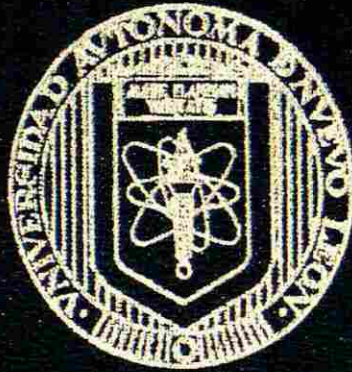


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



CARACTERIZACION HISTOPATOLOGICA DE UN
MODELO DE NEUMONIA TOXICA POR INOCULACION
DE 3-METIL INDOL EN BORREGOS Y RATAS

Por
ARMANDO TREJO CHAVEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS
con Especialidad en Salud Animal

Septiembre, 2005

2005

2006

2007

2008

2009

2010

2011

2012

2013

2014

2015

2016

2017

2018

2019

2020

2021

2022

CARFAS THERIZACXONA HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

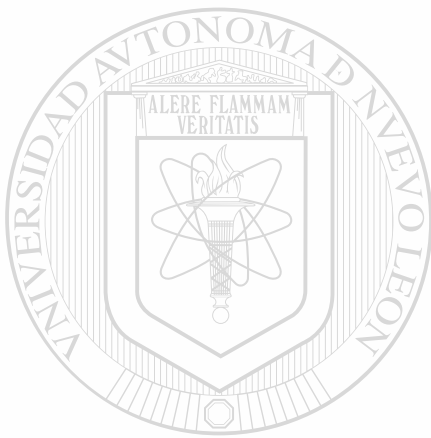
MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA

MOXON ZIHSHI MOXON HISTORICATAION OXCHICA DE UN MOXOLO DE NEUAMOMIA



1080068146



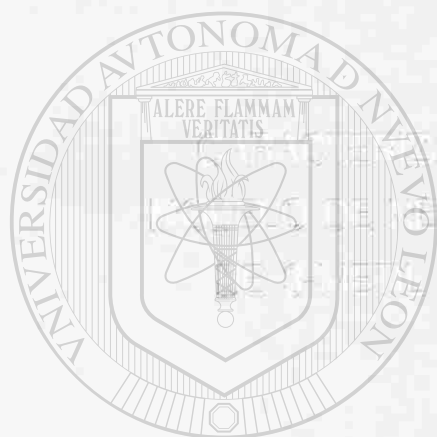
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



INVESTIGACIÓN HISTOPATOLOGICA DE UN
CASO DE PNEUMONIA TOXICA POR INOCULACION
DE UN AGENTE ENZIMATICO EN EGRESOS Y RADIS

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ARMANDO TREJO CHAVEZ

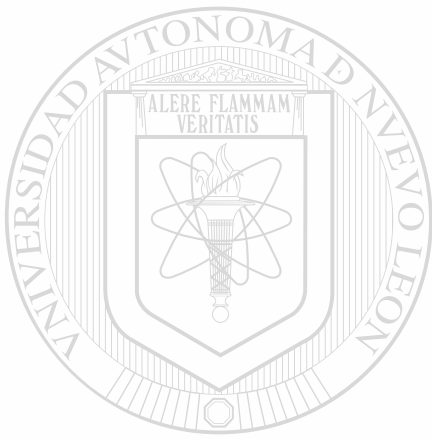
®

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS
con Especialidad en Salud Animal

Septiembre, 2005



TM
SF967
• ES
T7
2005



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

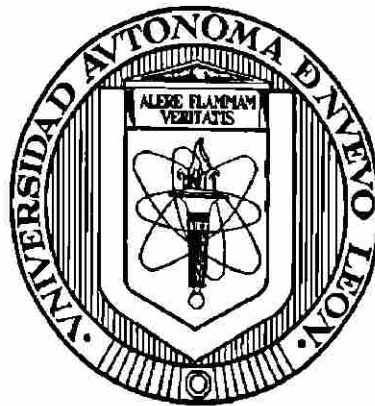
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE UN MODELO DE NEUMONÍA
TÓXICA POR INOCULACIÓN DE 3-METIL INDOL
EN BORREGOS Y RATAS**

Por

ARMANDO TREJO CHÁVEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS
con Especialidad en Salud Animal**

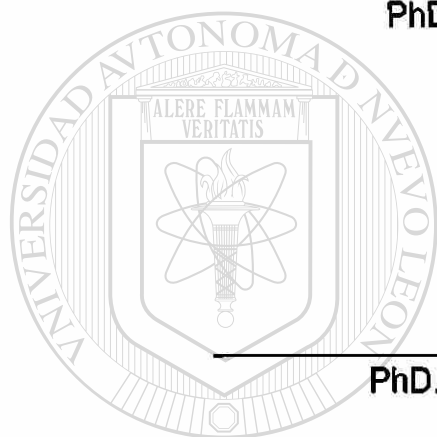
Septiembre, 2005

**CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE UN MODELO DE NEUMONÍA
TÓXICA POR INOCULACIÓN DE 3-METIL INDOL
EN BORREGOS Y RATAS**

APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE TESIS



PhD. Rafael Ramírez Romero
Asesor de la Tesis



PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar
Co-asesor

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



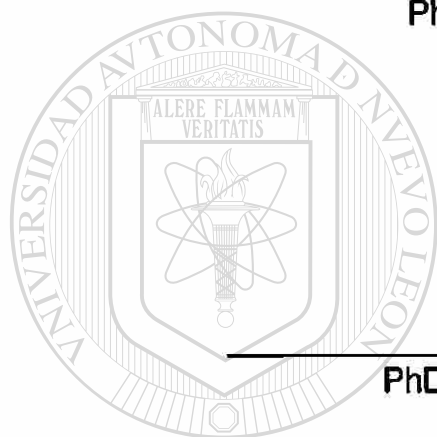
MSc. Alicia Magdalena Névarez Garza
Co-asesor

**CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE UN MODELO DE NEUMONÍA
TÓXICA POR INOCULACIÓN DE 3-METIL INDOL
EN BORREGOS Y RATAS**

APROBACIÓN DE LA TESIS



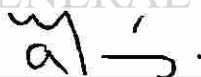
PhD. Rafael Ramírez Romero
Asesor de la Tesis



PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar
Co-asesor

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



MSc. Alicia Magdalena Névarez Garza
Co-asesor

AGRADECIMIENTOS

A Dios, al cual le debemos el regalo más importante que es la vida y que gracias a Él, se nos da la oportunidad de mejorar como ser humano, agradeciéndole siempre por todas las bendiciones recibidas.

A mis padres Juan Trejo Torres y Paula Chávez Castillo quienes con su cariño, apoyo y amor, hicieron posible la realización de este proyecto de vida.

A mis hermanos José Luis Trejo Chávez y Nancy Trejo Chávez, quienes con sus incesantes muestras de apoyo incondicional y comentarios permitieron llevar a buen fin este trabajo.

A mis sobrinitas Jimena Trejo Ávila y Ameyally Yuritzí Arzáte Trejo, quienes con su cariño y amor me impulsaron a concluir con éxito este estudio.

A mi novia Erika García Morales y a Yessika Ruiz García, quienes con su cariño me han inspirado a creer que lo imposible, si es posible.

Al Gobierno de México, por la oportunidad que me ha brindado de seguirme preparando para formar a las futuras generaciones.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su apoyo y compromiso de formar a futuros profesionistas que le den a México, la grandeza que le corresponde.

A mi asesor el Dr. Rafael Ramírez Romero, quién con sus conocimientos y experiencia profesional, me ha guiado por el mundo del conocimiento al cual todos aspiramos llegar algún día.

A mis Co-asesores Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar y Dra. Alicia Magdalena Névarez Garza, quienes gracias a sus oportunos comentarios hicieron que este estudio llegara a buen término.

A mis amigos Marcela Méndez Galván, Fernando Pérez Salazar, Ernesto de Leija Farías, Juan Francisco Pineda Rodríguez, Luis Orlando Martínez González, M.V.Z. José Luis Vázquez Juárez y a todas aquellas personas que directa ó indirectamente influyeron para que este trabajo concluyera exitosamente.

Al Laboratorio Central Regional de Monterrey y al Comité para el Fomento y Protección Pecuaría del Estado de Nuevo León, por todas las facilidades que me brindaron para llevar a buen término este proyecto.

Gracias.



El deber de un hombre está allí, donde es más útil

José Martí

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

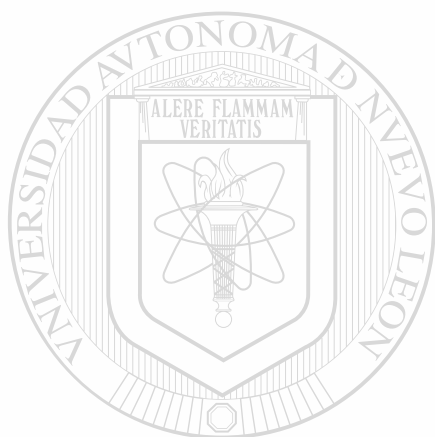


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo | Página |
|---|--------|
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Breve introducción al Edema y Enfisema Pulmonar Agudo Bovino | 1 |
| 2 LITERATURA REVISADA | |
| 2.1 Patogenia del Edema y Enfisema Pulmonar Agudo Bovino | 4 |
| 2.2 Lesiones macroscópicas y microscópicas del Edema y Enfisema Pulmonar Agudo Bovino | 6 |
| 2.3 Metabolismo y bioactivación del 3-metil indol | 8 |
| 2.3.1 Características del Triptófano | 8 |
| 2.3.2 Mecanismo de metabolismo y bioactivación del 3-metil indol | 8 |
| 2.4 Células epiteliales bronquiolares secretoras no ciliadas (Células Clara) | 10 |
| 2.4.1 Características de las células Clara | 10 |
| 2.5 Justificación | 11 |
| 2.6 Hipótesis | 11 |
| 2.7 Objetivo | 11 |
| 3 MATERIAL Y MÉTODOS | 12 |
| 3.1 Selección y manejo de los animales para experimentación | 12 |
| 3.2 Inducción de la neumonía tóxica por inoculación del 3-metil indol | 14 |
| 3.3 Sacrificio de los animales y realización de las necropsias | 19 |

| Capítulo | Página |
|---|---------------|
| 3.4 Selección y procesamiento de las muestras | 20 |
| 4 RESULTADOS | 21 |
| 4.1 Lesiones macroscópicas | 21 |
| 4.2 Lesiones microscópicas | 27 |
| 5 DISCUSIÓN / CONCLUSIONES | 38 |
| REFERENCIAS | 41 |



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

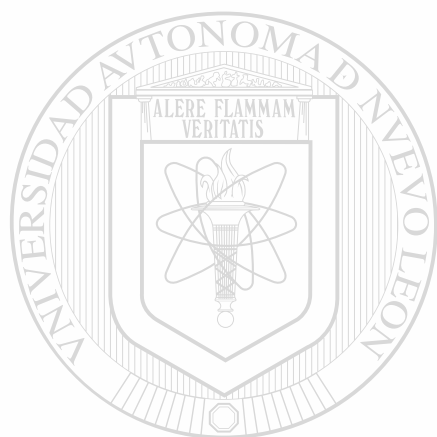
| Figura | Página |
|--|---------------|
| 1 Representación esquemática de la patogenia del Edema y Enfisema Pulmonar Agudo Bovino. | 5 |
| 2 Adquisición y preparación de los borregos antes de la inoculación del 3-metil indol. | 13 |
| 3 Adquisición y preparación de las ratas antes de la inoculación del 3-metil indol. | 14 |
| 4 Presentación en polvo del 3-metil indol (3-MI; skatole) de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). | 16 |
| 5 Inoculación del 3-metil indol por vía intravenosa en borrego. | 18 |
| 6 Inoculación del 3-metil indol por vía intraperitoneal en rata. | 18 |
| 7 Realización de los estudios post-mortem en borregos y ratas. | 19 |
| 8 Selección y manejo de las muestras de tejido pulmonar de los borregos y las ratas. | 20 |
| 9 Tráquea con presencia de abundante espuma de color blanco difuso en borrego inoculado con 3-metil indol. | 22 |
| 10 Pulmón con congestión y edema intersticial severo difuso en borrego inoculado con 3-metil indol. | 22 |
| 11 Presencia de hemoglobinuria en aspirado de vejiga urinaria | 23 |
| 12 Pulmón del borrego inoculado con solución salina fisiológica. | 23 |
| 13 Congestión y edema pulmonar severo difuso en rata inoculada con 3-metil indol. Vista dorsal. | 25 |
| 14 Congestión y edema pulmonar severo difuso en rata inoculada con 3-metil indol. Vista ventral. | 25 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| 15 Pulmón normal en rata inoculada con propilenglicol. | 26 |
| 16 Pulmón normal en rata inoculada con solución salina fisiológica. | 26 |
| 17 Edema y congestión pulmonar severo difuso en borrego inoculado con 3-metil indol. 40X | 29 |
| 18 Presencia de membranas hialinas en intersticio pulmonar en borrego inoculado con 3-metil indol. 40X | 29 |
| 19 Hiperplasia de neumocitos tipo II (epitelialización) en borrego inoculado con 3-metil indol. 100X | 30 |
| 20 Engrosamiento alveolar marcado con presencia de infiltrado inflamatorio compuesto por células mononucleares en borrego inoculado con 3-metil indol. 40X | 30 |
| 21 Congestión discreta en alvéolos de borrego inoculado con propilenglicol. 40X | 31 |
| 22 Alvéolos normales en borrego inoculado con solución salina fisiológica. 40X | 31 |
| <hr/> | |
| 23 Edema intersticial severo difuso en pulmón de rata inoculada con 3-metil indol. 100X | 34 |
| 24 Macrófagos alveolares fagocitando eritrocitos (eritrofagia). Véase la flecha. 100X | 34 |
| 25 Hiperplasia de neumocitos tipo I y II (epitelialización)). 100X | 35 |
| 26 Enfisema intersticial severo. | 35 |
| 27 Engrosamiento alveolar discreto y congestión discreta difusa en rata inoculada con propilenglicol. | 36 |
| 28 Sacos alveolares y espacios aéreos normales en rata inoculada con solución salina fisiológica. | 36 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|---------------|
| 1 Tabla cronológica de inoculación de 3-metil indol, propilenglicol y solución salina fisiológica en borregos. | 15 |
| 2 Tabla cronológica de inoculación de 3-metil indol, propilenglicol y solución salina fisiológica en ratas. | 17 |
| 3 Lesiones microscópicas de los borregos tratados con 3-metil-indol, propilenglicol y solución salina fisiológica. | 37 |
| 4 Lesiones microscópicas de las ratas tratadas con 3-metil-indol, propilenglicol y solución salina fisiológica. | 37 |



