

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).

RESULTADOS

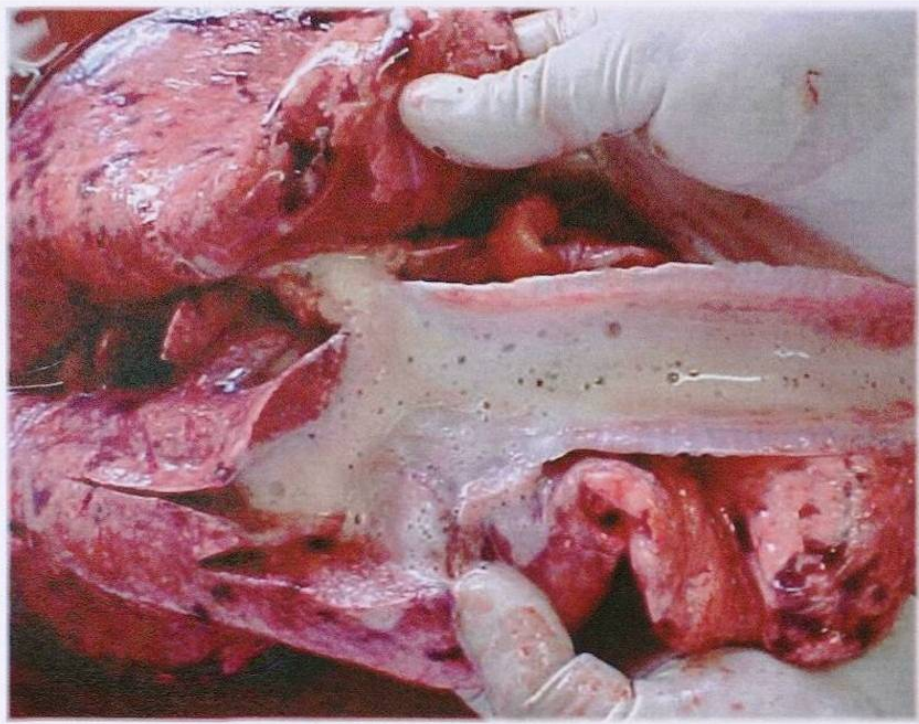


Figura 9. Tráquea con presencia de abundante espuma de color blanco difuso en borrego inoculado con 3-metil indol.



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.

