolas y capilares y se designa como coagulación intravascular diseminada (CID) (Bick 1988, Bithell 1993, Cotran et al 1994, Wyers 1985). Durante el curso de la CID, se agotan las plaquetas de la sangre así como los factores de la coagulación, el fibrinógeno se polimeriza en los capilares y aunque se activa el sistema fibrinolítico, el exceso de fibrina no puede ser eliminado (Bick 1988, Jobin 1995, Robinson y Grant Maxie 1993, Feldman 1981).

En aves con infecciones virales o bacterianas generalizadas, las hemorragias pueden resultar de coagulación intravascular diseminada, ya que se ha observado la formación de microtrombos en ambos tipos de infección, pero la destrucción directa del endotelio por agentes infecciosos, como sucede en la enteritis viral de los patos y en otras enfermedades también es factible (Gagel et al 1970; Nam- Yong 1982; Skeeles et al 1980, Leibovitz 1997). En la infección de la bolsa de Fabricio (IBF) en la que se observan hemorragias en el músculo pectoral y muslos, se mencionan trastornos de la coagulación o coagulopatías por disminución de los factores II, V y VII posiblemente por una CID, los tiempos de tromboplastina tisular y de coagulación se prolongan y hay marcada diátesis hemorrágica. Otros factores involucrados pueden ser los complejos antígeno-anticuerpo, productos de la inflamación y endotoxinas (Skeeles et al 1980).

La muerte de las aves en influenza aviar por virus de alta patogenicidad (IAAP) involucra necrosis tisular generalizada, colapso cardiovascular, necrosis generalizada de endotelios vasculares, vasculitis, trombosis y CID, esta última no bien descrita (Mo et al

1997). En casos de cólera aviar se ha demostrado el depósito de fibrina intravascular en arterias, venas y capilares, por medio de evaluación histológica (Nam-Yong P 1982).

Sin embargo no se tiene información precisa sobre el mecanismo de las coagulopatías presentes durante estas enfermedades, ni se ha evaluado el grado de trombocitopenia y el daño a la médula ósea. Lo mismo ocurre con otros padecimientos que cursan con hemorragias como la enfermedad de Newcastle, anemia infecciosa y hepatitis por cuerpos de inclusión.

La investigación sobre la patogenia de las hemorragias en enfermedades aviares que cursan con esta manifestación es escasa o inexistente, sobre todo por que el sistema de coagulación de la sangre en las aves difiere de los mamíferos en ciertos aspectos. En las aves la coagulación depende del sistema de coagulación extrínseca donde participa la liberación de tromboplastina tisular y puede ser valorada junto con la coagulación usando el tiempo de protrombina. La hemostasia por vía intrínseca en las aves se ha descrito como un mecanismo de escasa importancia en la coagulación ya que el plasma de las aves carece de tromboplastina (factor IX) y el factor de Hageman (XII) o no lo contiene en cantidades significativas (Doerr y Hamilton 1981, Stopforth 1970, Campbell y Coles 1989).

1.3 La célula endotelial y sus funciones

El endotelio vascular es de importancia debido a las numerosas funciones que realiza. Barrera permeable, producción de agentes antitrombocíticos (prostaciclina PGI₂ y metabolitos de adenina), producción de agentes protrombocíticos (factor VII, von Willebrand), producción de anticoagulantes (trombomodulina y otras proteínas), producción de agentes fibrinolíticos (activador de plasminógeno tisular, factor similar a urokinasa), producción de procoagulantes (factor tisular, factor activador/inhibidor de plasminógeno, factor V), producción de mediadores inflamatorios (interleucina 1), presentación de receptores para el factor IX (X, lipoproteínas de baja densidad y modificadas, trombina), replicación y producción de factores de crecimiento (factor estimulador de colonias de células sanguíneas, factor de crecimiento similar a insulina,

factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento derivado de las plaquetas) e inhibidores de crecimiento como la heparina (Benditt et al 1988, Cotran et al 1994).

1.4 El daño al endotelio vascular

La vasculitis definida como inflamación y necrosis de los vasos sanguíneos afecta arterias, venas y capilares. Las arterias o venas pueden ser dañadas por agentes infecciosos, traumatismos mecánicos, radiación o toxinas. Sin embargo en muchos casos de vasculitis no hay etiología específica conocida o esta asociada a enfermedades sistémicas primarias (Johnson et al 1988; Benditt et al 1988, Cotran et al 1994).

Se piensa que en la etiología y patogénesis de la vasculitis están involucrados mecanismos inmunológicos incluyendo el depósito de complejos inmunes (depósito local de antígeno viral, inmunoglobulinas y componentes del complemento), ataque directo a las células endoteliales por anticuerpos circulantes en varias formas de inmunidad mediada por linfocitos T citotóxicos CD8+. Existe evidencia de que algunos virus pueden ocasionar vasculitis, sin embargo los agentes responsables de provocar la respuesta inmune son desconocidos (Johnson et al 1988; Benditt et al 1988, Cotran et al 1994).

Al ocurrir daño endotelial se inicia la hemostasia durante la cual las paredes adyacentes de los vasos sanguíneos se contraen y un tapón hemostático se forma mediante la adhesión y agregación de plaquetas sanguíneas, contribuyendo a su consolidación el mecanismo de la coagulación sanguínea (Sturkie 1986). La sangre aviar carece de plaquetas, y su papel en la formación del tapón es asumido por trombocitos (Grant y Zucker 1973).

En las enfermedades virales donde existe daño a las células endoteliales, se expone el tejido conectivo subendotelial el cual actúa como un factor de agregación plaquetaria. Así mismo, la necrosis endotelial constituye una fuente de tromboplastina tisular y de otros factores procoagulantes (Debbie y Abelseth 1971; Robinson y Grant Maxie 1985; Jobin 1995).

1.5 La trombocitopoyesis y el trombocito.

La eritropoyesis ocurre dentro de los senos vasculares de la médula ósea, mientras que la granulocitopoyesis y la trombocitopoyesis se llevan a cabo fuera de estos. En cortes histológicos, el desarrollo de los granulocitos es fácilmente observado debido a la presencia de gránulos eosinófilos comunes en el citoplasma de los heterófilos que poseen las aves.

Campbell (1967) citado por Schalm (1975), describe que la pared de los senos vasculares está formada por células elongadas y alineadas, que carecen de membrana basal y poseen un endotelio discontinuo que permite el paso de los granulocitos a la circulación. Las células eritroides inmaduras parecen estar adheridas a la pared de los senos, mientras que las células más maduras que contienen hemoglobina se localizan en el área central del lumen.

La médula ósea de las aves no tiene las células poliploides gigantes de los mamíferos (megacariocitos), pero sí una línea de células mononucleares grandes productoras de trombocitos maduros los cuales realizan la misma función durante la hemostasia y la coagulación sanguínea que las plaquetas sanguíneas anucleadas de los mamíferos (Schalm et al 1975). Archer (1986) citado por Sturkie (1986) menciona que las células precursoras de los trombocitos pueden ser multinucleadas.

Los trombocitos se forman en la médula ósea, bazo e hígado durante la vida embrionaria, y en las aves adultas, la médula ósea es el principal punto donde se originan. La serie trombocítica inicia con el tromboplasto, célula redonda o ameboide con un borde estrecho de citoplasma basófilo alrededor del núcleo, el cual es redondo con cromatina punteada y nucléolo. Después se clasifican como trombocitos inmaduros tempranos, intermedios, tardíos y trombocitos maduros (Traill et al 1983; Janzarik y Morgenstern 1979; Campbell 1992).

El trombocito inmaduro temprano es una célula grande, redonda u ovalada, con citoplasma basófilo vacuolado y un núcleo con cromatina agrupada. El trombocito inmaduro intermedio es ligeramente alargado o irregular y tiene citoplasma vacuolado,

azul claro que puede contener gránulos específicos; su núcleo muestra un enrollamiento exagerado de la cromatina. El trombocito inmaduro tardío tiene forma de óvalo y es un poco más pequeño que un eritrocito; el citoplasma es azul pálido, con áreas de rarefacción no bien definidas y su núcleo es redondo con masas de cromatina aglomerada; semejante al núcleo de un linfocito. Suele haber gránulos eosinófilos específicos situados en uno de los polos de la célula (Campbell 1992).

El trombocito maduro normal mide de 3-4 μ m de ancho por 7-10 μ m de largo, es una célula ovalada, con núcleo grande que tiene cromatina densa y aglomerada; el citoplasma es claro, no homogéneo, con aspecto reticulado y uno o más gránulos eosinófilos en los polos. En frotis de sangre periférica los trombocitos se agrupan, lo que facilita su identificación (Janzarik y Morgenstern 1979; Campbell 1992).

Cuando hay pérdida de sangre los gránulos específicos que contienen los trombocitos se rompen, se agrupan o su núcleo se hace picnótico y las células degeneran. El ritmo de agregación de los trombocitos es mucho más lento que el de las plaquetas, tienen pseudópodos y están en constante movimiento (Campbell y Coles 1989).

Los trombocitos son considerados como los fagocitos inespecíficos primarios en la sangre de las aves y en cantidad son tres veces más abundantes que otros fagocitos circulantes juntos. Asimismo engloban, fagocitan microorganismos y tienen la capacidad de liberar fosfatasa ácida tan rápido como los heterófilos y macrófagos, por lo que han sido considerados como pequeños linfocitos. En las aves adultas, los trombocitos, son más activos que en las aves jóvenes (Chao-Fu et al 1979, Traill et al 1983).