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

D-Trp D-Triptófano

EEPAB Edema y Enfisema Pulmonar Agudo Bovino

H&E Hematoxilina y Eosina

L-Trp L-Triptófano

$\mu\text{g/ml}$ microgramos/mililitro

mg/kg miligramo/kilogramo

mg miligramo

ml mililitro

NIA Neumonía Intersticial Aguda

Per os Vía oral

RESUMEN

Armando Trejo Chávez

Fecha de Graduación: Septiembre, 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Título del Estudio: CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE UN MODELO DE NEUMONÍA TÓXICA POR INOCULACIÓN DE 3-METIL INDOL EN BORREGOS Y RATAS

Número de páginas: 42

Candidato para el grado de Maestro
en Ciencias Veterinarias con
Especialidad en Salud Animal

Área de Estudio: Patología Veterinaria

Propósito y Método del Estudio: El presente proyecto propone un modelo de inflamación pulmonar en borregos y ratas inducido por el tóxico 3-metil indol. En este modelo de neumotoxicidad se enfatizará el grado de daño que presentan las estructuras celulares que constituyen la arquitectura tisular pulmonar de ambos modelos experimentales. Recientemente se ha demostrado que el compuesto conocido como 3-metil indol es un compuesto formado en los ruminantes por la degradación bacteriana del L-triptófano, el cual es metabolizado por un número de bacterias para formar ácido indolacético y luego descarboxilado por *Lactobacillus sp.*, en el fluido ruminal, para absorberse vía tracto digestivo y circular antes de dañar específicamente el tejido pulmonar (Yost, *et al.*, 1989). Este compuesto tiene una gran relevancia en la generación y desarrollo de las lesiones pulmonares que caracterizan al edema y enfisema pulmonar agudo bovino también llamado *fog fever*. No obstante, en modelos experimentales diferentes al bovino, la información de lesión pulmonar tóxica debido a este compuesto es limitada. A pesar de que previamente se ha mencionado que la respuesta inflamatoria pulmonar aguda de origen tóxico es un evento estereotipado, el hecho de que las características histopatológicas de la neumonía tóxica por 3-metil indol en el ganado sean particularmente tan marcadas, hace suponer que en otras especies el comportamiento de dicho compuesto también lo será. En el presente trabajo se pretende determinar el grado de lesión y los cambios celulares que el pulmón presenta ante el estímulo dañino de este compuesto al administrarse parenteralmente en ovinos y ratas.

Contribuciones y Conclusiones: Subsecuentemente, estos resultados se compararán con los datos obtenidos de la literatura disponible. Lo anterior con la intención de aportar dos modelos experimentales diferentes, que puedan ser utilizados en futuros experimentos orientados a comprender en forma más específica los mecanismos que se establecen durante el proceso de bioactivación, metabolismo y degradación de este compuesto en dos modelos experimentales diferentes. Asimismo, el conocimiento en los mecanismos patológicos que operan en la iniciación y desarrollo del daño pulmonar tóxico por 3-metil indol, permitirá el diseño de nuevos medicamentos que contribuyan a disminuir las pérdidas ocasionadas por el padecimiento neumónico de índole tóxica más importante para la ganadería.

FIRMA DEL ASESOR: _____

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Breve Introducción al Edema y Enfisema Pulmonar Agudo Bovino (EEPAB)

El Edema y Enfisema Pulmonar Agudo Bovino (EEPAB), también conocido como Neumonía Intersticial Aguda (NIA) ó *Fog fever*, es una enfermedad aguda que afecta al tracto respiratorio de los bovinos, la cual se presenta en forma natural y es conocida desde hace 100 años (Carlson, *et al.*, 1972). El cuadro patológico se presenta cuando los animales que han sido alimentados con heno y pasturas de mala calidad por un período prolongado, cambian repentinamente a un consumo de pastos irrigados, verdes y jugosos (Trigo.T.F., 1998). Estos pastos tiernos y jugosos contienen altas concentraciones del aminoácido L-triptófano (L-Trp), el cual al llegar al rúmen es metabolizado por la flora ruminal, principalmente por la bacteria *Lactobacillus sp.*, formando ácido indolacético, el cual es descarboxilado dando origen al compuesto conocido como 3-metil indol (3 MI; skatole) (Yost, *et al.*, 1989). Este compuesto también se encuentra en forma natural en las heces de la rata, el cerdo y el humano, debido a la fermentación del triptófano en el intestino grueso (Acton, *et al.*, 1992), además de ser un constituyente importante del humo del cigarro. Una vez transformado, el 3-metil indol es absorbido por el tracto digestivo y pasa al torrente sanguíneo, en donde es transportado hacia las células Clara de los pulmones, lugar en donde es bioactivado a intermediarios electrofílicos por la enzima Citocromo P-450 (Yost, *et al.*, 1989). Estos intermediarios son los responsables de la neumonía de tipo tóxico, debido al daño directo a las membranas celulares (Ramírez, *et al.*, 1993).

Los signos clínicos que manifiestan los animales afectados por 3-metil indol son depresión, respiración irregular y dificultosa (disnea), aumento marcado en la frecuencia respiratoria (taquipnea) y dilatación marcada de los ollares (hiperventilación).

INTRODUCCIÓN

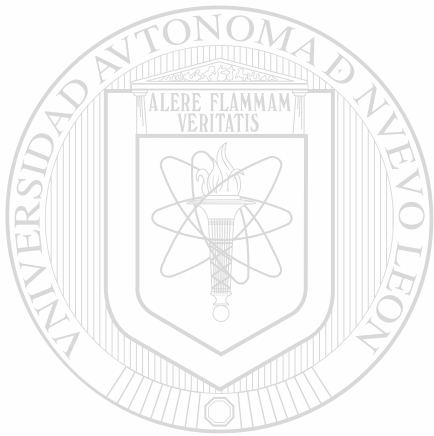
Los animales que mueren durante la fase aguda presentan lesiones macroscópicas de enfisema intersticial y edema graves. La tráquea y bronquios se aprecian con abundante líquido espumoso de color blanco. Los pulmones se observan de color rojizo a púrpura y son de consistencia elástica y húmeda (Trigo.T.F., 1998).

Entre las particularidades histopatológicas de la neumonía causada por 3-metil indol se encuentra una marcada hiperemia, edema alveolar severo difuso, formación de membranas hialinas, hiperplasia de las células alveolares tipo II (neumocitos tipo II) y enfisema intersticial. De igual manera, existe una gran cantidad de alvéolos edematosos y otros más se observan rotos, además de presentar una severa infiltración de neutrófilos y eosinófilos (Carlson, *et al.*, 1972). Los animales que sobreviven al episodio agudo normalmente tienen fibrosis intersticial residual y persistencia de las células epiteliales alveolares tipo II (Jubb, *et al.*, 1993).

Las lesiones histológicas que caracterizan al Edema y Enfisema Pulmonar Agudo Bovino en brotes naturales, son similares a las encontradas en otras diferentes especies, a las cuales se les ha inducido la enfermedad experimentalmente, administrando el 3-metil indol por vía parenteral (intravenosa ó intraperitoneal), por vía oral (*per os*) ó intraruminalmente (Cornelius, *et al.*, 1979). Sin embargo, la susceptibilidad de determinada especie es importante en la reproducibilidad de las mismas, debido a que cada una de ellas tiene procesos metabólicos distintos para procesar el compuesto. Esto ocasiona que unos sean tal vez más susceptibles que otros al tóxico, permitiendo por lo tanto que los signos clínicos aparezcan o no, que la presencia de los eventos celulares sea rápida o lentamente ó que las lesiones sean muy severas o ligeras (Kaster y Yost., 1997). En lo que concierne a este estudio y debido a la escasa información que hasta el momento se dispone, en relación a las descripciones histopatológicas que el 3-metil indol ocasiona en especies diferentes al

INTRODUCCIÓN

bovino, parece razonable suponer que las mismas características microscópicas también lo serán, en los dos modelos experimentales en turno.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2 LITERATURA REVISADA

2.1 Patogenia del Edema y Enfisema Pulmonar Agudo Bovino (EEPAB)

Conocida desde hace 100 años en animales en pastoreo (Carlson, *et al.*, 1972) y tradicionalmente descrita como una enfermedad de tipo respiratorio, el cual clínica, patológica y epidemiológicamente es diferente a los procesos bacterianos que sufren los bovinos en forma natural, el Edema y Enfisema Pulmonar Agudo Bovino también conocido como Neumonía Intersticial Atípica en los bovinos (Ramírez, *et al.*, 1993), Neumonía Intersticial Aguda ó *Fog fever*, es una alteración metabólica que se presenta en animales que han sido alimentados por mucho tiempo con henos y pasturas de mala calidad y cambian repentinamente a consumir grandes cantidades de pastos verdes y jugosos (Trigo, T.F., 1998) (Figura 1).

El Edema y Enfisema Pulmonar Agudo Bovino se considera una de las enfermedades que causa la mayor cantidad de muertes y pérdidas financieras en las engordas del sur de Alberta, Canadá (Popp, *et al.*, 1998). En nuestro país este tipo de enfermedad está presente, tal es el caso reportado por (Ramírez, *et al.*, 1993).

La enfermedad por lo general se presenta cinco a diez días después de introducir los animales a las praderas suculentas. La morbilidad puede ocurrir hasta en un 50% y una mortalidad del 30% en los animales más afectados, siendo las hembras más susceptibles que los machos en una relación de tres a uno (Loneragan, *et al.*, 2001); según el grado de severidad los animales pueden mostrar depresión, temblores, algunas manifestaciones respiratorias que se aprecian son: la presencia de disnea hasta evidente taquipnea la cual es manifiesta. Generalmente, no hay fiebre ni tos y los animales más afectados respiran con la boca abierta y tienen la lengua protruida, además de percibir un gruñido leve durante la expulsión del aire.

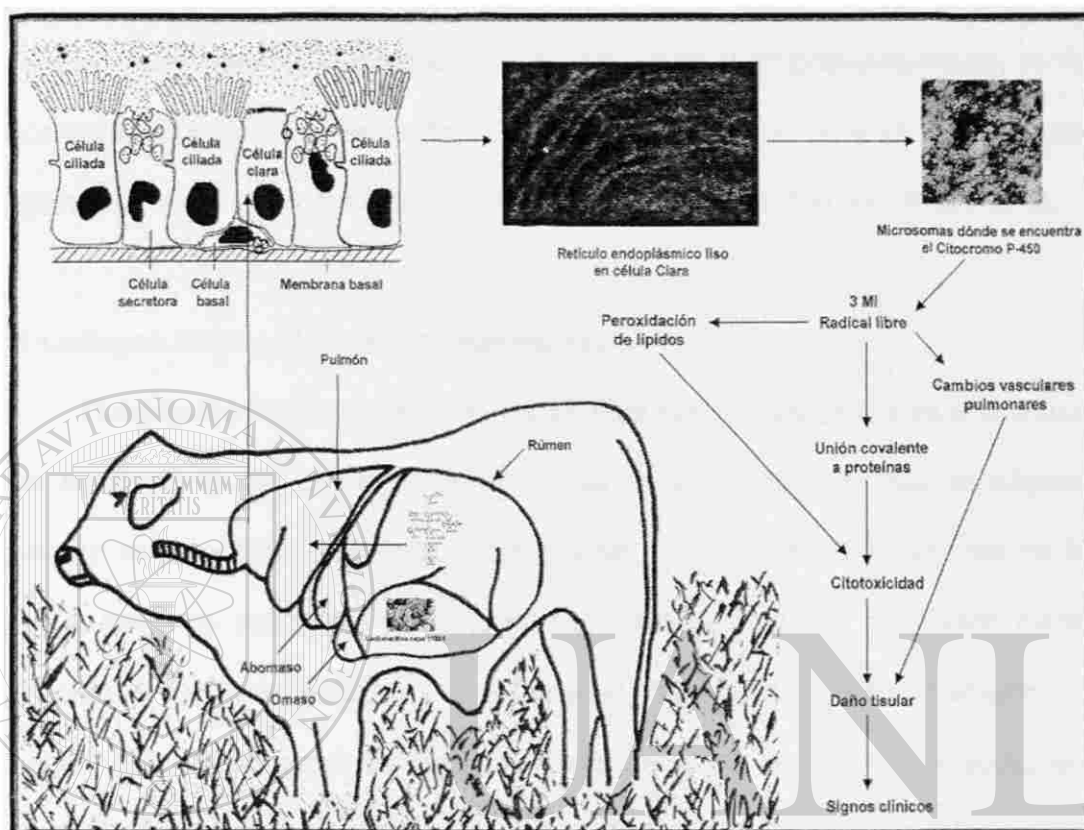


Figura 1. Representación esquemática de la patogénesis del Edema y Enfisema Pulmonar Agudo Bovino (EEPAB).