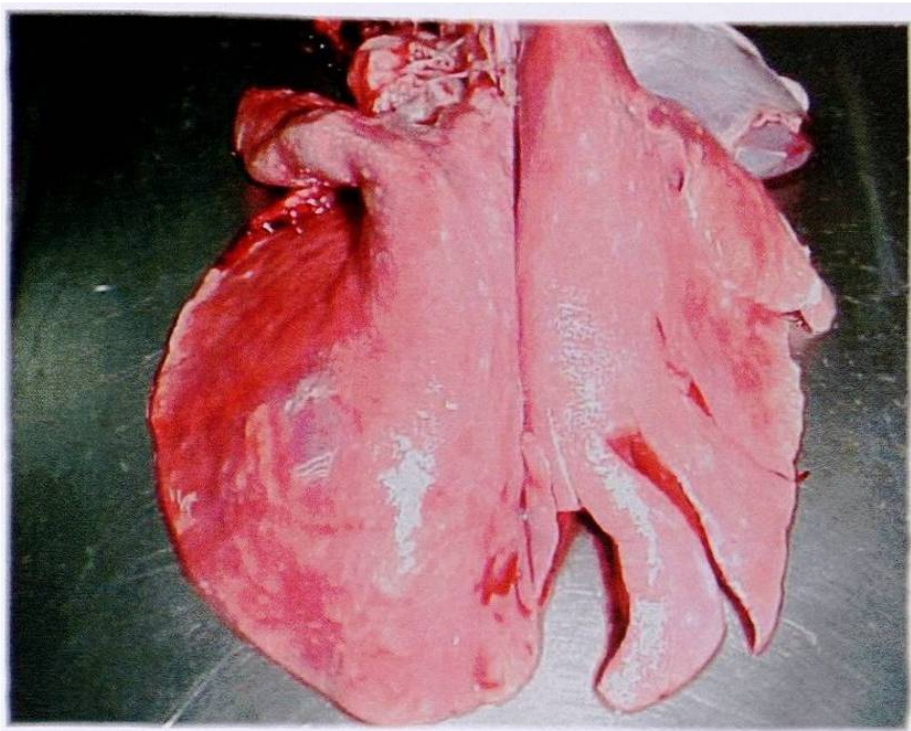


Figura 12. Pulmón del borrego inoculado con solución salina fisiológica.

RESULTADOS

Ratae: 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).

RESULTADOS

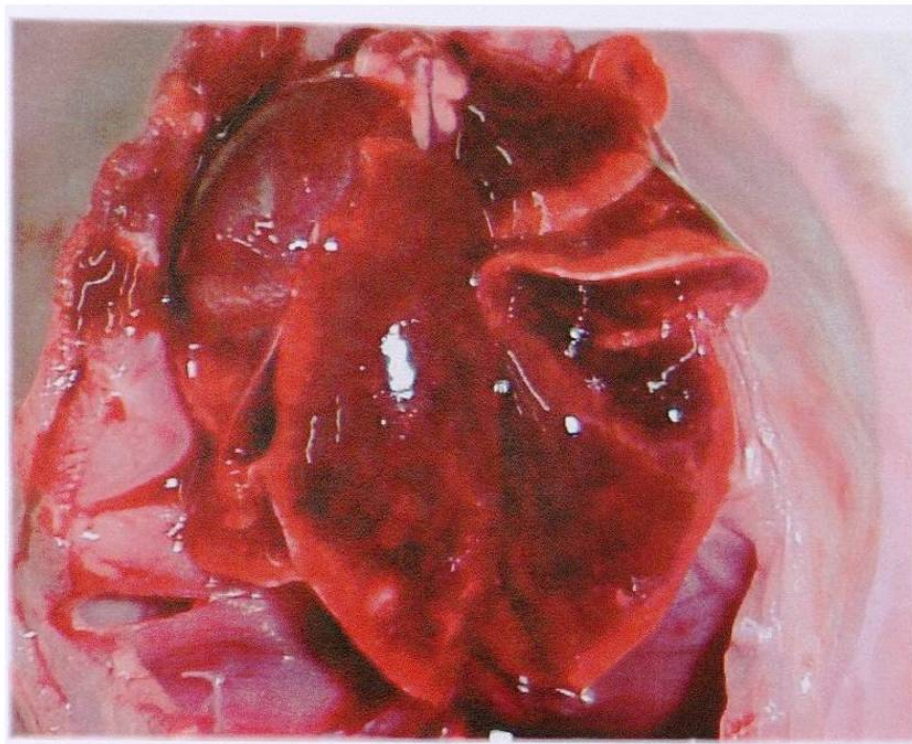


Figura 13. Congestión y edema pulmonar severo difuso en rata inoculada con 3-metil indol. Vista dorsal.