El recuento normal de trombocitos en las aves es de 20,000 a 30,000/ μ l de sangre. Se puede observar trombocitopenia en las infecciones graves, en coagulación intravascular diseminada y en las leucemias. El tiempo de supervivencia de los trombocitos es de 8-11 días en la circulación (Campbell 1992, Campbell y Coles 1989, Sturkie 1986).

No se ha demostrado que el virus de la ENC infecte a los trombocitos o a sus precursores, pero es posible que esto ocurra, debido a la patogenia descrita para este

agente (Alexander 1997; (Ojok y Brown 1996). Se ha observado que el virus de la ENC puede infectar diversos tipos de células mononucleares de sangre periférica provocándoles necrosis y degeneración, lo que conduce a la apoptosis (Lam 1996). Tal vez en los trombocitos ocurra lo mismo debido a la actividad fagocítica inespecífica que llevan a cabo (Chao-Fu y Hamilton 1979; Traill et al 1983).

El hecho de que el virus esté presente en la médula ósea, como se ha encontrado en estudios mediante inmunohistoquímica, (Ojok y Brown 1996) sugiere que también se infectan las células precursoras de los trombocitos, lo cual provoca un retardo en la formación de estos y por consiguiente una trombocitopenia que interfiere con el mecanismo de hemostasis dado como respuesta al daño endotelial, favoreciendo la presencia de hemorragias en diversos órganos. Esto en mamíferos utilizando modelos experimentales como el virus de la Fiebre Porcina Clásica (Calderón 1998), está documentado pero en el caso de las aves es objeto de estudio.

Debido a que los virus pueden ocasionar daño al endotelio vascular y que el origen celular de los trombocitos se lleva a cabo en la médula ósea, esta ofrece una prospectiva de estudio en la ENC para determinar el posible origen de las hemorragias en la infección aguda, orientando los estudios sobre los mecanismos patogénicos involucrados, entre ellos la relación entre una trombocitopenia y el daño a las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

2. INTRODUCCIÓN

Las hemorragias petequiales y equimóticas son hallazgos comunes en algunas enfermedades aviares, sin embargo la patogenia de estas hemorragias ha sido poco estudiada. Estas pueden ser debido a una aplasia de la médula ósea, por coagulopatías, pérdida de factores de la coagulación, o como consecuencia de coagulación intravascular diseminada y microtrombos como ya se ha descrito en otras infecciones virales, como influenza aviar (Gagel et al 1970; Mo et al 1997), en la enfermedad infecciosa de la bolsa (Skeeles et al 1980) y también en la anemia infecciosa aviar. Aunque la posibilidad de destrucción directa del endotelio por agentes infecciosos en algunas de estas enfermedades infecciosas debe ser considerada (Riddell 1996).

En la enfermedad de Newcastle, se menciona que estas hemorragias son debido al efecto destructivo del virus hacia las células endoteliales, ya que, se observa hiperemia, edema y hemorragias (Cheville et al 1972). Usualmente ocasiona lesiones severas y generalizadas en los vasos sanguíneos de varios tejidos y órganos. Las lesiones están asociadas a degeneración hídrica de la capa media, hialinización de capilares y arteriolas, trombosis hialina en pequeños vasos y necrosis de células endoteliales (Cheville et al 1972; Kouwenhoven 1993; Alexander 1997). La necrosis celular se caracteriza por una rápida hinchazón de las células, lisis celular y respuesta inflamatoria y la apoptosis por una contracción, condensación y fragmentación del DNA, las células apoptóticas son reconocidas y englobadas por fagocitos rápidamente, esto evita una respuesta inflamatoria (Wyllie 1987; Cohen 1991; Lam 1996).

Diversas enfermedades virales causan extenso daño endotelial y cuando los vasos sanguíneos son lesionados el tapón hemostático que se forma es constituido por trombocitos. Estas células se encuentran presentes en la sangre de los vertebrados no mamíferos, son derivadas de células precursoras mononucleares localizadas en la médula ósea y tienen actividad fagocítica (Grant y Zucker 1973; Chao-Fu y Hamilton 1979; Traill et al 1983, Sturkie 1986). De aquí la importancia de estas células ya que intervienen tanto en la respuesta de hemostasia, que previene las hemorragias, como a eliminar de manera inespecífica las partículas infecciosas y no infecciosas que están en el organismo. No obstante, Información acerca de la relación entre la trombocitopenia y la

posible supresión de la trombocitopoyesis en la médula ósea, como consecuencia de una infección por el virus de la enfermedad de Newcastle es escasa.

En estudios de patogenicidad con otras enfermedades virales tales como, anemia infecciosa, en la cual se detecta depleción de trombocitos, se sugiere que las lesiones hemorrágicas están estrechamente relacionadas con la disfunción de la médula (Taniguchi et al 1982, 1983; Adair 2000) y en influenza aviar como consecuencia de coagulación intravascular diseminada y microtrombos (Gagel et al 1970; Mo et al 1997). Sin embargo, en esta última no se realizaron conteos del número de trombocitos presentes en las aves infectadas ni se estudiaron las lesiones en la médula ósea.

En las aves la trombocitopenia es indicativa de una demanda periférica excesiva de trombocitos, sin embargo una depleción trombocitopoyética en la médula ósea debe considerarse (Campbell 1994). A este respecto, cabe mencionar que el virus de la enfermedad de Newcastle está asociado con necrosis extensa de los islotes hematopoyéticos en la médula ósea (Ojok and Brown 1996) y trombocitopenia (Cheville et al 1972) en infecciones experimentales. No obstante, la relación que existe entre la trombocitopenia y el daño a nivel ultraestructural de las células hematopoyéticas en la médula ósea no ha sido evaluado. Por otro lado se tiene conocimiento que en la fase aguda de la fiebre porcina clásica las hemorragias están relacionadas con la presencia de trombocitopenia, la cual es ocasionada por una disminución en la capacidad de los megacariocitos para producir plaquetas (Calderón et al 1998).

Por lo tanto el objetivo de las evaluaciones hematológica, histológica y ultraestructural presentadas en este trabajo fue determinar si el daño ocasionado por el virus de la ENC a las células precursoras de los trombocitos, representa un factor patogénico importante para la presentación de la trombocitopenia en esta enfermedad, que favorezca la presencia de hemorragias en diversos órganos.

2.1 Hipótesis

En la enfermedad de Newcastle al infectarse las células hematopoyéticas, entre ellas las precursoras de los trombocitos en la médula ósea, se produce una trombocitopenia aguda que asociada al daño de los endotelios vasculares, favorece la presencia de hemorragias.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Determinar el origen de las hemorragias en la ENC mediante estudios hematológicos y estudios de microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión, evaluando las lesiones en los endotelios vasculares y en las células hematopoyéticas precursoras de los trombocitos, localizadas en la médula ósea.

2.2.2 Objetivos Particulares

1. Comprobar la presencia del virus de la ENC en pulmón, riñón, proventrículo, encéfalo y médula ósea, por medio del reaislamiento viral.
2. Investigar mediante determinación de las cuentas trombocíticas el grado de trombocitopenia en aves infectadas con el VENC.
3. Evaluar el daño ocasionado por el VENC, en células endoteliales y células precursoras de los trombocitos en la médula ósea, utilizando microscopía óptica y electrónica.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Animales de experimentación y alojamiento.

Los estudios se realizaron en 30 aves Leghorn, libres de patógenos específicos (LPE)¹ de 6 semanas de edad y de sexo indistinto. Antes de iniciar el experimento se constató la ausencia de anticuerpos contra la ENC, en el suero de las aves, mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) (Beard 1989). Las aves infectadas así como las testigos se alojaron en diferentes unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo condiciones controladas y recibieron alimento comercial y agua a libre acceso.

3.2 Propagación y titulación del VENC.

Se utilizó la cepa velogénica viscerotrópica Chimalhuacán del virus de la ENC² que fue propagado en embrión de pollo LPE de 9 días de edad, inoculando 0.2 ml del virus por embrión, vía cavidad alantoidea. Se descartaron los embriones muertos a las 24 y 36 hpi (horas posinfección) y a las 72 hpi se colectó el líquido alantoideo para su posterior titulación en embriones de pollo LPE, realizando 9 diluciones 1:10 infectando 5 embriones por dilución (CFR 1975).

3.3 Diseño experimental.

Las 30 aves fueron divididas en 6 grupos identificados como grupo T (testigo) y grupos 1 al 5 (infectadas). Cada grupo estuvo constituido por 5 aves. Las aves de los grupos 1 al 5 se infectaron al mismo tiempo con una dosis de 0.2 ml del virus de la ENC con un título de 10^6 DLEP₅₀/ml, cepa Chimalhuacán velogénica viscerotrópica, por vía

¹ ALPES, Aves Libres de Patógenos Específicos, 7 Norte No. 356, Tehuacán Puebla, 75700.

² Donada por Laboratorios de Investigación Aplicada, SA de CV, 7 Norte No. 356, Tehuacán Puebla, 75700.

ocular, a la sexta semana de edad. Las 5 aves del grupo testigo solo fueron inoculadas con solución salina fisiológica (ssf), por la misma vía y dosis que los grupos infectados. Durante el período experimental las aves se observaron diariamente para detectar signos clínicos característicos de la enfermedad.

3.4 Estudio hematológico.

Con el propósito de realizar el hemograma, se obtuvo sangre completa de las 30 aves antes de la inoculación viral (parámetro basal) y a los 6 grupos de aves a diferentes intervalos después de la infección: 24 hpi (grupo 1), 36 hpi (grupo 2), 48 hpi (grupo 3), 60 hpi (grupo 4) y 72 hpi (grupo 5), incluyendo al grupo testigo.