En algunos casos hay enfisema subcutáneo en la región dorsal ó ventral del tórax, además los roces pleurales son evidentes al auscultar animales convalecientes. Los animales menos afectados se recuperan de manera espontánea, después de un periodo de diez días aproximadamente (Ramírez, *et al.*, 1993).

Experimentalmente, los datos de los exámenes de gases sanguíneos muestran un decremento en la tensión sanguínea aórtica y un aumento en la tensión sanguínea venosa de flujo libre entre las seis y doce horas post-tratamiento. Además, existe un

incremento en la frecuencia cardiaca, mientras que la presión arterial pulmonar generalmente es pequeña y variable (Cornelius, *et al.*, 1979). Por otra parte, al realizar el examen para determinar la concentración del 3-metil indol post-tratamiento, se ha encontrado un incremento del mismo en plasma de (10.7 µg/ml) a las nueve horas seguido por una disminución (0.5 µg/ml) a las dieciocho horas (Carlson, *et al.*, 1972).

2.2 Lesiones macroscópicas y microscópicas

Durante el estudio post-mortem, las lesiones macroscópicas que se encuentran más comúnmente son: presencia de abundante espuma blanca en mucosa traqueal derivada de un edema pulmonar, los pulmones se muestran más grandes de lo normal, con una congestión intensa, marcado edema, con una coloración rojiza, consistencia firme, muy pesados y no colapsan al abrir cavidad torácica. Asimismo, se han descrito amplias áreas de enfisema intersticial en la porción dorso-caudal, las cuales llegan en muchos casos a formar bullas enfisematosas (Carlson, *et al.*, 1975;

Ramírez, *et al.*, 1993).

Las lesiones microscópicas características de este padecimiento son: congestión intersticial marcado, edema alveolar rico en proteína el cual al organizarse puede llegar a formar membranas hialinas en bronquiolos terminales, ductos alveolares y adosadas a las paredes de los mismos. Estas membranas se encuentran mezcladas con detritus que corresponden a células necróticas del epitelio alveolar y también a macrófagos alveolares (Ramírez, *et al.*, 1993). Existe una necrosis de las células epiteliales alveolares tipo I (neumocitos tipo I) debido a que estas células constituyen la mayor barrera permeable entre el intersticio pulmonar y el espacio alveolar.

LITERATURA REVISADA

Las células descamadas de este tipo son regeneradas rápidamente por las células epiteliales alveolares tipo II (neumocitos tipo II) hiperplásicas, lo que da un aspecto cuboidal al epitelio que recubre los alvéolos dando una apariencia de "epitelialización". Estos últimos cambios proliferativos predominan en los casos que presentan un curso más prolongado; asimismo, gran cantidad de macrófagos alveolares se encuentran reactivos acompañado por un infiltrado de tipo polimorfonuclear y mononuclear. Además, pueden apreciarse zonas de atelectasia y enfisema alveolar que llega a extenderse hasta los septos interlobulillares (Cornelius, *et al.*, 1979; Ramírez, *et al.*, 1993).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



2.3 Metabolismo y bioactivación del 3-metil indol

2.3.1 Características del Triptófano.

El Triptófano, es un compuesto heterocíclico, que se encuentra en pequeñas cantidades en muchas proteínas. Normalmente se conocen 2 isómeros de este aminoácido que son el D-triptófano (D-Trp) que no representa ningún tipo de riesgo en el metabolismo ruminal y el L-triptófano (L-Trp), también conocido como (1-alfa-aminoindol-3-ácido propiónico) cuya fórmula es (C₁₁H₁₂N₂O₂), el cual sí representa un riesgo para los rumiantes. Este compuesto está presente de manera natural en el forraje, encontrándose en gran cantidad en las plantas verdes, jugosas y tiernas (Ramírez, *et al.*, 1993).

2.3.2 Mecanismo de metabolismo y bioactivación del 3-metil indol.

Para que este producto empiece a ser tóxico, debe estar presente en la cavidad ruminal y se necesitan dos pasos importantes que son: a) la conversión del L-triptófano a ácido indol-acético por la presencia de ciertas bacterias ruminales y b) una especie de *Lactobacillus sp.*, es responsable para la formación del 3-metil indol a través de un proceso de descarboxilación (Honeyfield, *et al.*, 1990; Yokoyama, *et al.*, 1977; Yost, *et al.*, 1989). Se han mencionado al menos cinco especies bacterianas conocidas con capacidad de formar 3-metil indol que son *Lactobacillus sp.* cepa 11201, *Clostridium skatol*, *Clostridium nauseum*, *Rhizobium sp* y *Pseudomonas sp*, las cuales requieren de un medio anaeróbico para llevar a cabo dicho proceso (Honeyfield, *et al.*, 1990).

LITERATURA REVISADA

Una vez absorbido por vía sanguínea desde el tracto digestivo, el 3-metil indol es transportado hacia los pulmones en donde desencadenará neumotoxicidad, ya que este compuesto es específico de tejido. Esto, debido al sistema enzimático de la oxidasa de función mixta del retículo endoplásmico liso, la monooxigenasa del citocromo P-450, normalmente muy activo en las células Clara de los bronquiolos. En estas células se generan compuestos intermediarios electrofílicos muy reactivos y altamente tóxicos, capaces de ligarse a proteínas microsomales y producir daño tisular (Ramírez, *et al.*, 1993), el cual se observa por la alteración tan severa que ocurre al dañar las membranas biológicas. Debido a las propiedades lipofílicas que este compuesto tiene y que posiblemente estén involucradas en la formación del enfisema pulmonar al inmovilizar los leucocitos y degradar a las membranas celulares de los mismos, así como de los macrófagos alveolares y otras células (Acton, *et al.*, 1992). En el caso de los neumocitos tipo I, su alta susceptibilidad se debe a una relativa incapacidad para sintetizar concentraciones intracelulares elevadas de glutatión, el cual inhibe el efecto del 3-metil indol. Otras células dañadas son las células ciliadas del epitelio bronquiolar y células endoteliales, probablemente por simple difusión de las moléculas tóxicas reactivas (Ramírez, *et al.*, 1993).

2.4 Células Clara

2.4.1 Características de las células Clara.

Las células Clara, también conocidas como células epiteliales bronquiolares secretoras no ciliadas, las cuales se localizan sobre todo en los bronquios aunque también pueden encontrarse en la tráquea, tienen forma columnar y proyectan su citoplasma hacia la luz bronquial. Estas células, poseen mecanismos de secreción apocrinos y merocrinos, los cuales junto con el de los neumocitos tipo II, contribuye a la formación de la capa extracelular serosa peribronquiolar y posiblemente a la hipofase de la capa alveolar del surfactante (agente tensioactivo), por otro lado también poseen capacidad progenitora del epitelio bronquiolar con la facultad de diferenciarse en célula ciliada, célula caliciforme y posiblemente en célula cepillo (Trigo, T.F., 1998). Las células Clara son altamente metabólicas ya que poseen un abundante retículo endoplásmico liso, en donde se localizan las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 y juegan un papel muy importante en los procesos de detoxificación de sustancias extrañas, similar al papel que los hepatocitos juegan en el hígado (López, M.A., 1999). Al igual que las células epiteliales alveolares tipo II (neumocitos tipo II), las células Clara contienen altas concentraciones de enzimas monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, lo cual las hace muy susceptibles a la toxicidad por el 3-metil indol en cuanto a tiempo de exposición y concentración.

2.5 Justificación

Reproduciendo las lesiones tisulares y alteraciones celulares en el pulmón de borregos y ratas al inocular el tóxico 3-metil indol, comprenderemos los cambios morfológicos y patológicos que el compuesto provoca a nivel respiratorio en los animales expuestos. Estos modelos animales permitirán futuros estudios orientados tanto a la patogenia, como a la terapia del padecimiento neumónico tóxico más importante del ganado bovino.

2.6 Hipótesis

Las lesiones pulmonares inducidas experimentalmente al inocular el compuesto conocido como 3-metil indol en borregos y ratas, serán similares a las lesiones observadas en estudios previos en especies diferentes, tanto a nivel experimental como en casos naturales de campo.

2.7 Objetivo

Reproducir las lesiones tisulares y alteraciones celulares en el pulmón de borregos y ratas induciendo neumonía de tipo tóxico al inocular el neumotóxico conocido como 3-metil indol, comparándolas con lo reportado en la literatura en otras especies, al inducirla experimentalmente y en casos naturales de campo.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Selección y manejo de los animales para experimentación

Borregos: Fueron adquiridos en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, machos y con un peso inicial de aproximadamente diecisiete kilogramos. Todos los animales recibieron manejo adecuado de descanso y revisión clínica, proporcionándoles agua potable y alimento (pacas de alfalfa achicalada) *ad libitum* por aproximadamente tres días. Posteriormente se les realizaron exámenes clínicos de rutina (extracción de sangre para realizar estudio de hemograma y obtención de excremento para el examen coproparasitoscópico), con la finalidad de conocer el estado de salud de todos los animales. Subsecuentemente, los borregos fueron puestos en jaulas metabólicas individuales, identificándolos con números progresivos del uno al once. Todos los animales recibieron la misma dieta basada en alfalfa achicalada y permanecieron allí por aproximadamente un mes, hasta alcanzar un peso aproximado de veinte kilogramos. Al llegar a este peso, se programó el calendario de experimentación, con la finalidad de permitir la evolución de los cambios pulmonares acorde con lo recomendado con la literatura, se monitorearon durante el tiempo que duró la experimentación registrando cada uno de los cambios observados. Un día antes del sacrificio se les privó de alimento y agua, con la finalidad de no alterar el estudio post-mortem, ni la toma de muestras (Figura 2).

MATERIAL Y MÉTODOS



Figura 2. Adquisición y preparación de los borregos antes de la inoculación del 3-metil indol.

Ratas: Fueron adquiridas en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, estos animales eran de la línea genética Wistar, todos machos, con un peso aproximado de doscientos gramos. Estuvieron en observación durante dos días para descartar algún problema de tipo respiratorio ó digestivo y se les lotificó poniendo un par de animales por jaula. Recibieron agua y alimento comercial para animales de laboratorio. Se les dio un tiempo aproximado de dos semanas hasta alcanzar un peso aproximado de doscientos cincuenta gramos para iniciar la experimentación, según la literatura (Woods, *et al.*, 1999). Se usó el mismo protocolo que el de los borregos en cuanto a tiempo y observación de cambios en los animales y sacrificio. Las condiciones de higiene fueron estrictas, así como la administración del alimento y el agua que fueron hechos a la misma hora y con la cantidad recomendada, veinticuatro horas antes del sacrificio se les retiraron los suministros con la finalidad de no alterar el estudio post-mortem, ni la toma de muestras (Figura 3).



Figura 3. Adquisición y preparación de las ratas antes de la inoculación del 3-metil indol.

3.2 Inducción de la neumonía tóxica por inoculación del 3-metil indol

Borregos: Una vez que los animales llegaron a pesar veinte kilogramos, se les preparó para proceder a la inoculación vía intravenosa con el compuesto conocido como 3-metil indol (3-MI; skatole) de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) (Figura 4). Cada animal recibió una dosificación de 50 mg / kg de su peso vivo, diluido en propilenglicol de Fisher Scientific (New Jersey, N.J.), a una concentración de 110 mg de 3-metil indol / 9 ml de propilenglicol, siguiendo lo recomendado en la literatura (Popp, *et al.*, 1998). Esta técnica de inoculación elegida representa un fácil manejo de los animales, así como una excelente comodidad para el operador (Figura 5). Los animales recibieron dos inoculaciones alternadas por veinticuatro horas, tiempo en el cual se les observaron los cambios que manifestaron mientras duró el experimento, el cual fué de noventa y seis horas después de la primera inoculación, tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Tabla cronológica de inoculación de 3-metil indol, propilenglicol y solución salina fisiológica en borregos

| Borrego | 1ª Inoculación Día 0 | 2ª Inoculación 24 hrs | 48 hrs | 72 hrs | 96 hrs |
|---------|-------------------------|--------------------------|--------|--------|------------|
| 1 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 2 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 3 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 4 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 5 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 6 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 7 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 8 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 9 | PG | PG | — | — | SACRIFICIO |
| 10 | PG | PG | — | — | SACRIFICIO |
| 11 | SSF | SSF | — | — | SACRIFICIO |

Dosis inoculada vía intravenosa a grupo experimental = 110 mg de 3-metil indol / 9 ml de propilenglicol.

Dosis inoculada vía intravenosa a grupo control de propilenglicol = 9 ml.

Dosis inoculada vía intravenosa a grupo control de solución salina fisiológica = 9 ml.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ratas: Los animales al llegar a pesar doscientos cincuenta gramos, fueron separados para que recibieran sus respectivas inoculaciones por vía intraperitoneal de 3-metil indol diluido en propilenglicol. Esta técnica de inoculación se eligió por su gran comodidad para los animales y fácil manejo para el operador (Figura 6). A cada rata se le aplicaron dos dosis alternadas por veinticuatro horas, tiempo en el cuál se observaron los cambios que los animales manifestaron durante la fase de experimentación, el cual fué de noventa y seis horas después de la primera inoculación, tal como se muestra en la Tabla 2.



Figura 4. Presentación en polvo del 3-metil indol (3-MI; skatole) de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

Tabla 2

Tabla cronológica de inoculación de 3-metil indol, propilenglicol y solución salina fisiológica en ratas

| Rata | 1ª Inoculación Día 0 | 2ª Inoculación 24 hrs | 48 hrs | 72 hrs | 96 hrs |
|------|-------------------------|--------------------------|--------|--------|------------|
| 1 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 2 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 3 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 4 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 5 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 6 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 7 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 8 | 3 MI | 3 MI | — | — | SACRIFICIO |
| 9 | PG | PG | — | — | SACRIFICIO |
| 10 | PG | PG | — | — | SACRIFICIO |
| 11 | SSF | SSF | — | — | SACRIFICIO |

Dosis inoculada vía intraperitoneal a grupo experimental = 62.5 mg de 3-metil indol / 0.9 ml de propilenglicol.

Dosis inoculada vía intraperitoneal a grupo control de propilenglicol = 0.9 ml.

Dosis inoculada vía intraperitoneal a grupo control de solución salina fisiológica = 0.9 ml.

MATERIAL Y MÉTODOS

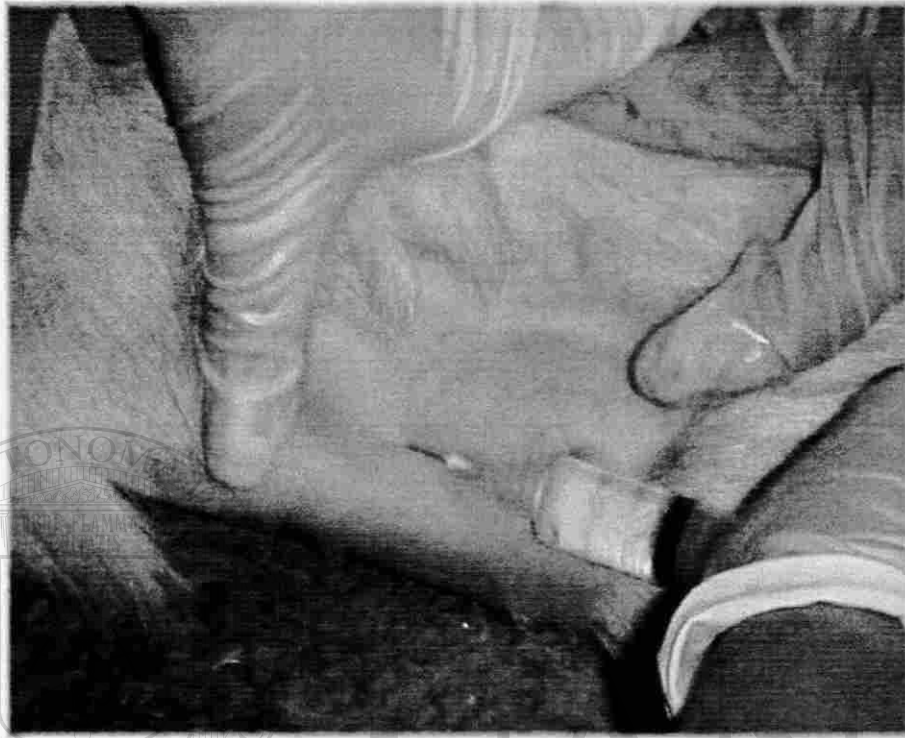


Figura 5. Inoculación del 3-metil indol por vía intravenosa en borrego.

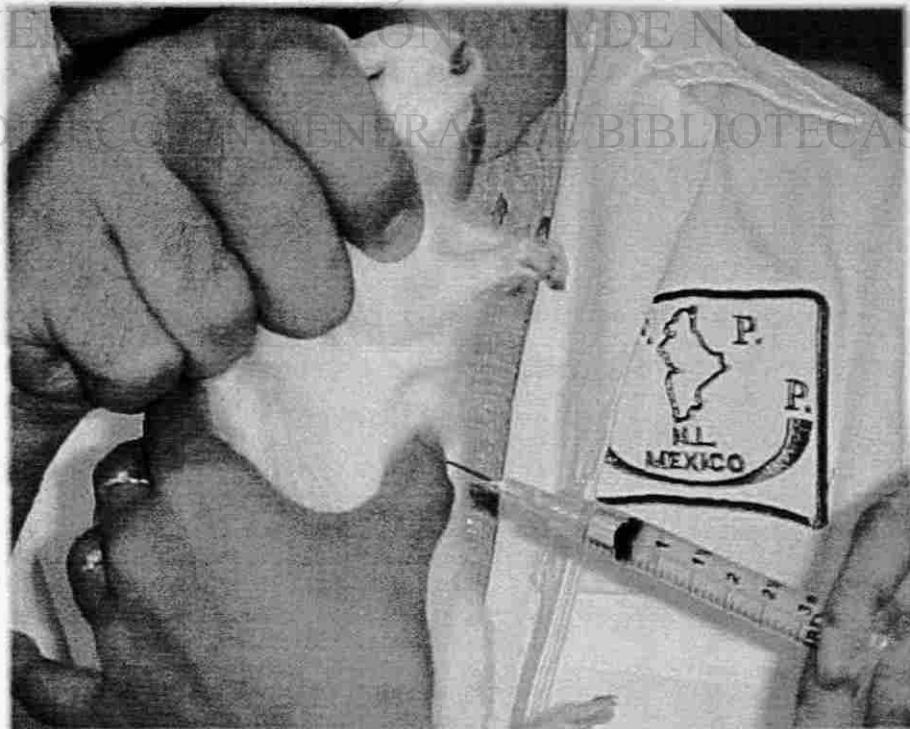


Figura 6. Inoculación del 3-metil indol por vía intraperitoneal en rata.

3.3 Sacrificio de los animales y realización de las necropsias

Borregos y ratas: Una vez concluidas las noventa y seis horas después de la primera inoculación se procedió a sacrificar a los animales. Para ello se utilizó el tranquilizante xilacina (Fort-Dodge) y posteriormente se les aplicó una sobredosis de pentobarbital sódico (Pfizer). Inmediatamente se llevaron a cabo los estudios post-mortem correspondientes a cada animal, siguiendo los protocolos para cada una de las especies, siendo los hallazgos más importantes los que se presentaron a nivel respiratorio (Figura 7).



Figura 7. Realización de los estudios post-mortem en borregos y ratas.

3.4 Selección y procesamiento de las muestras

Inmediatamente después de la muerte de cada animal y una vez extraído el aparato respiratorio, se tomaron varias porciones de los lóbulos diafragmáticos en el caso de los borregos, mientras que con las ratas se escogieron cortes de los lóbulos medio y diafragmáticos, debido a que en éstas porciones es dónde las lesiones fueron más aparentes (Figura 8). Una vez tomadas las muestras, éstas fueron colocadas en frascos con formol al 10% bufferado previamente identificados, dejándose fijar por un lapso de setenta y dos horas, esto con la finalidad de que la fijación fuese lo más homogénea posible, para posteriormente continuar el proceso rutinario de embebido en parafina, en el histoquinete. Las muestras se procesaron rutinariamente y se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina (H&E).

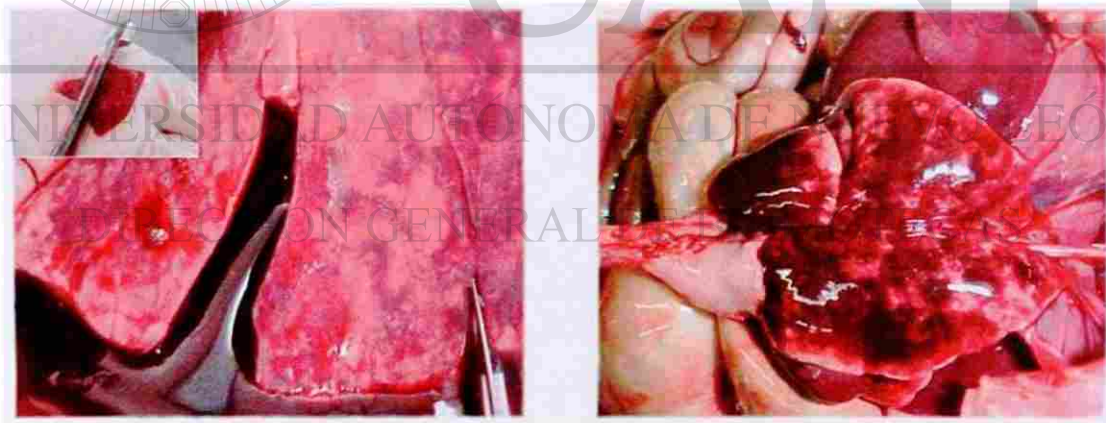


Figura 8. Selección y manejo de las muestras de tejido pulmonar de los borregos y las ratas.

4 RESULTADOS

4.1 Lesiones macroscópicas

Borregos: Los animales designados del uno al ocho, recibieron el neumotóxico conocido como 3-metil indol junto con el vehículo propilenglicol. Las lesiones más relevantes se presentaron a nivel respiratorio, en donde se apreció a nivel traqueal la presencia de abundante espuma de color blanco (Figura 9). Los pulmones mostraban una congestión generalizada y severo edema intersticial, el cual se apreciaba por el cambio de coloración del parénquima pulmonar a un rojo oscuro muy intenso, a su consistencia firme, a la superficie lisa y su peso, el cual era manifiesto a la hora de extraer los órganos de la cavidad torácica (Figura 10). Por otro lado, en los órganos de los otros sistemas no se observaron cambios aparentes, salvo los animales uno y dos, los cuales presentaron hemoglobinuria. Los animales identificados como nueve y diez, a los que solamente se les administró el vehículo propilenglicol, uno de ellos el nueve también presentó hemoglobinuria (Figura 11). El animal control número once al que nada más se le administró solución salina fisiológica, fué reportado sin cambios patológicos aparentes (Figura 12).

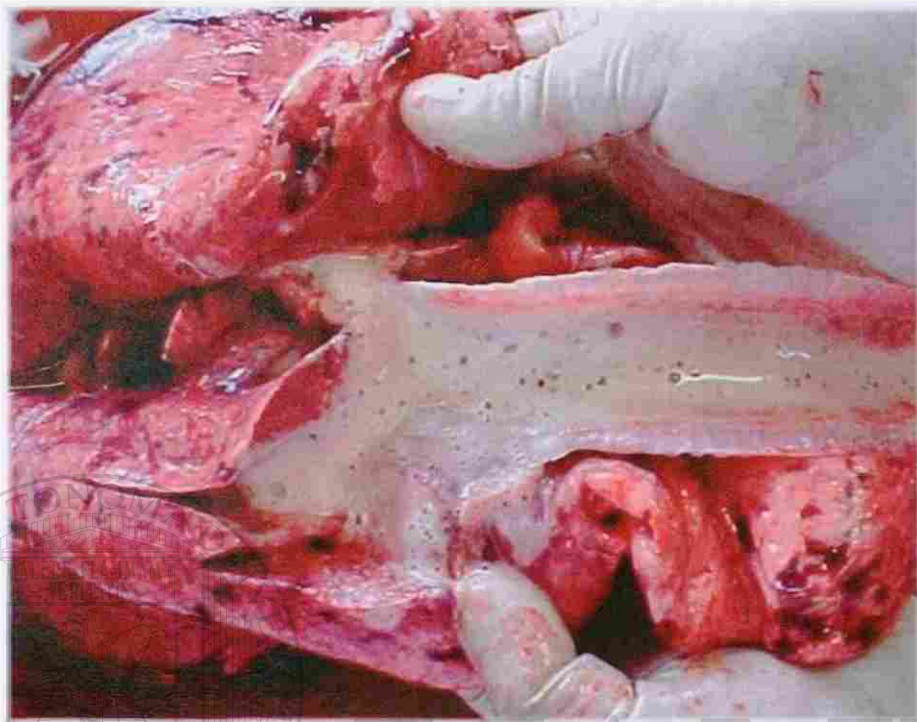


Figura 9. Tráquea con presencia de abundante espuma de color blanco difuso en borrego inoculado con 3-metil indol.

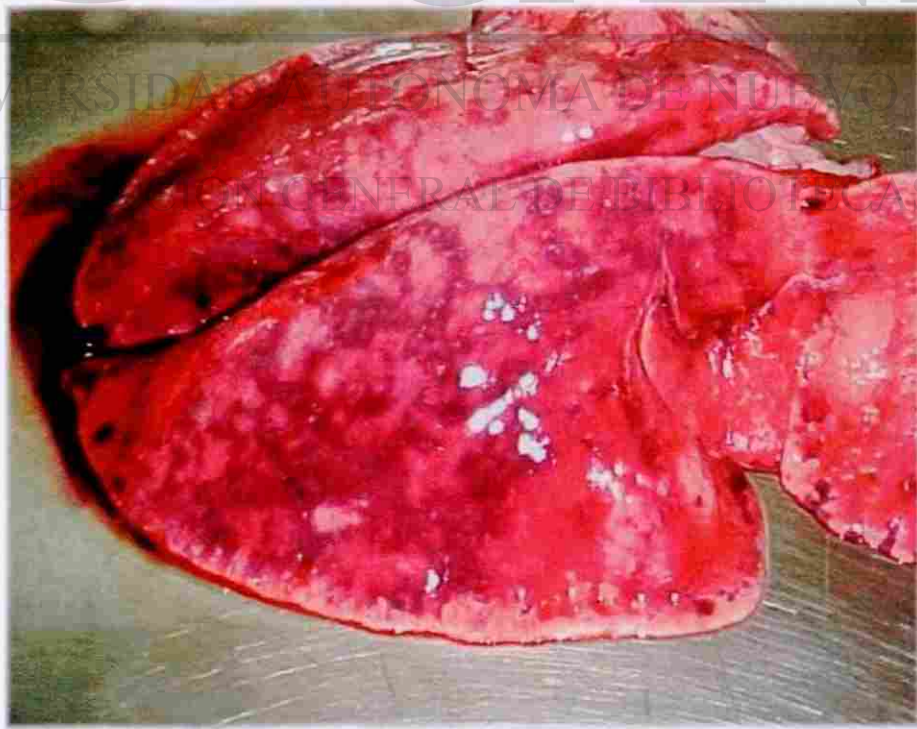


Figura 10. Pulmón con congestión y edema intersticial severo difuso en borrego inoculado con 3-metil indol.

RESULTADOS .



Figura 11. Presencia de hemoglobinuria en aspirado de vejiga urinaria.