Se le extrajo a cada ave 1 ml de sangre mediante punción venosa en la vena radial. La muestra se colocó en tubos de ensayo conteniendo sales de etilendiaminotetracético (EDTA) en proporción de 1:10 que se utilizó para el conteo trombocítico mediante el método directo y para realizar el hemograma completo utilizando la tinción de Wright y métodos de conteo establecidos. Para determinar la cantidad de proteínas totales y fibrinógeno se utilizó la técnica mencionada por Campbell y Coles (1989).

3.4.1 Conteo de trombocitos (método directo): se elaboró un frotis sanguíneo, tiñéndolo con Wright, a partir del cual se contaron los trombocitos presentes en 5 campos, utilizando un objetivo de inmersión y aplicando la siguiente fórmula (Campbell 1992) para determinar la cantidad total:

No. Trombocitos (en 5 campos) /1,000 x 3,500,000= Número de trombocitos / μ l de sangre.

3.5 Estudio histológico.

Posterior a la toma de muestra para los estudios hematológicos se procedió al sacrificio de las 5 aves por cada intervalo de tiempo, así como un ave testigo, esto se realizó mediante una sobredosis de anestesia parenteral (pentobarbital sódico). De cada

animal sacrificado se extrajo médula ósea de la porción proximal del fémur para ser fijada en formalina al 10%, amortiguada a pH de 7.2. Las muestras fueron incluídas en parafina y cortadas a 4 micrómetros de espesor para su posterior tinción con las técnicas de hematoxilina-eosina y Giemsa. Para el estudio de los endotelios vasculares se tomaron muestras de proventrículo, pulmón, riñón y encéfalo, las cuales se procesaron con la misma técnica (Prophet et al 1995)

3.6 Estudio ultraestructural.

Las muestras de médula ósea y los demás tejidos para microscopía electrónica de transmisión fueron obtenidas simultáneamente con las de los estudios histológicos. Para este estudio sólo se procesaron los tejidos de 2 aves de las 5 que se sacrificaron. Las muestras se fijaron durante 2 horas con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio, pH 7.4 y fueron seccionadas en fragmentos de 3 a 5 mm de diámetro, posfijadas en tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas, deshidratadas en series de alcoholes e incluídas en Araldita. Se obtuvieron cortes semifinos de 90 nm de espesor que fueron teñidos con solución acuosa al 1% de azul de toluidina y se observaron al microscopio óptico, para identificar secciones con presencia de células precursoras de los trombocitos en el caso de la médula ósea y de endotelios vasculares en el caso de los demás órganos. Los cortes finos de 60 nm fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynold's para ser observados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109.

3.7 Estudio virológico.

Para confirmar la presencia del virus de la ENC en los diferentes tejidos (pulmón, riñón, proventrículo, encéfalo y médula ósea) se procedió a su reaislamiento, en embrión de pollo de 9 días de edad. Posterior al procesamiento de las muestras, las cuales fueron tomadas de manera simultánea a las de los estudios histológicos y ultraestructurales, los fluidos obtenidos se inocularon, por órgano, en 5 embriones los cuales fueron observados con ovoscopio durante 7 días para descartar la mortalidad inespecífica a las 24 horas

posinoculación (hpi). De los embriones muertos antes y a las 72 hpi se realizó la prueba de hemoaglutinación (HA) en placa, utilizando una suspensión de glóbulos rojos de ave al 2%, para comprobar la presencia del virus, así como de los embriones que no murieron en el período establecido para la prueba (NOM-013-ZOO-1994; OIE 1996).

3.8 Análisis estadístico.

Para las 30 aves del estudio, se tomaron los parámetros del hemograma comparativos respecto a los valores previos a la infección, se evaluaron los parámetros individuales y se determinó su significancia mediante la prueba t de Student pareada. A los resultados obtenidos en el reaislamiento viral se les aplicó χ^2 (Statgraphics 1998).

4. RESULTADOS

4.1 Signos clínicos.

Los signos clínicos en las aves infectadas a las 24 hpi consistieron en estornudos y lagrimeo. Hacia las 36 hpi e intervalos siguientes se observó depresión, anorexia, letargia, diarrea e incoordinación. Las aves del grupo testigo no manifestaron ningún signo de la enfermedad.

4.2 Hallazgos a la necropsia.

A la necropsia de las aves se observaron principalmente lesiones hemorrágicas de tipo petequeal en proventrículo y exudado mucoso en la tráquea.

4.3 Estudio hematológico

En la cuenta de trombocitos se observó una ligera disminución hacia las 36 hpi pero a las 48 hpi se incrementó la cuenta para posteriormente presentarse una disminución evidente hacia las 72 hpi ($p < 0.05$). La reducción en el número de trombocitos respecto al grupo testigo fue de casi el 50% en las aves sangradas a las 72 hpi (Cuadro 1).

Los resultados obtenidos en el hemograma mostraron cambios significativos en comparación con el grupo testigo en los valores de linfocitos observándose un aumento en el número hacia las 48 hpi (linfocitosis) y disminución a las 60 y 72 hpi ($p < 0.05$). En relación con la cuenta de heterófilos a las 60 hpi y 72 hpi se observó incremento significativo ($p < 0.05$). El conteo de monocitos indicó un ligero aumento en el número a las 24 hpi pero su disminución fue gradual y significativa ($p < 0.05$) hacia las 72 hpi (Cuadro 1).

En la cuenta de basófilos y eosinófilos no se encontró diferencia significativa, así como en los valores de hematócrito, proteínas plasmáticas y fibrinógeno.

4.4 Estudio virológico.

Los resultados del reaislamiento del virus de la ENC se muestran en el cuadro 2 observándose un porcentaje de positividad a la hemoaglutinación significativo a las 48 hpi a partir de pulmón, riñón, proventrículo y médula ósea ($p < 0.05$). En las muestras procedentes de las aves sacrificadas a las 60 hpi y 72 hpi, el porcentaje alcanzó el 100% en todos los órganos, observándose una diferencia altamente significativa con relación al grupo testigo ($p < 0.005$).

4.5 Estudio histológico.

Las lesiones histológicas observadas en pulmón, riñón, encéfalo y proventrículo, fueron las siguientes:

4.5.1 Pulmón: Infiltrado linfocitario perivascular, hacia bronquios terciarios e intersticial multifocal de ligero a moderado (36 hpi en adelante), hiperplasia nodular linfoide en parénquima y bronquios terciarios con proliferación de tejido conectivo y capilares aéreos (48 y 60 hpi), daño a endotelios vasculares caracterizado por hinchamiento de células endoteliales y degeneración hialina, focos de hemorragia y edema perivascular a las 72 hpi (Cuadro 3, Figura 1)

4.5.2 Proventrículo: Hiperplasia linfocitaria en la unión esófago-proventrículo (36 hpi), infiltrado linfocitario (48 hpi) y heterofílico (60 hpi) en la mucosa de ligero a moderado, descamación abundante (48 hpi), hemorragias y necrosis en las células de la mucosa y submucosa a las 60 y 72 hpi (Cuadro 4)

4.5.3 Riñón: Proliferación celular moderada en algunos glomérulos renales, engrosamiento de la cápsula de Bowman (48, 60 y 72 hpi), infiltrado linfocitario perivascular e intersticial multifocal ligero, presencia de acúmulos linfoides (48 y 60 hpi) e infiltración heterofílica intersticial en túbulos colectores a las 60 y 72 hpi (Cuadro 5, Figura 2)

4.5.4 Médula ósea: Presencia de acúmulos linfoides, infiltración linfocitaria perivascular, disminución de la línea granulocítica y la cantidad de células blásticas, focos de necrosis y degeneración celular con presencia de material de fibrina, algunos focos de proliferación de tejido conectivo ligero y focos de hemorragia de las 48 hpi en adelante (Cuadro 7).

4.5.5 Encéfalo: Infiltración linfocitaria perivascular de ligera a moderada, daño a endotelios vasculares, vasos sanguíneos con material hialino, gliosis, degeneración de mielina en la sustancia blanca del cerebelo y hemorragias focales ligeras a las 72 hpi (Cuadro 6, Figura 3).

4.6 Estudio ultraestructural.

La observación y evaluación de los cortes semifinos con microscopía de luz revelaron a las 24 hpi una relativa disminución de la línea celular granulocítica, con presencia de núcleos desnudos y detritus celulares; otras células mostraron vacuolización citoplásmica y pérdida de su estructura a las 36 hpi (figura 6).

A partir de las 48 hpi y hasta las 72 hpi se observó una marcada degeneración de las células hematopoyéticas. Los eritrocitos fueron más evidentes que otras líneas celulares. En vasos sanguíneos se observó degeneración de la membrana basal, la cual tenía aspecto engrosado. Las células endoteliales presentaban núcleos vesiculares (hinchados), edema perinuclear, así como vacuolización y fragmentación citoplásmica (Figuras 4 y 5)

A las 24 hpi la microscopía electrónica mostró células con citoplasma y cromatina densos, esto asociado a muerte celular. Algunas células presentaron degeneración

citoplásmica con presencia de vacuolas y núcleos picnóticos. En algunas otras se observaron núcleos vesiculares con cromatina dispersa y fragmentación citoplásmica.