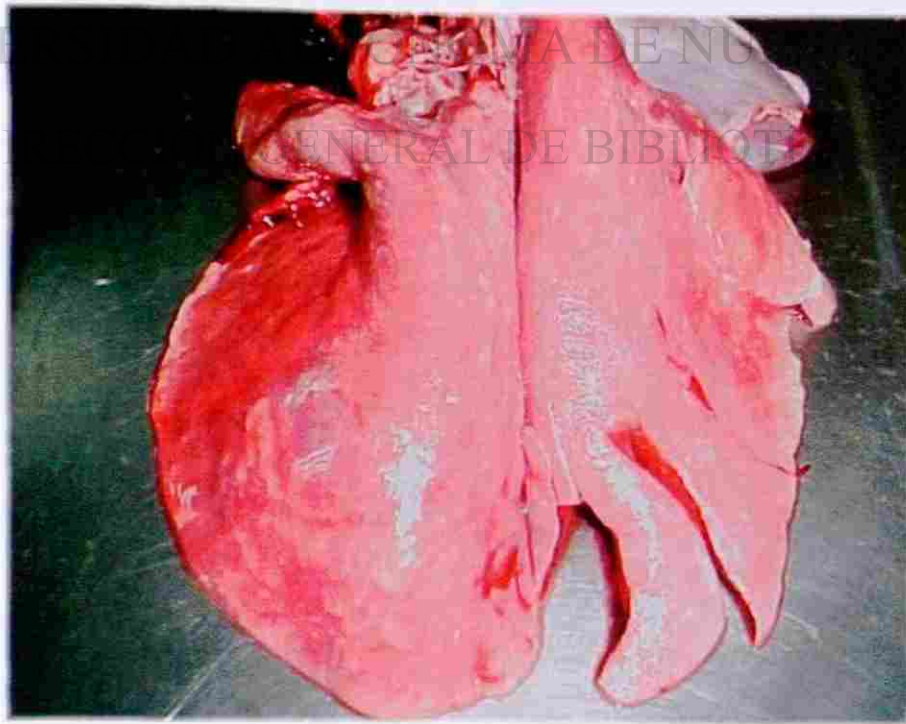
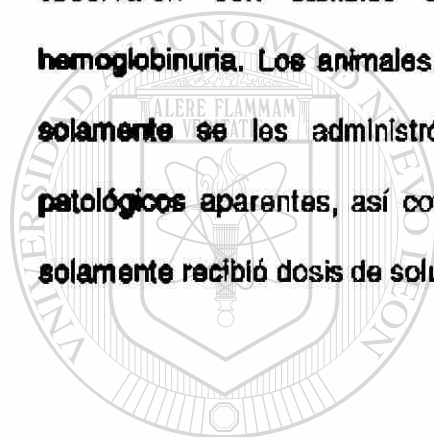


Figura 12. Pulmón del borrego inoculado con solución salina fisiológica.

RESULTADOS

Ratas: Los animales identificados del uno al ocho se les inoculó el 3-metil indol junto con el vehículo propilenglicol, las lesiones que presentaron con mayor relevancia fue a nivel respiratorio, en donde se apreció a los pulmones con una congestión marcada y severo edema intersticial, el cual se apreciaba por el cambio de coloración a un rojo oscuro muy intenso, consistencia firme, superficie lisa y aumento de peso, cambio observado en el momento de extraer los órganos de la cavidad torácica (Figuras 13 y 14). Por otro lado, el resto de los órganos de los otros sistemas no se observaron con cambios aparentes. Ninguno de los animales presentaron hemoglobinuria. Los animales designados con los números nueve y diez, a los que solamente se les administró el vehículo propilenglicol, no mostraron cambios patológicos aparentes, así como al animal identificado con el número once el cual solamente recibió dosis de solución salina fisiológica (Figuras 15 y 16).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

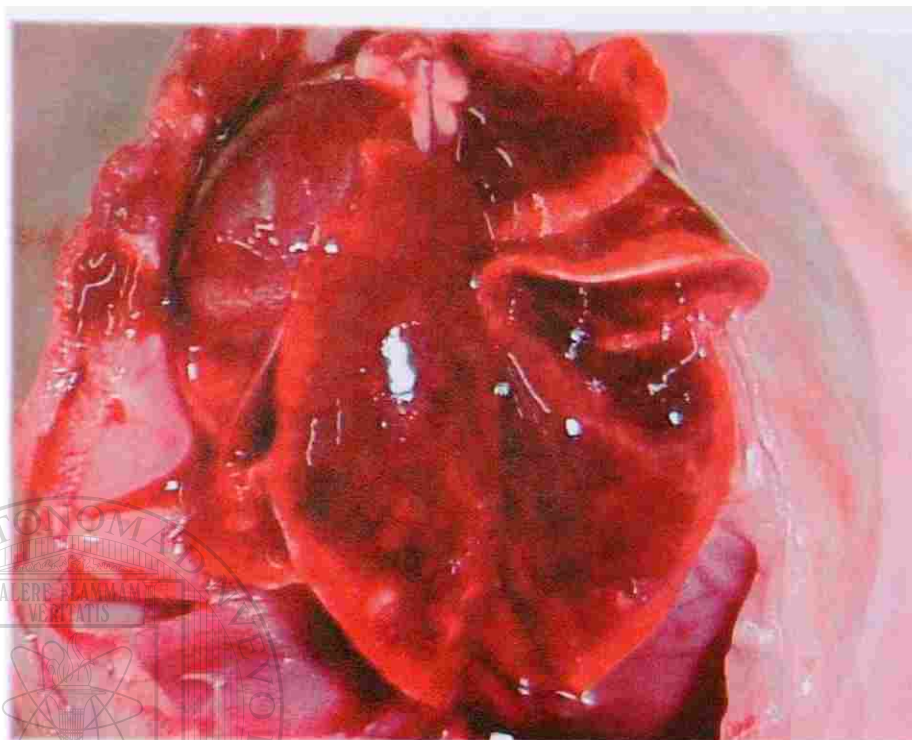


Figura 13. Congestión y edema pulmonar severo difuso en rata inoculada con 3-metil indol. Vista dorsal.

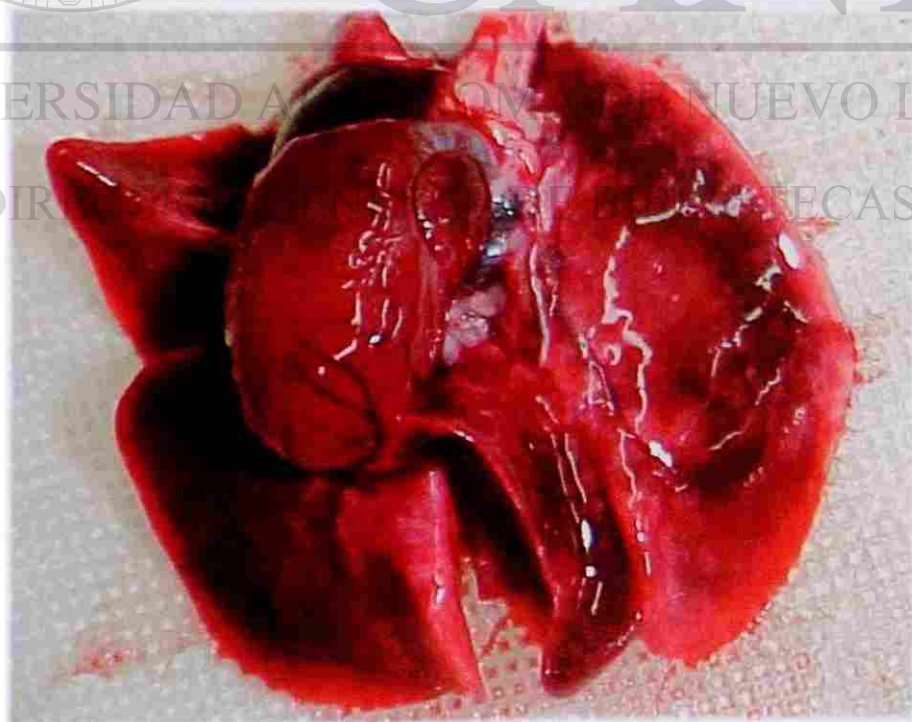


Figura 14. Congestión y edema pulmonar severo difuso en rata inoculada con 3-metil indol. Vista ventral.

RESULTADOS

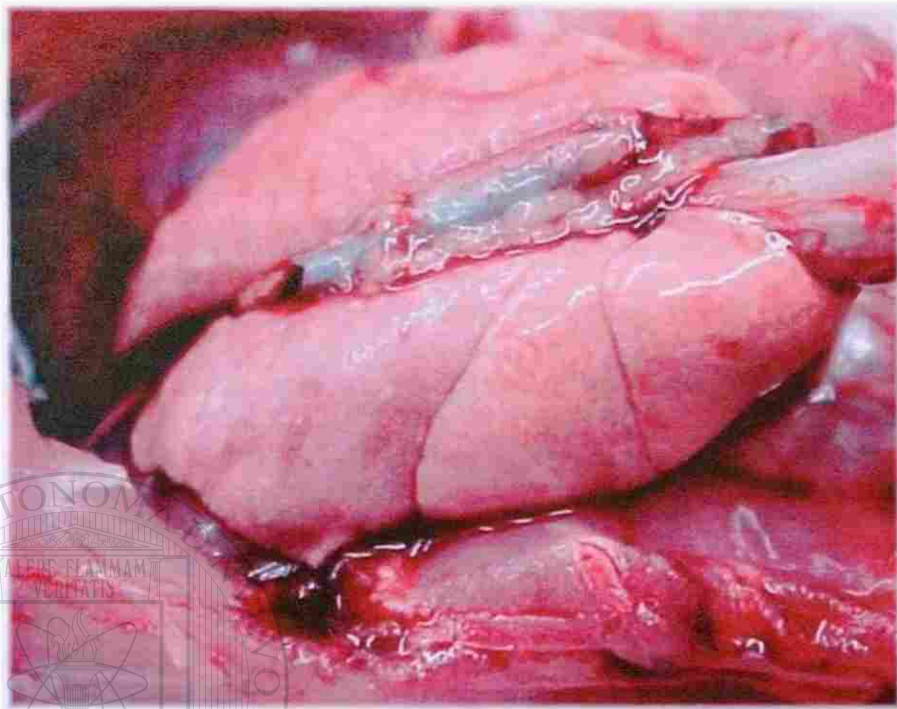


Figura 15. Pulmón normal en rata inoculada con propilenglicol.



Figura 16. Pulmón normal en rata inoculada con solución salina fisiológica.

4.2 Lesiones microscópicas

Borregos: Los animales identificados del uno al ocho, aquellos que recibieron la inoculación con el neumotóxico 3-metil indol, a nivel pulmonar presentaron en el parénquima, marcado engrosamiento de los septos alveolares, reducción severa en el espacio aéreo de los mismos los cuales se encuentran ocupados en su gran mayoría por una gran cantidad de material proteináceo eosinofílico (Figura 17), mucho del cual se encuentra adosado a las paredes alveolares formando membranas hialinas (Figura 18), así como hiperplasia marcada de células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I y II) conocida también como epitelialización (Figura 19). Además de un infiltrado inflamatorio compuesto por células de tipo mononuclear principalmente linfocitos y macrófagos (Figura 20), muchos de los cuales se encuentran distribuidos en el interior de los sacos alveolares apreciándose dentro de su citoplasma gran cantidad de eritrocitos y pigmento hemático (eritrofagia y hemosiderosis) además de algunos neutrófilos, por otro lado se observa una congestión y edema intersticial severo difuso.

A nivel de los bronquios y bronquiolos se aprecia hiperplasia marcada del epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado con presencia de eritrocitos y material proteináceo eosinofílico en su interior, mientras que a nivel periférico se observa reactividad linfoide de los acúmulos linfoides. Asimismo, numerosos vasos sanguíneos se observan con edema perivascular moderado, degeneración fibrinoide moderado y microtrombosis, así como numerosos focos de hemorragias marcadas, áreas múltiples de enfisema marcado y formación de sincicios.

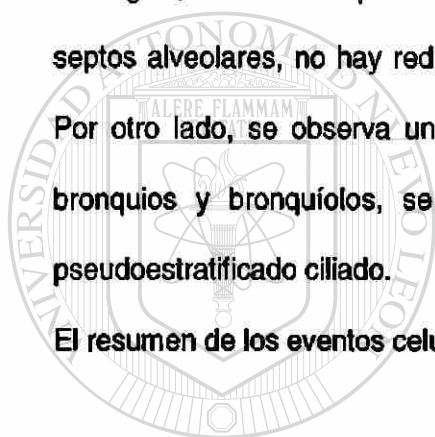
Los animales nueve y diez, los cuales solamente recibieron el vehículo propilenglicol mostraron a nivel del parénquima pulmonar discreto engrosamiento de los septos alveolares, reducción discreta en el espacio aéreo de los mismos, además

RESULTADOS

de un leve infiltrado inflamatorio compuesto por células de tipo mononuclear principalmente linfocitos y macrófagos, por otro lado se observa una congestión discreta difusa y áreas de enfisema discreto (Figura 21). Mientras que a nivel periférico se observa reactividad linfoide discreta de los acúmulos linfoides, asimismo, numerosos vasos sanguíneos se aprecian con edema perivascular discreto y dilatación de los vasos linfáticos.

El animal identificado como once, el cual recibió solamente solución salina fisiológica, a nivel del parénquima pulmonar no se aprecia engrosamiento de los septos alveolares, no hay reducción en el espacio aéreo de los mismos (Figura 22). Por otro lado, se observa una congestión discreta difusa, así como a nivel de los bronquios y bronquiolos, se aprecia discreta descamación del epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado.

El resumen de los eventos celulares antes descritos puede apreciarse en la Tabla 3.



U.A.N.L.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



RESULTADOS

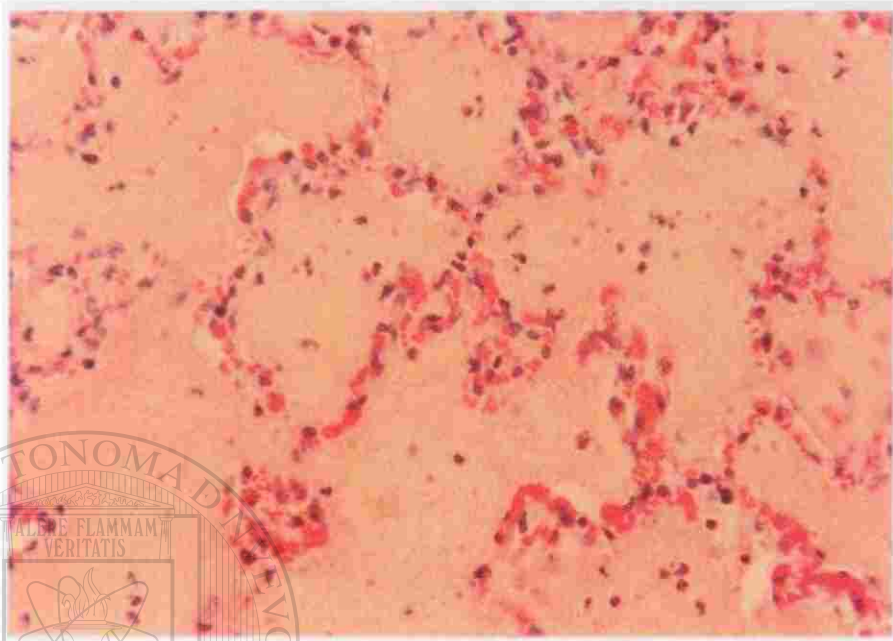


Figura 17. Edema y congestión pulmonar severo difuso en borrego inoculado con 3-metil indol. 40X

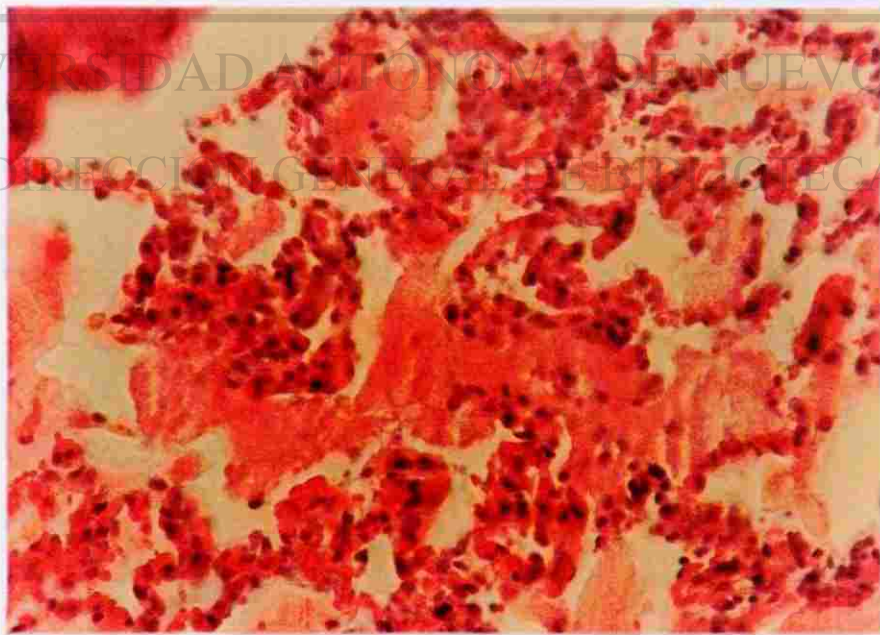


Figura 18. Presencia de membranas hialinas en intersticio pulmonar en borrego inoculado con 3-metil indol. 40X

RESULTADOS

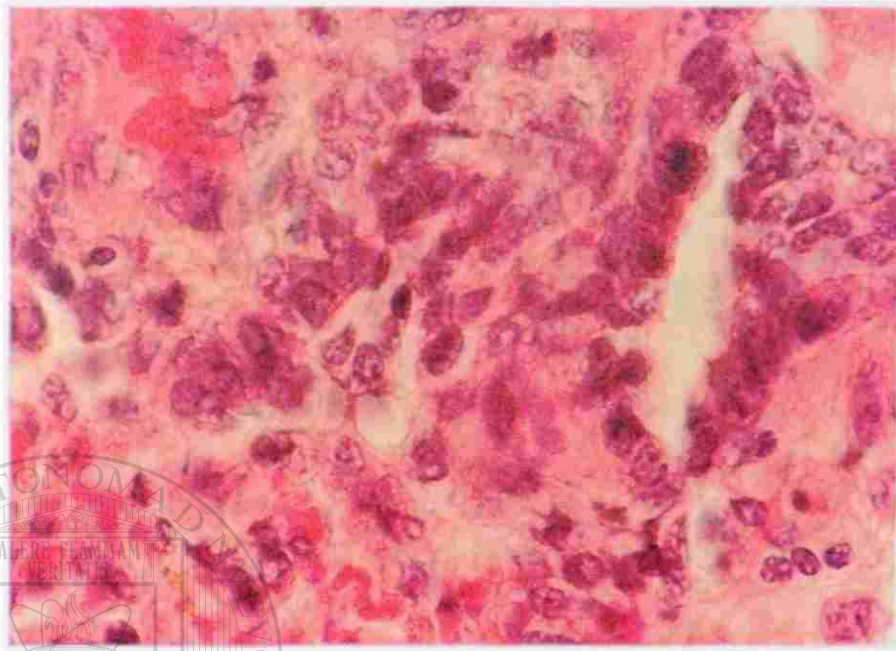


Figura 19. Hiperplasia de neumocitos tipo II (epitelialización) en borrego inoculado con 3-metil indol. 100X

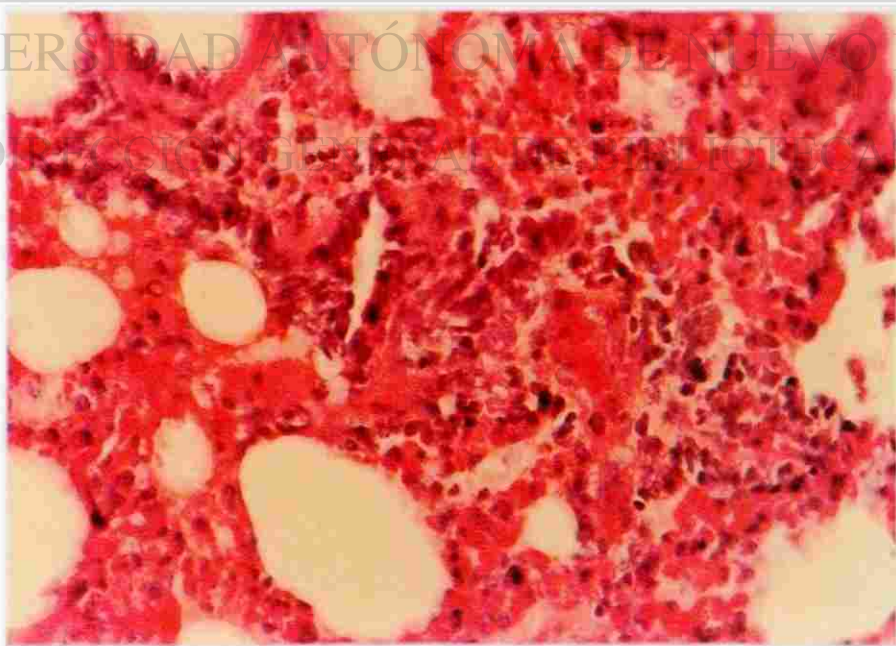


Figura 20. Engrosamiento alveolar marcado con presencia de infiltrado inflamatorio compuesto por células mononucleares en borrego inoculado con 3-metil indol. 40X

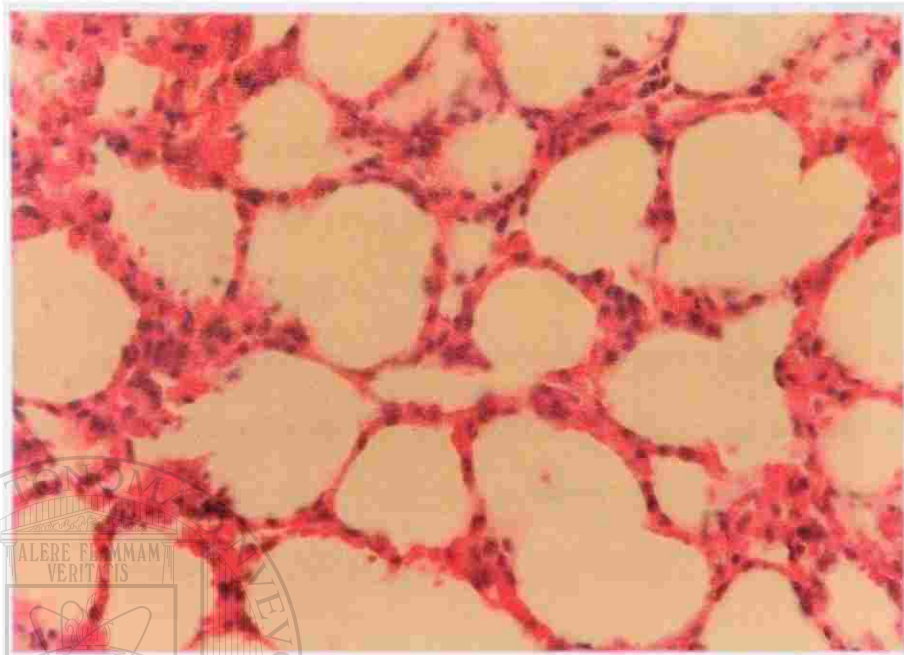


Figura 21. Congestión discreta en alvéolos de borrego inoculado con propilenglicol. 40X

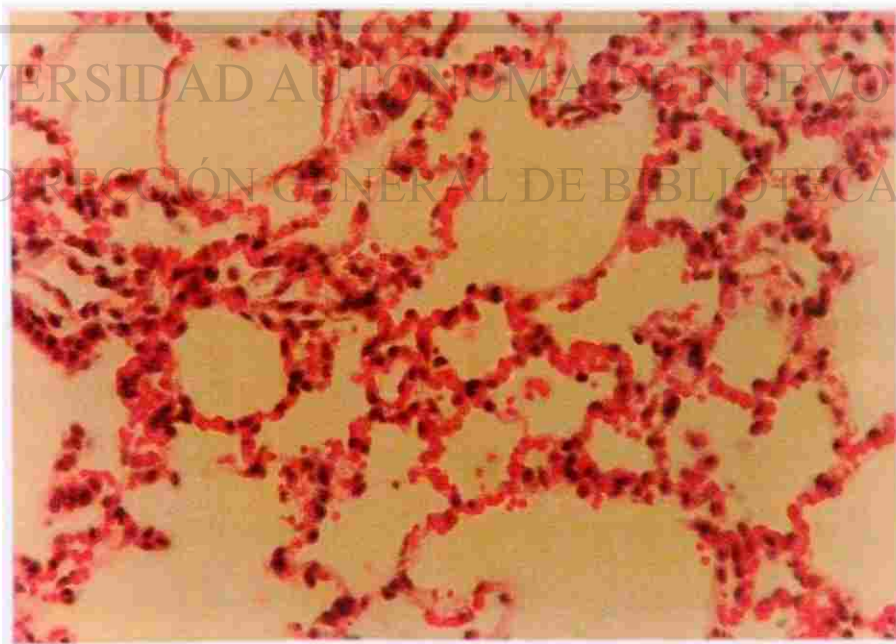


Figura 22. Alvéolos normales en borrego inoculado con solución salina fisiológica. 40X

RESULTADOS

Ratas: Los animales que recibieron dosis repetidas de 3-metil indol identificados del uno al ocho, a nivel del parénquima pulmonar se observaron con marcado engrosamiento de los septos alveolares, reducción marcada en el espacio aéreo de los mismos, los cuales se encuentran ocupados en su gran mayoría por una gran cantidad de material proteináceo eosinofílico, así como una congestión y edema intersticial severo difuso (Figura 23). Por otro lado, se aprecia gran cantidad de macrófagos que contienen en su interior abundante material granular de color rojo (eritrofagia) (Figura 24), además de observarse hiperplasia de células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I y II) llamado epitelialización (Figura 25). Asimismo, se aprecia un infiltrado inflamatorio compuesto por células de tipo mononuclear principalmente linfocitos y macrófagos. En bronquios y bronquiolos, algunas zonas presentan marcada descamación del epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado con presencia de eritrocitos, mientras que en otros hay hiperplasia marcada del mismo y a nivel periférico se observa reactividad linfóide de los acúmulos linfóides. Alrededor de los vasos sanguíneos se observa edema perivascular marcado y a nivel de las arteriolas, estas se aprecian muy engrosadas en su parte media y con reducción de su luz (vasoconstricción), algunas más presentan microtrombosis.

Por otro lado, se encuentran a muchos alvéolos con rompimiento severo observándose grandes espacios (enfisema), además de apreciarse múltiples focos de hemorragias marcadas (Figura 26).