A las 36 hpi se observó disminución en la población de eritrocitos y aumento de granulocitos, así como, franca degeneración y necrosis celular con presencia de abundantes detritus. Algunas células granulocíticas presentaban proyecciones citoplásmicas, núcleos vesiculares, degeneración mitocondrial y dilatación evidente del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico rugoso (figuras 7 y 8). Por otro lado se observaron partículas electrodensas entre los detritus celulares.

En las 48 hpi y hasta las 72 hpi se encontró además de depleción marcada de diversas líneas celulares, lo cual dificultó la identificación de las células, vesículas conteniendo un cuerpo electrodenso en el citoplasma de células mononucleares, así como, edema perinuclear evidente y persistencia de la dilatación del aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso.

5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los signos observados en este estudio coinciden con lo mencionado en la literatura (Cheville *et al* 1972; Lancaster 1981; Mc Ferran y Mc Cracken 1988; Parede y Young 1990; Kouwenhoven 1993; Alexander 1997); a este respecto sólo hubo variación en cuanto al tiempo en el que comenzaron a manifestarse, ya que a las 24 y 36 hpi las aves presentaron signología respiratoria, estomudo, conjuntivitis y a las 48 hpi se observó depresión generalizada. Contrario a lo mencionado en estudios donde se encontró que las aves parecían clínicamente normales a las 24 hpi y después de este tiempo (48-96 hpi) se presentó la conjuntivitis y depresión (Ojok y Brown 1996).

Es importante mencionar que en este estudio las aves no manifestaron signología nerviosa en ningún momento. Lo anterior puede atribuirse a la diferencia entre patogenicidad y virulencia que existe entre las cepas utilizadas en los estudios realizados por otros investigadores, (americanas Texas, Fontana 1083, GB; indonesa ITA; alemanas W8f 78, Ch 56, 05/93, entre otras) aunque ambas tengan una presentación velogénica viscerotrópica (Kingsbury 1991; Alexander 1997).

Los hallazgos hematológicos coinciden con lo descrito por Ergene *et al* (1988) sólo que este autor encontró basopenia, probablemente también, debido a esta diferencia en virulencia que existe entre los aislamientos (Kingsbury 1991; Alexander 1997), ya que estas células tal vez no tengan receptores para que el virus se fije a su membrana y las infecte. Cheville *et al* (1972) reporta trombocitopenia y en este estudio se detectó trombocitosis a las 48 hpi, seguida por una marcada trombocitopenia a las 72 hpi.

La trombocitosis puede reflejar una respuesta de rebote después de destrucción masiva de trombocitos o una recuperación de otras condiciones que involucren excesiva utilización de trombocitos, como sucede en infecciones virales donde hay daño endotelial considerable y como se observó en este estudio. Las trombocitopenias son por lo general indicativas de una demanda periférica excesiva de trombocitos, sin embargo, una supresión trombocitopoyética en la médula ósea debido a daño por el virus debe ser considerada (Campbell 1994). Ambas condiciones pueden haber sucedido en este caso.

Ojok y Brown (1996) encontraron daño severo en médula ósea y detectaron la presencia de partículas virales, asociadas con necrosis celular extensa en los islotes hematopoyéticos. En este estudio la disminución significativa en el número de trombocitos fue consistente con lo observado en las biopsias secuenciales de la médula ósea que se evaluaron, las cuales mostraron una degeneración progresiva de los tromboplastos y de otras líneas celulares como los granulocitos.

Calderón et al (1998) describe que en algunas enfermedades virales de mamíferos que cursan con hemorragias, como sucede en la fiebre porcina clásica aguda, la trombocitopenia es resultado de una degeneración progresiva y necrosis de los megacariocitos, los cuales son infectados por el virus.

En nuestro trabajo la trombocitopenia se hizo evidente a las 72 hpi, considerando que existe daño directo de la trombocitopoyesis, como se observó en los estudios histológico y ultraestructural realizados, donde se encontraron focos de necrosis celular en la médula ósea a partir de las 48 hpi, los cuales se hicieron más evidentes a las 60 y 72 hpi, con numerosos detritus celulares y proliferación de tejido conectivo.

Comparado con lo encontrado en un estudio realizado por Ojok y Brown (1996), quien utilizó la cepa velogénica viscerotrópica del vENC Fontana 1083, sólo hubo diferencia en el tiempo de presentación de las lesiones, ya que, estas se presentaron en los islotes hematopoyéticos a las 96 hpi y hasta las 120 hpi se observó necrosis multifocal coalescente con pérdida de la estructura celular y abundantes detritus.

La linfocitosis es esperada después de una estimulación antigénica asociada con infecciones virales, así como, las linfopenias que han sido descritas durante el curso de ciertas enfermedades virales agudas como en este caso. La heterofilia generalmente es relacionada con la magnitud o severidad del proceso inflamatorio (Campbell 1994), aunque en esta evaluación el aumento en el número de heterófilos a las 60 y 72 hpi no correspondió con lo observado en la evaluación histológica y ultraestructural de la médula ósea.

La diferencia probablemente se debió a que las aves presentaron una hematopoyesis extramedular en hígado, riñón y tractogastrointestinal, ya que, estos órganos asumen la producción de células sanguíneas (en especial heterófilos y eritrocitos) cuando hay daño severo en médula ósea (Ridell 1996).

En este estudio la linfopenia se detectó a las 72 hpi, lo cual fue indicativo de daño severo en los tejidos linfoides. Esto fue corroborado con la evaluación histológica. La monocitopenia gradual observada a partir de las 36 hpi, puede estar relacionada con la capacidad del virus para infectar diferentes tipos de células, ocasionándoles degeneración y necrosis. Lam (1996) detectó que el virus de la enfermedad de Newcastle inducía apoptosis principalmente en células mononucleares de sangre periférica, macrófagos y linfocitos. Probablemente los trombocitos también son afectados debido a la función fagocítica inespecífica que realizan (Chao-Fu y Hamilton 1979; Sturkie 1986; Campbell 1994).

De acuerdo con lo encontrado en un estudio relacionado con la determinación de valores hematológicos en aves White Leghorn el porcentaje de heterófilos va de 24 a 42 en el caso de machos y de 30 a 51 para las pollonas, ambos de 12 semanas de edad. En cuanto al valor de linfocitos para los machos va de 53 a 73 y para las hembras de 44 a 68, aunque se debe tomar en cuenta la gran variación que existe entre los conteos dependiendo de la edad, sexo, y condición fisiológica de las aves entre otros factores que pueden influir (Mohiuddin 1989).

En este estudio se encontraron valores basales para heterófilos de 8-48 y para linfocitos de 26-78, ambos expresados en porcentaje, para las 30 aves antes de la infección y a las 6 semanas de edad pero debe tomarse en cuenta que no se separaron machos de hembras.

En otras enfermedades aviares donde se observan hemorragias, como en la anemia infecciosa aviar, en la cual se observa depleción de eritrocitos, granulocitos, linfocitos y trombocitos, también se sugiere que las lesiones se encuentran estrechamente relacionadas con la función de la médula ósea (Taniguchi et al 1982 y 1983; Adair 2000).

Skeeles (1980) en un estudio experimental con el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, relacionó la presencia de hemorragias con una deficiencia en los factores de la coagulación, pero no evaluó el daño en médula ósea y endotelios vasculares.

En cuanto a las células endoteliales, las cuales fagocitan microorganismos, también son afectadas por virus endoteliotrópos, representando esto un factor importante para la obstrucción de capilares y presencia de vasculitis con la subsecuente necrosis (Julian 1996). En esta evaluación, la vasculitis estuvo acompañada de infiltrado linfocítico perivascular y las células endoteliales, principalmente capilares en la médula ósea y pulmón, se observaron hinchadas.

El daño a la pared de los vasos sanguíneos con la presencia de células inflamatorias alrededor de estos o vasculitis que también ocasiona ruptura de vasos y hemorragias, como se observó en este estudio, puede deberse a la degeneración y necrosis de las células del endotelio, de la colágena o del músculo liso, con formación de fibrina en la pared de los vasos.

Estas lesiones en ocasiones son resultado de toxinas microbianas, mediadores inflamatorios y células (heterófilos, trombocitos y basófilos) o daño inmuno-mediado (Cotran *et al* 1994, Riddell 1996). La vasculitis se ha observado en algunas infecciones virales sistémicas ocasionadas por *orthomyxovirus*, *paramyxovirus* y *arbovirus* (Gagel *et al* 1970; Guy 1993; Alexander 1997; Easterday y Hinshaw 1997; Leibovitz 1997).

Las lesiones histopatológicas encontradas en proventrículo, riñón, pulmón y encéfalo coincidieron con los datos mencionados en la literatura y obtenidos en estudios previos de patogénesis, utilizando cepas velogénicas viscerotrópicas. También se ha descrito que existe daño directo en el sistema vascular en el cual se observa hialinización de capilares y arteriolas, trombos hialinos y necrosis de células endoteliales con la subsecuente vasculitis, contribuyendo a la presencia de hemorragias en órganos como proventrículo, duodeno, ciegos, tonsilas cecales, bazo, bolsa de Fabricio, tráquea y cerebro (Cheville *et al* 1972; Lancaster 1981; Ridell 1987; Mc Ferran y Mc Cracken 1988; Parede y Young 1990; Kouwenhoven 1993; Ojok y Brown 1996; Alexander 1997, Brown *et al* 1999).

En este estudio se observó daño a endotelios vasculares a partir de las 60 hpi principalmente en pulmón, proventrículo y encéfalo, consistente en vacuolización de células endoteliales en capilares, pero a diferencia de otros estudios no se observó la formación de trombos, sugestiva de trombosis.

Al ocurrir daño endotelial e iniciarse la hemostasia los trombocitos juegan un papel muy importante ya que forman parte del tapón hemostático para detener la hemorragia; sugiriendo que cualquier daño o disminución de estos ocasionaría un retardo en su agregación, la cual ocurre más rápido que la coagulación, por lo que la respuesta hemostática se vería afectada (Grant y Zucker 1973, Sturkie 1986). La probabilidad de que los trombocitos manifiesten daño durante la ENC es alta, ya que se ha comprobado que los virus de la ENC inducen la apoptosis en células de sangre periférica principalmente en linfocitos y heterófilos (Lam 1996), esto es importante si consideramos que los trombocitos realizan al igual que los heterófilos una actividad fagocítica de virus y bacterias (Chao-Fu y Hamilton 1979, Traill *et al* 1983), sólo que no se tienen estudios al respecto.

Por otro lado, en estudios anteriores con el virus de la anemia infecciosa y la enfermedad de Newcastle las evaluaciones ultraestructurales y secuenciales de la médula ósea han revelado una degeneración progresiva de los islotes hematopoyéticos (Goryo *et al* 1989; Ojok and Brown 1996). Estos hallazgos coinciden con lo observado en la microscopía de luz y electrónica del presente estudio, los cuales mostraron una degeneración progresiva y necrosis de células precursoras, así como, de islotes hematopoyéticos y senos vasculares a las 24 y 36 hpi.

En este caso, un hallazgo significativo fue la observación de partículas electro-densas, las cuales estuvieron presentes a las 72 hpi dentro de vesículas citoplásmicas de células mononucleares. En estudios previos llevados a cabo para visualizar los viriones de la EN por medio de microscopía electrónica, se describe a las partículas como esferas pleomórficas (100-500 nm de diámetro), con una membrana densa, rodeada por una envoltura (Compans and Choppin 1966; Cheville *et al* 1972; Alexander 1997).

En estudios ultraestructurales de cultivos celulares infectados con el virus de la ENC, se reporta la presencia de partículas virales en el interior del núcleo y adyacentes a la membrana de la célula y no libres en el citoplasma (Granzow et al 1999), así como, partículas en proceso de liberación en la superficie de las células (Compans and Choppin 1966; Cheville et al 1972; Granzow et al 1999). En nuestra evaluación, a partir de las 36 hpi, se observaron modificaciones en la membrana de las células inmaduras principalmente de granulocitos sugiriendo esto último.

Campbell (1967) y Goryo et al (1989) mencionan que las células inmaduras normales presentan un núcleo oval, con grandes nucleólos y aparato de Golgi, pocas mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y abundantes ribosomas o polirribosomas en el citoplasma. A este respecto, es importante enfatizar que en este estudio las células inmaduras infectadas mostraron daño severo en aparato de Golgi y retículo endoplásmico, los cuales se encontraron dilatados, así como, degeneración mitocondrial a las 36 hpi.

Estos resultados indican que la depleción y necrosis de las células hematopoyéticas, incluyendo las precursoras de los trombocitos son responsables de la trombocitopenia detectada a las 72 hpi. Con base en los resultados, la trombocitopenia y el daño a endotelios vasculares son considerados las causas principales de las hemorragias en estadios agudos de la enfermedad de Newcastle, siendo evidente que la trombocitopenia es consecuencia de daño viral directo a las células precursoras de los trombocitos en la médula ósea.

6. LITERATURA CITADA

Adair BM. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Dev Comp Immunol* 2000; 24:247-255.

Alexander DJ. Newcastle Disease and other avian Paramixoviridae infections. In: Calnek BW, Barnes CW, Reid WM, Yoder HW. *Diseases of poultry*. Ames Iowa: Iowa State University Press, 1997:607-635.

Beard CW. Serologic procedures. In: Purchase HG, Lawrence H, Domermuth H, Pearson J, editors. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. Pennsylvania: Kendall/Hunt Publishing Company, 1989:192-200.

Benditt EP and Schwartz SM. Blood vessels. In: Rubin E and Farber JL. *Pathology*. United States of America (Philadelphia): JB Lippincott Company, 1988: 452-495.

Brown C, King DJ, Seal BS. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Vet Pathol* 1999; 36:125-132.

Calderón NL, Paasch L.H, Bouda J. Pathogenesis of thrombocytopenia in acute classical swine fever. *Acta Vet Brno* 1998; 67: 115-119.

Campbell WT. Hematology. In: Branson WR, Harrison JG, Harrison RL. *Avian Medicine: principles and application*. Lake Worth Florida: Wingers, 1994:176-198.

Campbell WT. *Avian hematology and cytology*. United States of America: Iowa State University Press/Ames, 1992.

Campbell WT y Coles HE. Patología clínica de aves. En: *Diagnóstico y patología en veterinaria*. México (DF): Interamericana-Mc Graw Hill, 1989:285-308.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Chao-Fu Ch, Hamilton PB. The thrombocyte as the primary circulating phagocyte in chickens. *J Reticuloendothel Soc* 1979;25:585-590.

Cheville NF, Stone H, Riley J y Ritchie EA. Pathogenesis of virulent Newcastle disease in chickens. *J Am Vet Med Assoc* 1972;161:169-179.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic basis of disease*, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994.

Debbie JG, Abelseth MK. Pathogenesis of epizootic hemorrhagic diseases. I. Blood coagulation during viral infection. *J Infect Dis* 1971; 24:217-222.

Doerr AJ, Hamilton BP. New evidence for intrinsic blood coagulation in chickens. *Poult Sci* 1981; 60 237-242.

Easterday BC, Hinshaw US. Influenza. In: Calnek BW, Barnes CW, Reid WM, Yoder HW. *Diseases of poultry*. Ames Iowa:Iowa State University Press, 1997:583-605.

Ergene N, Cötelioglu Ü, Asi Y, Gürel A, Iyisan S. Hematological changes in chicken affected by Newcastle Disease. *J Fac Vet Univ Istanbul* 1988; 14:91-106.

Gagel CH, Linder M, Muller-Berghaus G, Lasch H.G. A study of the pathogenesis of haemorrhages in virus infections. Coagulopathy in classical fowl pest. *Zentralbl Veterinarmed* 1970; 17B:410-417.

Grant AR, Zucker BM. Avian thrombocyte aggregation and shape change in vitro. *Am J Physiol* 1973; 225:340-343.

Grant AR, Zucker BM. Avian thrombocyte aggregation and shape change in vitro. *Am J Physiol* 1973;225:340-343.

Guy JS, Ficken D, Barnes HJ, Wages DP, Smith LG. Experimental infection of young turkeys with eastern equine encephalitis virus and Highlands J virus. *Avian Dis* 1993; 37:389-395.

Janzarik H, Morgenstern E. The nucleated thrombocytoid cells. I. Electron microscopic studies on chicken blood cells. *Thrombos Haemostas* 1979;41:608-621

Jobin F. *L' Hémostase*. Quebec Canada: Les Presses de L' Université Laval, 1995.

Johnson KJ, Chensue SW, Kunkel SL, Ward PA. Immunopathology. In: Rubin E and Farber JL. *Pathology*. United States of America (Philadelphia): JB Lippincott Company, 1988:96-139.

Julian RJ Cardiovascular system. In: Ridell C.: *Avian Histopathology*. American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, pp. 1996: 69-88.

Kingsbury DW. Paramyxoviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, et al. *Fundamental virology*. Unites States of America (New York): Raven Press, Ltd, 1991:507-524.

Kouwenhoven B. Newcastle disease. In: McFerran JB and McNulty MS. *Virus infections of birds*. Unites States of America (New York): Elsevier Science Publishers, 1993:341-361.

Lam MK. Newcastle disease virus-induced apoptosis in the peripheral blood mononuclear cells of chickens. *J Comp Path* 1996;114:63-71.

Lancaster EJ. Newcastle disease-pathogenesis and diagnosis. *Wld's Poult Sci* 1981;37:26-33.

Leibovitz L. Duck virus enteritis. In: Calnek BW, Barnes CW, Reid WM, Yoder HW. *Diseases of poultry*. Ames Iowa:Iowa State University Press, 1997:675-683.

Mc Ferran BJ and McCracken MR. Newcastle disease. In: Alexander JD. Newcastle disease. United States of America (Massachusetts). Kluwer Academic Publishers, 1988:161-183.

Mo IP, Brugh M, Fletcher OJ, Rowland GN and Swayne DE. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. Avian Dis 1997; 41:125-136.

Mohiuddin SM. Haematological values in White Leghorn. Indian Journal of Animal Sciences 1989; 59:691-695.

Nam-Yong P. Disseminated intravascular coagulation in experimental fowl cholera of chickens. Korean J Vet Res 1982; 22: 211-219.

Norma Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Newcastle presentación velogénica. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural 1995:11-22.

Office International of Epizootics Manual. Newcastle disease. OIE 1996; 2.1.15. 161-169.

Office of the and records service General services administration. Code of federal regulations. Animal and animal products Federal Register National Archives 1975; 9:288-290.

Ojok L and Brown C. An immunohistochemical study of the pathogenesis of virulent viscerotropic Newcastle disease in chickens. J Comp Path 1996;115:221-227.

Parede L, Young PL. The pathogenesis of velogenic Newcastle disease virus infection of chickens of different ages and different levels of immunity. Avian Dis 1990; 34:803-808.

Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Leslie H, Sobin MD, editors. Métodos histotécnicos. Instituto de patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). 1st ed. Washington D.C.: Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP), 1995.