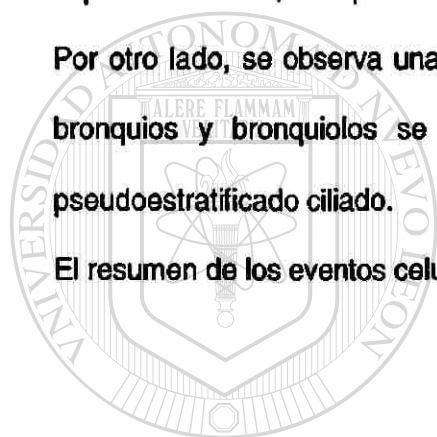
Los animales identificados como nueve y diez, los cuales solamente recibieron el vehículo propilenglicol, mostraron a nivel del parénquima pulmonar engrosamiento discreto de los septos alveolares, ligera reducción en el espacio aéreo de los mismos, además de un leve infiltrado inflamatorio compuesto por células de tipo mononuclear

RESULTADOS

principalmente linfocitos y macrófagos. Por otro lado, se observa una congestión discreta difusa y áreas de enfisema discreto (Figura 27), mientras que a nivel periférico se observa reactividad linfoide discreta de los acúmulos linfoides, asimismo, numerosos vasos sanguíneos se aprecian con edema perivascular discreto y dilatación de los vasos linfáticos.

El animal identificado como once, el cual recibió solamente solución salina fisiológica, a nivel del parénquima pulmonar no se observa engrosamiento de los septos alveolares, el espacio aéreo de los sacos alveolares no se aprecian reducidos. Por otro lado, se observa una congestión discreta difusa (Figura 28), a nivel de los bronquios y bronquiolos se aprecia discreta descamación del epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado.

El resumen de los eventos celulares antes descritos puede apreciarse en la Tabla 4.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

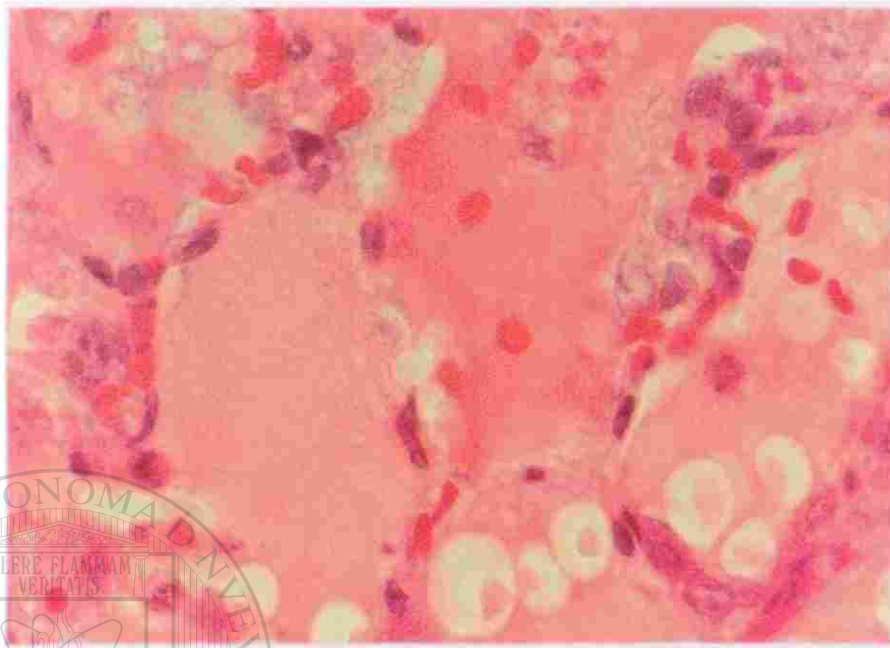


Figura 23. Edema intersticial severo difuso en pulmón de rata inoculada con 3-metil indol. 100X

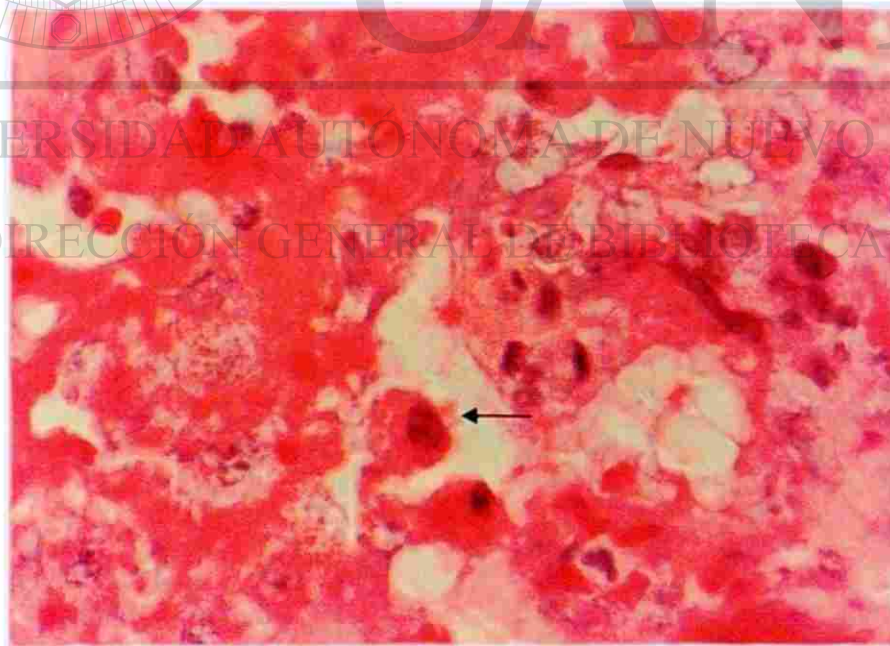


Figura 24. Macrófagos alveolares fagocitando eritrocitos (eritrofagia). Véase la flecha. 100X

RESULTADOS

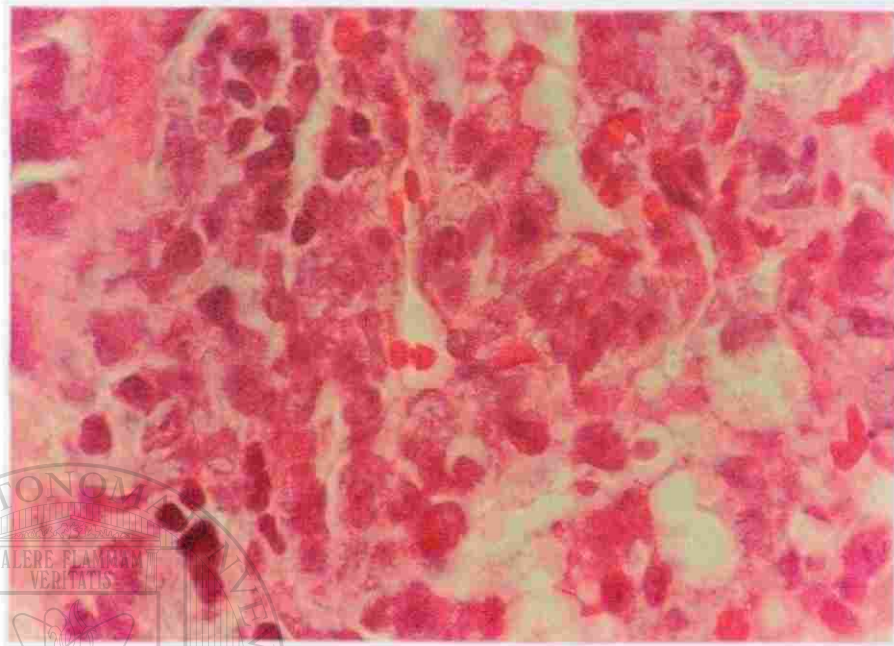


Figura 25. Hiperplasia de neumocitos tipo I y II (epitelialización). 100X

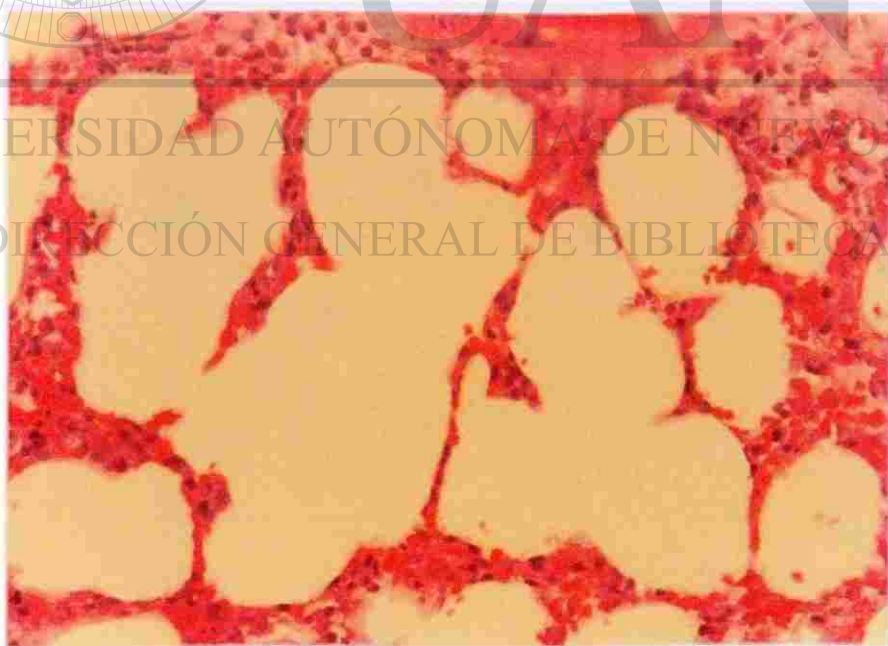


Figura 26. Enfisema intersticial severo. 40X

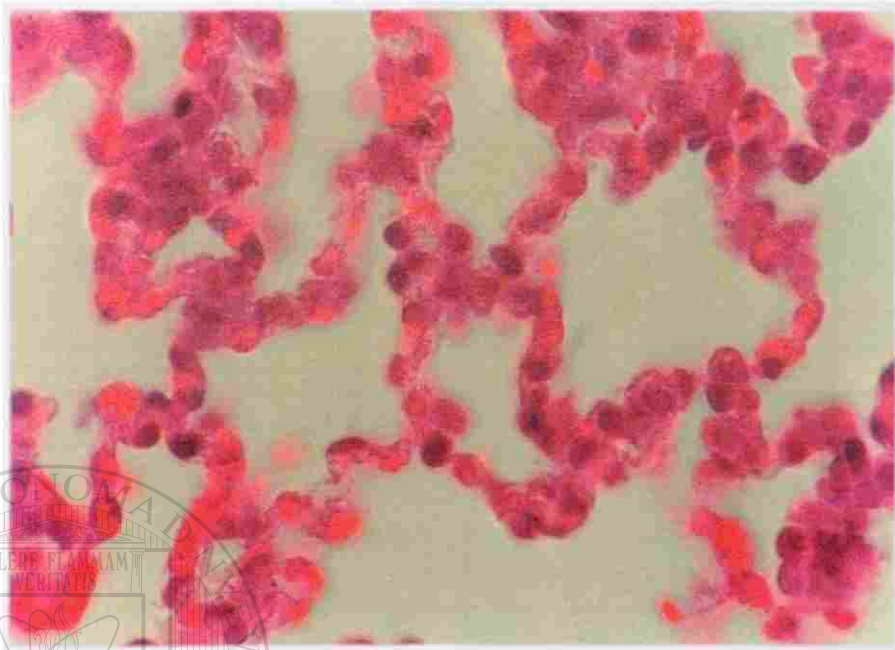


Figura 27. Engrosamiento alveolar discreto y congestión discreta difusa en rata inoculada con propilenglicol. 100X

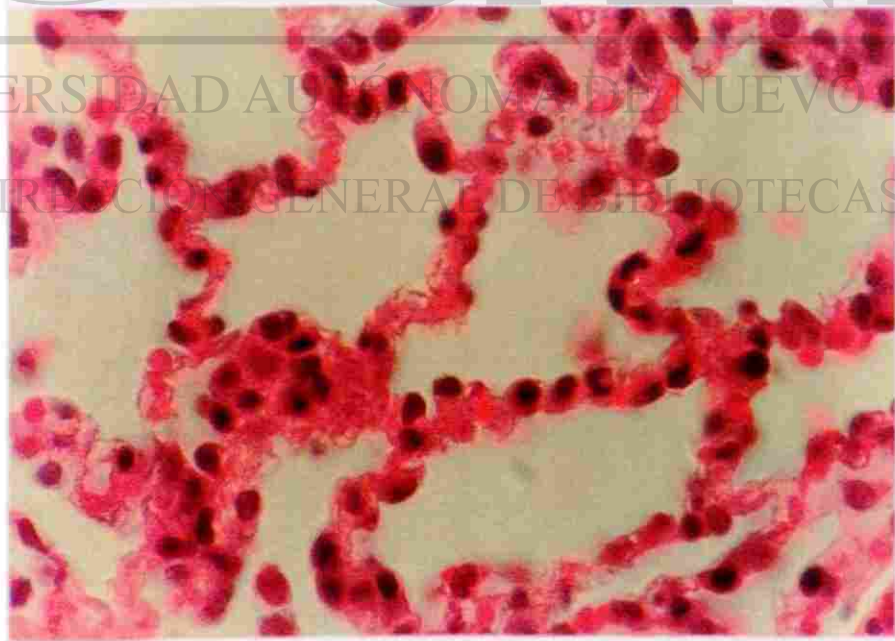


Figura 28. Sacos alveolares y espacios aéreos normales en rata inoculada con solución salina fisiológica. 100X