Robinson WF, Grant Maxie M. El sistema cardiovascular. En: Jubb KVF, Kennedy CP, Palmer N, editors. Patología de los animales domésticos tomo III. 3a edición. Montevideo: Hemisferio Sur, 1985.

Ridell C. Avian Histopathology. American 2nd ed. Pennsylvania: Association of Avian Pathologists, 1996.

Schalm OW, Jain NC, Carrol EJ. Veterinary Hematology. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975.

Skelees JK, Slavik M, Beasley JN, Brown AH, Meinecke CF, Maruca S, Welch S. An age-related coagulation disorder associated with experimental infection with infectious bursal disease virus. Am J Vet Res 1980; 41:1458-1461.

Stopforth A. A study of coagulation mechanisms in domestic chickens. J Comp Path 1970; 80: 525-533.

Sturkie DP, Griminger P. Body fluids: blood. In: Sturkie DP editor. Avian physiology. New York: Springer-Verlag, 1986:102-129.

Trall KN, Böck G, Boyd R, Wick G. Chicken thrombocytes. Isolation, serological and functional characterisation using the fluorescence activated cell sorter. Develop Comp Immunology 1983;111-125.

Statgraphics Plus for windows Version 3.3. Statistical Graphics Corp. 1994-1998

Cuadro 1. Resultados del conteo de leucocitos en sangre de aves testigo e infectadas con el virus de la enfermedad de Newcastle (Media \pm Desviación estándar)

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Tiempo pi (hr)†</i>	<i>Linfocitos (%)</i>	<i>Heterófilos (%)</i>	<i>Monocitos (%)</i>	<i>Trombocitos (x 1000/μl)</i>
Testigo	5	--	40.2 \pm 8.9	31.2 \pm 6.4	20.1 \pm 5.3	15.1 \pm 3.6
1	5	24	45.6 \pm 19.1	31.6 \pm 9.6	25.6 \pm 8.9	11.4 \pm 3.6
2	5	36	48.3 \pm 23.6	25.3 \pm 14.9	18.0 \pm 10.1	10.7 \pm 5.0
3	5	48	59.8 \pm 9.4*	18.6 \pm 7.2	15.0 \pm 4.6	23.4 \pm 8.2
4	5	60	28.0 \pm 14.9	49.6 \pm 21.5*	14.8 \pm 7.6	13.8 \pm 10.2
5	5	72	17.6 \pm 10.4*	64.0 \pm 8.0*	12.2 \pm 5.2*	7.4 \pm 5.0*

Grupo testigo: no infectado, sólo inoculado con 0.2ml de SSF vía ocular por ave.

†Tiempo posinfección en el que fueron obtenidas las muestras de sangre completa, 1 ml por ave. Las aves fueron infectadas por vía ocular con 0.2 ml por ave del virus de la enfermedad de Newcastle, cepa Chimalhuacán con un título de 10^6 DLEP₅₀/ml.

*Indica diferencia significativa comparado con el grupo testigo (P<0.05).

Cuadro 2. Aislamiento viral y porcentaje de positividad a la hemoaglutinación en aves testigo e infectadas con el virus de la enfermedad de Newcastle.

<i>Grupo</i>	<i>Tiempo pit</i>	<i>Pulmón</i>	<i>Riñón</i>	<i>Médula ósea</i>	<i>Proventrículo</i>	<i>Encéfalo</i>
Testigo	--	‡5/0 (0%)	5/0 (0%)	5/0 (0%)	5/0 (0%)	5/0 (0%)
1	24	5/0 (0%)	5/0 (0%)	5/0 (0%)	5/0 (0%)	5/0 (0%)
2	36	5/0 (0%)	5/0 (0%)	5/0 (0%)	5/0 (0%)	5/0 (0%)
3	48	5/3 (60%)*	5/5 (100%)**	5/5 (100%)**	5/5 (100%)**	5/0 (0%)
4	60	5/5 (100%)**	5/5 (100%)**	5/5 (100%)**	5/5 (100%)**	5/5 (100%)**
5	72	5/5 (100%)**	5/4 (100%)**	5/3 (100%)**	5/4 (100%)**	5/4 (100%)**

Grupo testigo: no infectado, sólo inoculado con 0.2 ml de SSF vía ocular por ave.

†Tiempo posinfección en el que fueron sacrificadas las aves de cada grupo para la obtención de las muestras. Las aves fueron infectadas por vía ocular con 0.2 ml por ave del virus de la enfermedad de Newcastle, cepa Chimalhuacán con un título de 10^6 DLEP₅₀/ml.

‡Número total de embriones inoculados/número de embriones positivos a la hemoaglutinación.

*Indica diferencia significativa comparado con el grupo testigo ($P < 0.05$).

**Indica diferencia significativa comparado con el grupo testigo ($P < 0.005$).

Cuadro 3. Porcentaje de aves con lesiones en pulmón después de la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica.

Hallazgos histopatológicos	24 hpi ¹	36 hpi	48 hpi	60 hpi	72 hpi
	² n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
Infiltrado linfocitario perivascular multifocal	20	80	80	100	100
Infiltrado linfocitario intersticial difuso	80	60	80	80	100
Hiperplasia nodular linfoide bronquial	0	20	40	40	20
Focos de hemorragia	0	0	0	40	60
Proliferación de tejido conectivo en bronquios terciarios	0	20	60	80	100
Proliferación de células de capilares aéreos	0	0	0	80	100
Daño a endotelios vasculares	0	0	20	40	60
Edema perivascular	0	0	0	0	60

¹ Horas posinfección, las aves fueron infectadas a las 6 semanas de edad con el virus de la enfermedad de Newcastle, cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica por vía ocular con una dosis de 0.2 ml/ave.

² Total de aves muestreadas

Cuadro 4. Porcentaje de aves con lesiones en proventrículo después de la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica.

Hallazgos histopatológicos	24 hpi ¹	36 hpi	48 hpi	60 hpi	72 hpi
	² n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
Hiperplasia linfocitaria unión esófago-proventrículo y mucosa	80	80	80	100	80
Infiltrado linfocitario en mucosa	100	80	80	100	60
Necrosis de células de la mucosa	0	40	20	60	80
Infiltración heterofílica en mucosa	0	20	60	80	80
Hemorragias en mucosa y submucosa	0	0	40	100	100
Focos de necrosis en la unión esófago-proventrículo y submucosa	0	0	0	60	100

¹ Horas posinfección, las aves fueron infectadas a las 6 semanas de edad con el virus de la enfermedad de Newcastle, cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica por vía ocular con una dosis de 0.2 ml/ave.

² Total de aves muestreadas

Cuadro 5. Porcentaje de aves con lesiones en riñón después de la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica.

Hallazgos histopatológicos	24 hpi ¹	36 hpi	48 hpi	60 hpi	72 hpi
	² n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
Proliferación de células del ovillo glomerular	0	60	100	80	100
Engrosamiento de cápsula de Bowman	0	0	0	60	40
Degeneración y necrosis de células en túbulos contorneados y colectores	0	0	0	60	20
Infiltrado linfocitario intersticial multifocal	0	40	0	20	0
Infiltrado linfocitario perivascular	0	0	40	0	0
Acúmulos linfoides	0	0	40	20	20
Infiltración heterofílica intersticial en túbulos colectores	0	0	0	20	20
Hemorragias	0	0	40	0	0
Proliferación de tejido conectivo en túbulos colectores	0	0	0	20	40

¹ Horas posinfección, las aves fueron infectadas a las 6 semanas de edad con el virus de la enfermedad de Newcastle, cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica por vía ocular con una dosis de 0.2 ml/ave.

² Total de aves muestreadas

Cuadro 6. Porcentaje de aves con lesiones en encéfalo después de la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica.

Hallazgos histopatológicos	24 hpi ¹	36 hpi	48 hpi	60 hpi	72 hpi
	² n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
Infiltración linfocitaria perivascular	0	0	0	20	60
Daño a endotelios vasculares	0	0	0	20	40
Degeneración y necrosis neuronal	0	0	0	20	40
Hemorragias	0	0	0	20	20
Degeneración de fibras de mielina	0	0	0	0	60
Gliosis	0	0	0	0	80

¹ Horas posinfección, las aves fueron infectadas a las 6 semanas de edad con el virus de la enfermedad de Newcastle, cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica por vía ocular con una dosis de 0.2 ml/ave.

² Total de aves muestreadas

Cuadro 7. Porcentaje de aves con lesiones en médula ósea después de la infección con el virus de la enfermedad de Newcastle cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica.

Hallazgos histopatológicos	24 hpi ¹	36 hpi	48 hpi	60 hpi	72 hpi
	² n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
Acúmulos linfoides	0	20	80	60	100
Degeneración y necrosis de células en diferentes etapas de maduración	0	0	80	80	100
Disminución de la línea granulocítica	0	0	60	40	60
Disminución en cantidad de células blásticas	0	0	20	20	60
Infiltración linfocitaria perivascular	0	0	40	40	80
Hemorragias	0	0	0	40	60
Focos de necrosis con proliferación de tejido conectivo	0	0	20	40	100

¹ Horas posinfección, las aves fueron infectadas a las 6 semanas de edad con el virus de la enfermedad de Newcastle, cepa Chimalhuacán, velogénica viscerotrópica por vía ocular con una dosis de 0.2 ml/ave.

² Total de aves muestreadas

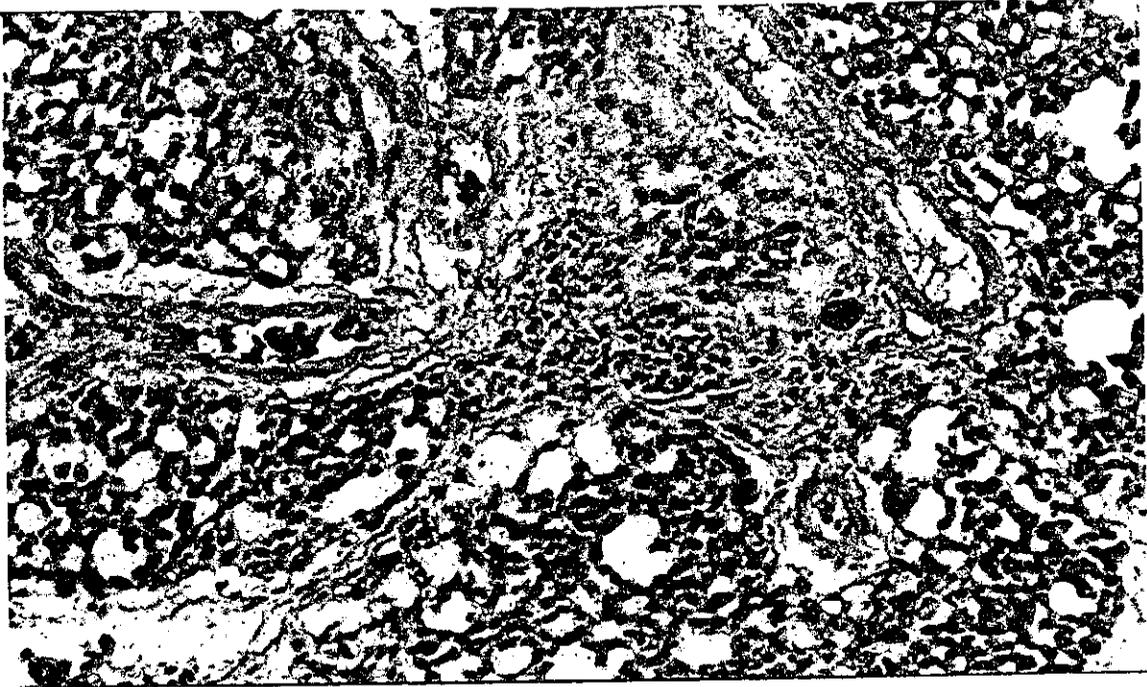


Figura 1. Pulmón (36 hpi). Proliferación de tejido conectivo y capilares aéreos, presencia de infiltrado linfocitario perivascular e intersticial multifocal con edema perivascular. HE (250x).

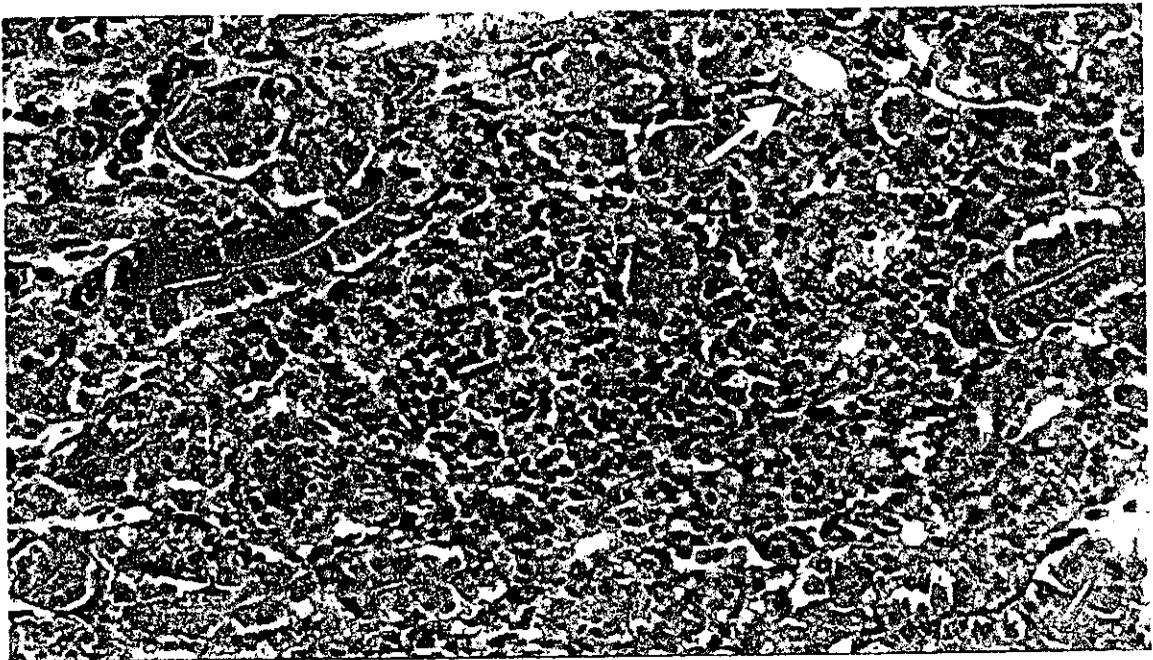


Figura 2. Riñón (60 hpi). Infiltrado linfocitario intersticial y presencia de acúmulos linfoides que desplazan a los túbulos renales, algunos se observan dilatados (flecha). HE (250x).

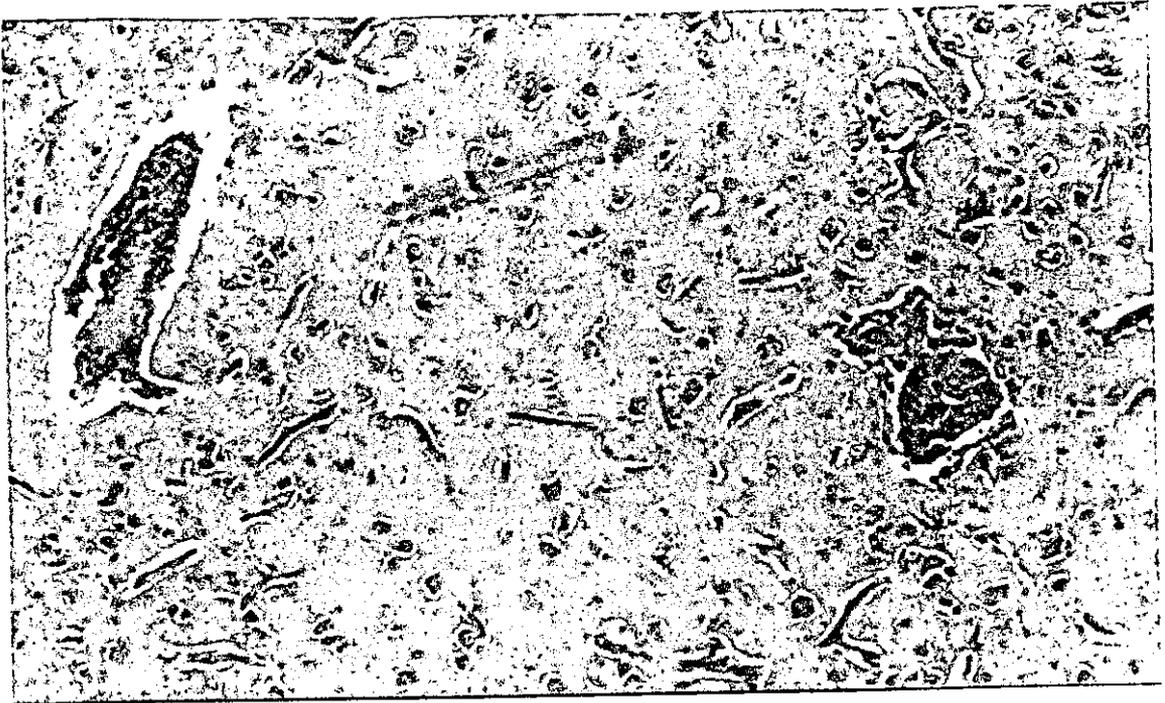


Figura 3. Encéfalo (72 hpi). Presencia de infiltrado linfocitario perivascular con material hialino en vasos sanguíneos. HE (100x).

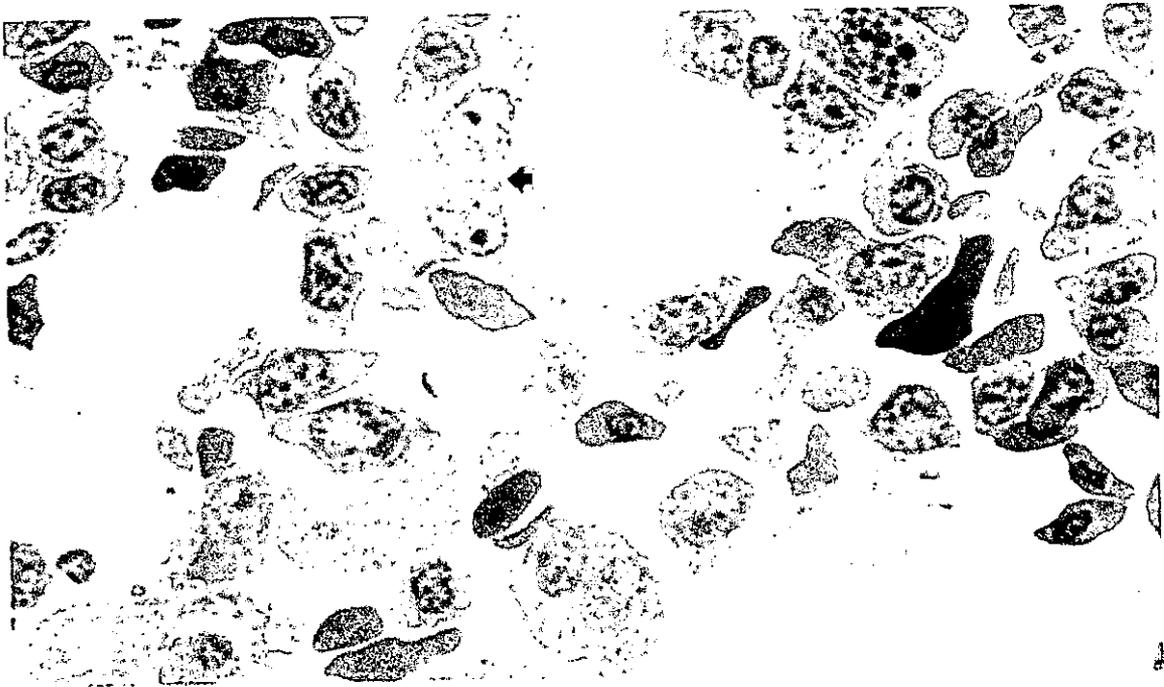


Figura 4. Médula ósea (36 hpi). Degeneración de célula endotelial, el núcleo presenta una hinchazón importante (flecha). Azul de toluidina (1000x).