RESULTADOS

Tabla 3

Lesiones microscópicas de los borregos tratados con 3-metil-indol, propilenglicol y solución salina fisiológica

| Temp | Epitelio intestinal | Mucosa gástrica | Capítulo y colon cecales | Estómago | Intestino delgado (1 y 2) | Intestino grueso (3, 4, 5 y 6) | Esófago | Tronco de pulmón | Alveolos pulmonares | Hígado | Testículos | Glándula pituitaria | Testículo | Prostata y vesícula seminal | Penis | Uteros | Placenta de feto | Feto |
|---------|---------------------|-----------------|--------------------------|----------|---------------------------|--------------------------------|---------|------------------|---------------------|--------|------------|---------------------|-----------|-----------------------------|-------|--------|------------------|------|
| 1 (3M) | √√ | √ | √√ | √√ | √ | √ | - | √ | √ | √ | - | - | √√ | - | √ | - | - | - |
| 2 (3M) | √√ | √√ | √√ | √√ | √ | √ | √√ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √√ | - | √ | - | - |
| 3 (3M) | √√ | √ | √ | - | √ | √ | - | √ | √ | - | - | √√ | √ | - | - | √ | - | - |
| 4 (3M) | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √ | - | √ | √ | √ | - | - | √√ | - | - | - | - | √√ |
| 5 (3M) | √√ | √√ | √√ | √√ | - | √√ | - | √ | √ | √ | - | - | √√ | √ | √ | - | - | √ |
| 6 (3M) | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | - | √ | √√ | - | √√ | - | √√ | √√ | √ | - | - | √ |
| 7 (3M) | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √ | √ | √ | - | √ | - | √ | - | √ | - | - | - |
| 8 (3M) | √√ | √√ | √ | √√ | √ | √√ | - | √ | √ | - | √ | - | √ | - | √ | - | - | - |
| 9 (PG) | √ | √ | √ | - | √ | √ | - | √ | √ | - | √ | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 (PG) | √ | √ | √ | - | √ | √ | - | √ | √√ | - | √ | - | √ | - | √ | - | - | - |
| 11 (SB) | - | - | - | - | - | - | √ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

√ = Discreto
√√ = Moderado
√√√ = Severo

Tabla 4

Lesiones microscópicas de las ratas tratadas con 3-metil indol, propilenglicol y solución salina fisiológica

| Ant | Epitelio intestinal | Mucosa gástrica | Capítulo y colon cecales | Estómago | Intestino delgado (1 y 2) | Intestino grueso (3, 4, 5 y 6) | Esófago | Tronco de pulmón | Alveolos pulmonares | Hígado | Testículos | Glándula pituitaria | Testículo | Prostata y vesícula seminal | Penis | Uteros | Placenta de feto | Feto |
|---------|---------------------|-----------------|--------------------------|----------|---------------------------|--------------------------------|---------|------------------|---------------------|--------|------------|---------------------|-----------|-----------------------------|-------|--------|------------------|------|
| 1 (3M) | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | - | √√ | - | √√ | - | - | - |
| 2 (3M) | √ | √√ | √ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | - | - | - | √√ | - | - |
| 3 (3M) | √√ | √ | √ | - | √√ | √√ | - | √√ | √√ | - | √√ | √√ | - | - | - | - | - | - |
| 4 (3M) | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | - | √√ | - | √√ | √√ | - | √√ | - | - | - | - | - |
| 5 (3M) | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √ | √√ | √√ | - | √√ | √ | √√ | - | - | - |
| 6 (3M) | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | √√ | - | √√ | √ | - | √√ | - | √√ | - | √√ | - | - | - |
| 7 (3M) | √ | - | √ | √√ | √√ | √√ | - | √√ | √ | - | √√ | - | √√ | - | √√ | - | - | - |
| 8 (3M) | √√ | - | √√ | √√ | √√ | √√ | - | √√ | √√ | √√ | √√ | - | √√ | - | √√ | - | - | - |
| 9 (PG) | √ | - | √ | - | √ | √ | - | √√ | - | - | - | - | √ | - | - | - | - | - |
| 10 (PG) | √ | - | √ | - | √ | √ | - | √√ | - | - | - | - | √ | - | - | - | - | - |
| 11 (SB) | - | - | - | - | - | - | √ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

√ = Discreto
√√ = Moderado
√√√ = Severo

5 DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

En el presente experimento se han logrado reproducir con confiabilidad las lesiones tisulares y las alteraciones celulares características que se observan en casos naturales de neumotoxicidad por 3-metil indol en bovinos. El reporte original de esta enfermedad de los bovinos en México, además de describir con detalle el tipo de lesión pulmonar característico de este padecimiento, también recalca la hiperplasia de células del epitelio alveolar, principalmente neumocitos de tipo II y células epiteliales del bronquiolo. Igualmente, describe un marcado edema alveolar rico en proteína y la formación de membranas hialinas (Ramírez, *et al.*, 1993). Estos cambios han sido reproducidos en diferentes modelos experimentales en bovinos, ovinos y cabras (Carlson, *et al.*, 1972, Dickinson, *et al.*, 1976, Popp, *et al.*, 1998). Todas estas lesiones fueron reproducidas en nuestro modelo en ovinos, pero además se observó eritrofagia. Excepto por este hallazgo, la reproducibilidad de las lesiones y la intensidad de las mismas concuerda con la literatura (Popp, *et al.*, 1998). Es posible que la eritrofagia corresponda con un daño súbito y severo al componente endotelio-membrana basal-epitelio, lo que ocasionó diapedéisis y salida de eritrocitos (Trigo.T.F., 1998).

En lo que corresponde a nuestro modelo en roedores, es digno de mencionar que las lesiones provocadas también corresponden tanto en sus características como en su severidad, con lo observado en casos naturales de la enfermedad en bovinos. En efecto, en las ratas inoculadas con 3-metil indol, también se observó hiperplasia del epitelio alveolar y bronquiolar, edema rico en proteína y formación de membranas hialinas. En estos animales también se observó eritrofagia, tal y como se reconoció en ovinos. Por otra parte, cabe señalar que en otros modelos en roedores, las imágenes de las lesiones histopatológicas que se presentan no llegan a ser tan obvias para esta neumotoxicidad (Durham, *et al.*, 1985, Woods, *et al.*, 1999), como las observadas en nuestro modelo.

DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Es probable que la constancia con la que se reproducen las lesiones y la severidad de las mismas, se deba a la inoculación repetida del tóxico que se empleó en el estudio que aquí se realizó, en comparación con otros modelos experimentales, en los cuales se incluye una sola inoculación del tóxico (Durham, *et al.*, 1985).

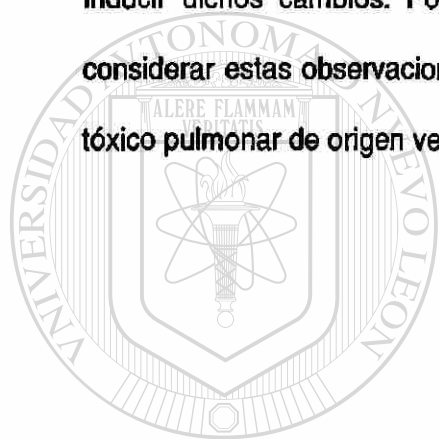
Un hallazgo que se observó en nuestro experimento, fué la presencia de hemoglobinuria y la correspondiente nefrosis en ovinos. Es probable que esta alteración, la cual se asocia con el vehículo propilenglicol, haya ocurrido por la administración endovenosa del producto en este modelo. En un estudio previo también se refiere la aparición de hemoglobinuria en bovinos que recibieron el tóxico por la misma vía (Carlson, *et al.*, 1972). En ratas, no se apreció esta alteración, esto pudo ser debido a la vía de administración, la cual se realizó intraperitonealmente. El propilenglicol es el vehículo mayormente utilizado para acompañar la inoculación de 3- metil indol (Carlson, *et al.*, 1972).

Al considerar la alta reproducibilidad de las lesiones en nuestros modelos, se puede recomendar que en ambos casos la inducción de las lesiones neumotóxicas provocadas por 3-metil indol son altamente confiables. Sin embargo, debido a las facilidades que la rata ofrece en cuanto a número de individuos utilizados en un estudio, al tipo de alojamiento requerido y al fácil manejo de las mismas, esta especie aparece como una alternativa más viable para llevar a cabo dichas investigaciones.

La reproducibilidad de las lesiones macroscópicas y los cambios que se presentan a nivel microscópico, nos ayudan a entender como este compuesto es capaz de alterar la arquitectura tisular y la estructura celular del parénquima pulmonar. Además, nos permitiría en un futuro evaluar la dosificación administrada del compuesto y el tiempo transcurrido en que éste está activo y con capacidad de provocar daño pulmonar.

DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Suponemos que dos dosis aplicadas del compuesto y el tiempo transcurrido de noventa y seis horas, aseguran la reproducibilidad de las lesiones. Cabe destacar que esto no ha sido reportado en la literatura, al igual que las lesiones consistentes a nivel bronquial y bronquiolar de hiperplasia en mucosa respiratoria y en algunos casos de descamación epitelial. Por tanto, concluimos que ambos modelos experimentales son altamente confiables en la reproducción de las lesiones inducidas por el neumotóxico 3-metil indol, asimismo, la dosificación utilizada ha demostrado ser la adecuada al inducir dichos cambios. Por lo tanto, futuras investigaciones estarán tendientes a considerar estas observaciones, con la finalidad de seguir conociendo a este potente tóxico pulmonar de origen vegetal.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



REFERENCIAS

Acton, K.S., Boersman, H.J. and Bray, T.M.: The role of prostaglandin H synthase in 3-methylindole-induced pneumotoxicity in goat. Comparative Biochemical Physiology, 101C: 101-108 (1992).

Atwal, O.S., Minhas, K.J. and Perry, M.S.: Cytotoxic effects of 3-methylindole on alveolar epithelial cells and macrophages: with special reference to microtubular and filamentous assemblies in alveolar type I cells of bovine lung. Histology & Histopathology, 3(3): 301-314 (1988).

Carlson, J.R., Yokoyama, M.T. and Dickinson, E.O.: Induction of pulmonary edema and emphysema in cattle and goats with 3-methylindole. Science, 176: 298-299 (1972).

Carlson, J.R., Dickinson, E.O., Yokoyama, M.T. and Bradley, B.: Pulmonary edema and emphysema in cattle after intraruminal and intravenous administration of 3-methylindole. American Journal Veterinary Research, 36(9): 1341-1347 (1975).

Cornelius, L.M., Coulter, D., Doster, A. and Rawlings, C.: Pathophysiologic studies of calves given 3-methylindole intraruminally. American Journal Veterinary Research, 40(4): 571-575 (1979).

Dickinson, E.O., Yokoyama, M.T., Carlson, J.R. and Bradley, M.S.: Induction of pulmonary edema and emphysema in goats by intraruminal administration of 3-methylindole. American Journal Veterinary Research, 37 (6): 667-672 (1976).

Durham, S.K. and Castleman, W.L.: Pulmonary lesions induced by 3-methylindole in mice. American Journal of Pathology, 121 (1): 128-137 (1985).

Honeyfield, D.C. and Carlson, J.R.: Assay for the Enzymatic Conversion of Indoleacetic Acid to 3-Methylindole in a Ruminant *Lactobacillus* Species. Applied and Environmental Microbiology, 56 (3): 724-729 (1990).

Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N.: Pathology of Domestic Animals, 4th ed. Academic Press, San Diego, California, (1993).

Kaster, J.K. and Yost, G.S.: Production and Characterization of Specific Antibodies: Utilization to predict organ-and species-selective pneumotoxicity of 3-methylindole. Toxicology Applied Pharmacology, 143(2): 324-337 (1997).

REFERENCIAS

Loneragan, G.H., Gould, D.H., Mason, G.L., Garry, F.B., Yost, G.S., Lanza, D.L., Miles, D.G., Hoffman, B.W. and Mills, L.J.: Association of 3-methyleneindolenine, a toxic metabolite of 3-methylindole, with acute interstitial pneumonia in feedlot cattle. American Journal Veterinary Research, 62(10): 1525-1530 (2001).

López, M.A.: Thomson's Special Veterinary Pathology, 4th ed. Mosby, San Diego, California, (2000).

Popp, J.D., McAllister, T.A., Kastelic, J.P., Majak, W., Ayround, M., VanderKrop, M.A., Karren, D., Yost, G.S. and Cheng, K.J.: Effect of Melengestrol Acetate on Development of 3-methylindole-Induced Pulmonary Edema and Emphysema in Sheep. Canadian Journal Veterinary Research, 62: 268-274 (1998).

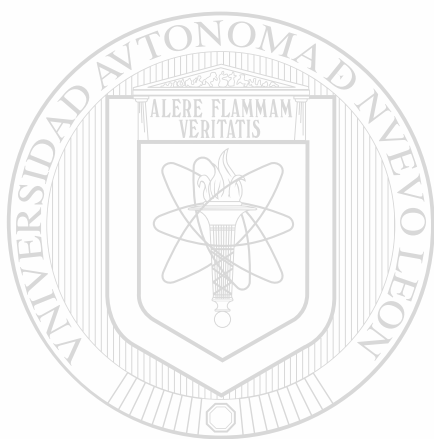
Ramírez-Romero, R., Guadiana-González, S., Névarez-Garza, A.M. y Trigo-Tavera, F.J.: Enfisema y edema pulmonar agudo en bovinos. Veterinaria México, 24: 43-46 (1993).

Trigo, T.F.J.: Patología Sistémica Veterinaria. 3^a Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. (1998).

Woods, L.W., Wilson, D.W. and Segall, H.J.: Manipulation of injury and repair of the alveolar epithelium using two pneumotoxicants: 3-methylindole and monocrotaline. Experimental Lung Research, 25 (2): 165-181 (1999).

Yost, G.S., Buckpitt, A.R., Roth, R.A. and McLemore, T.L.: Mechanisms of Lung Injury by Systemically Administered Chemicals. Toxicology and Applied Pharmacology, 101: 179-195 (1989).

Yokoyama, M.T., Carlson, J.R. and Holdeman, L.V.: Isolation and Characteristics of a Skatole-Producing *Lactobacillus* sp. from the Bovine Rumen. Applied and Environmental Microbiology, 34 (6): 837-842 (1977).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