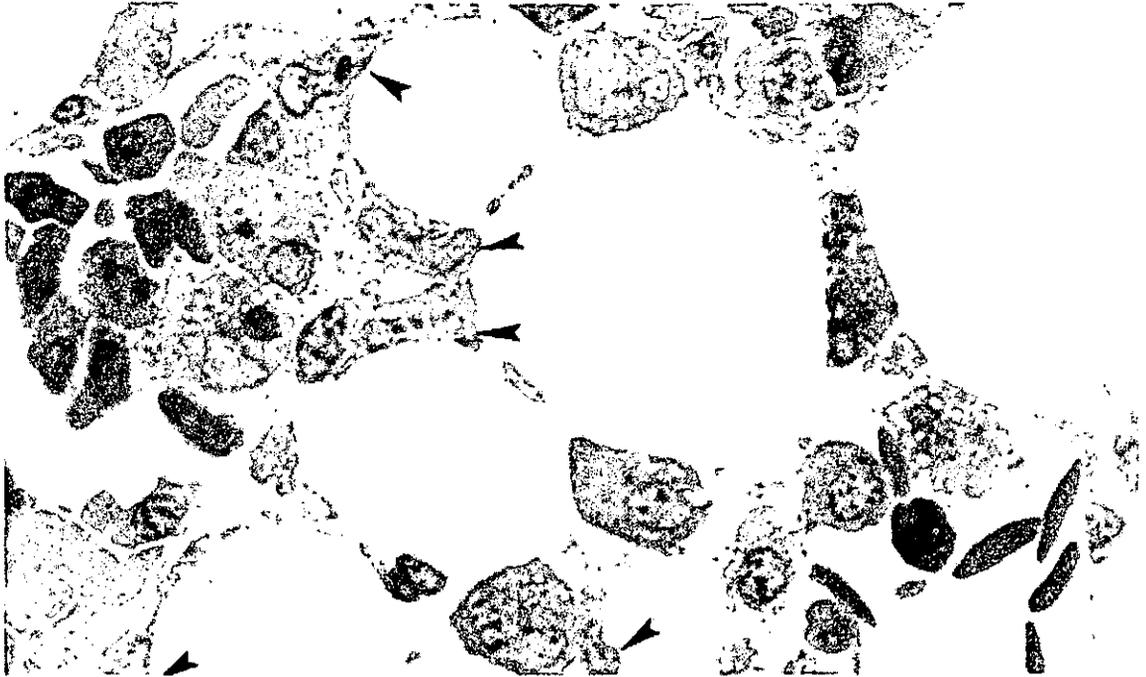


Figura 5. Médula ósea (60 hpi). Células endoteliales con degeneración y fragmentación citoplásmica además de núcleos hinchados (puntas de flecha). Azul de toluidina (1000x).

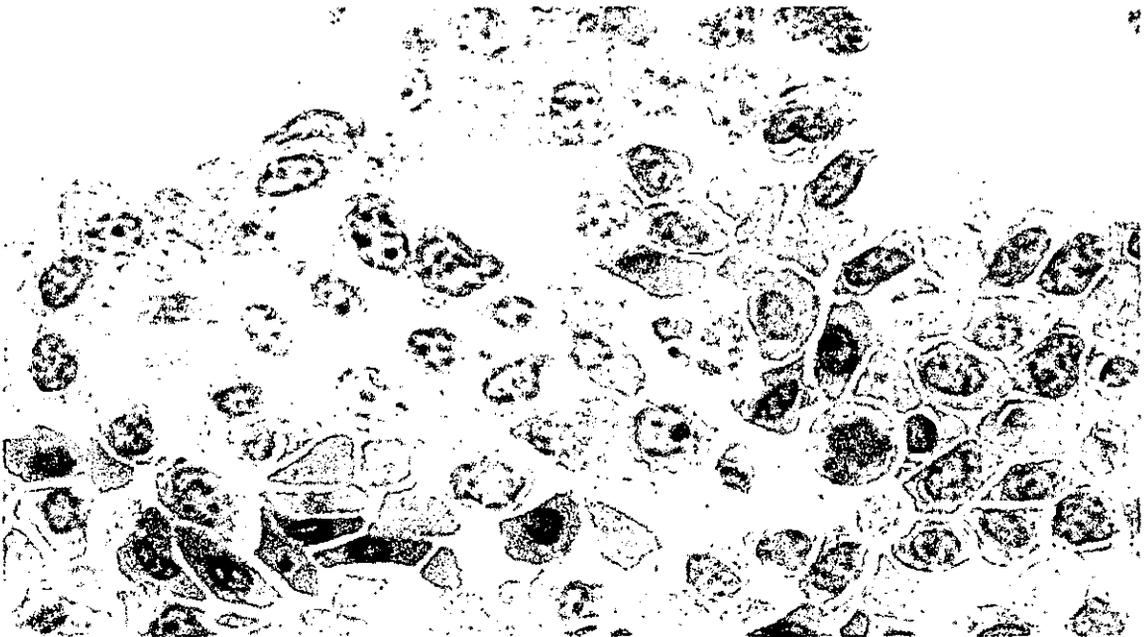


Figura 6. Médula ósea (36 hpi). Foco de células inmaduras (centro) con necrosis, presentando degeneración citoplásmica avanzada, vacuolización, presencia de proyecciones en la membrana y fragmentos citoplásmicos. Azul de toluidina (1000x).

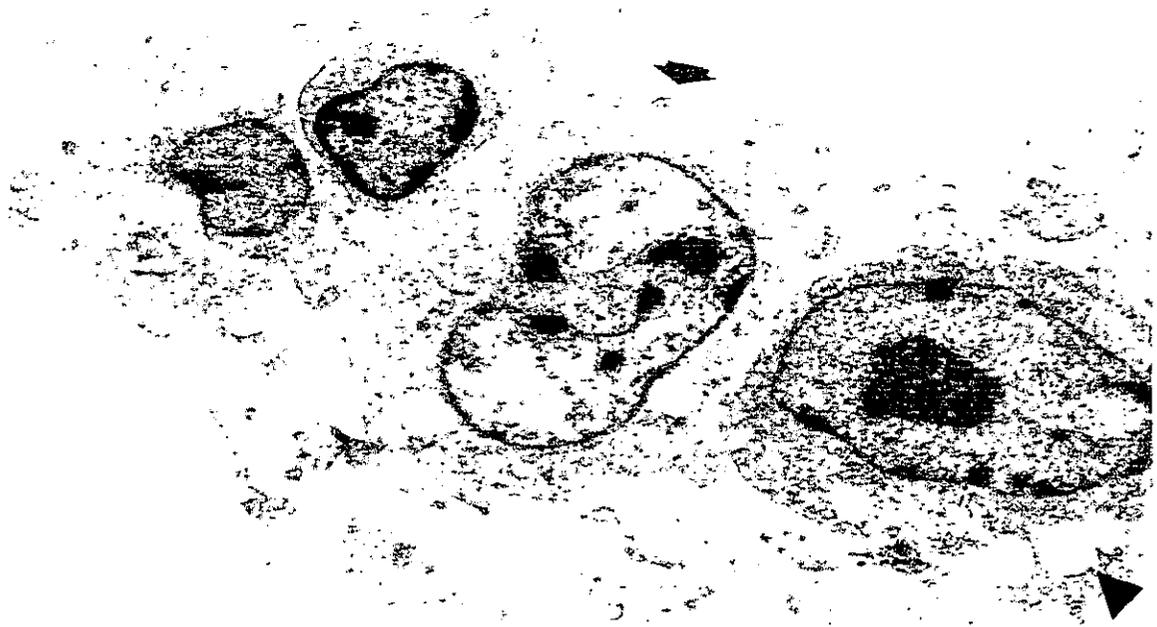


Figura 7. Médula ósea. Células con cromatina densa y vacuolización citoplásmica (punta de flecha). Se observan abundantes restos celulares y en la célula inmadura procesos que sugieren la liberación del virus (flecha). Contraste acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynold's (9,135x).



Figura 8. Médula ósea. Granulocito con modificaciones en la superficie celular (flecha), lo cual sugiere partículas virales emergiendo de la membrana. Estos procesos se encontraron en granulocitos y células inmaduras. Contraste acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynold's (76,000x).