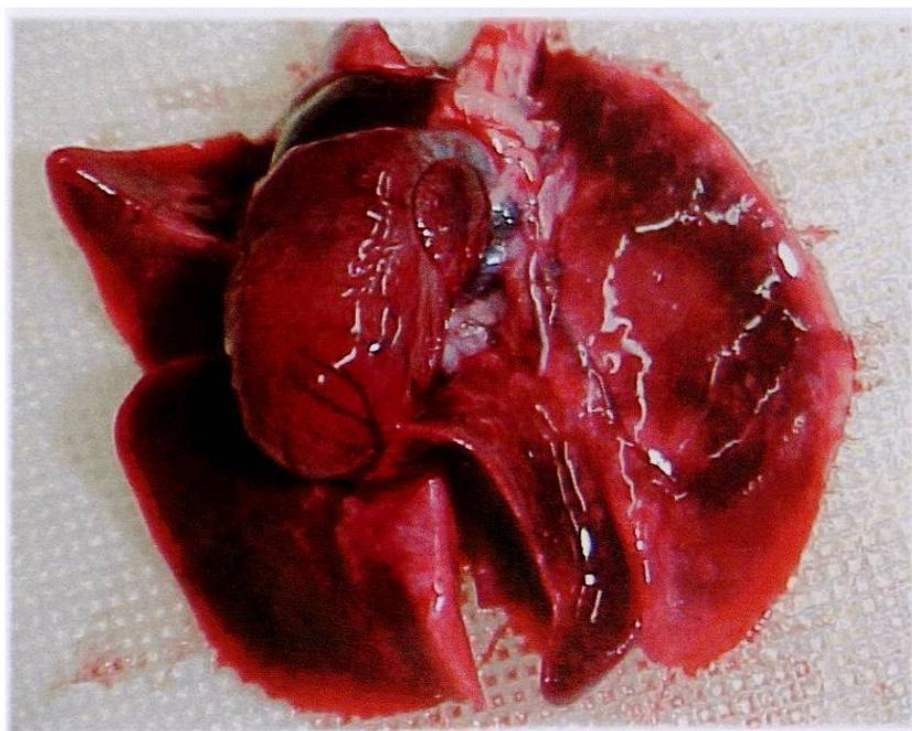


Figura 14. Congestión y edema pulmonar severo difuso en rata inoculada con 3-metil indol. Vista ventral.

RESULTADOS

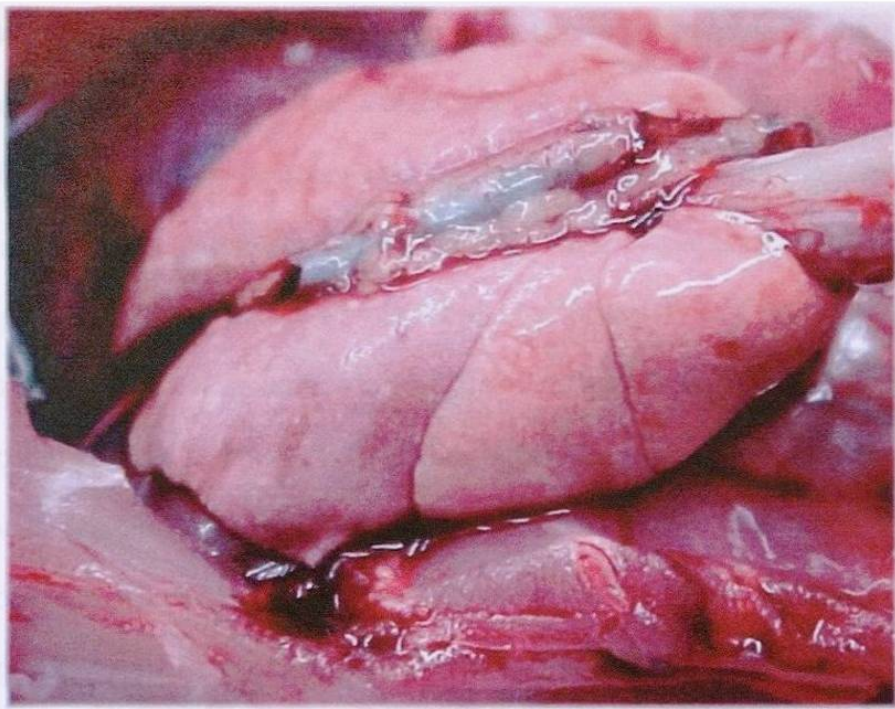


Figura 15. Pulmón normal en rata inoculada con propilenglicol.

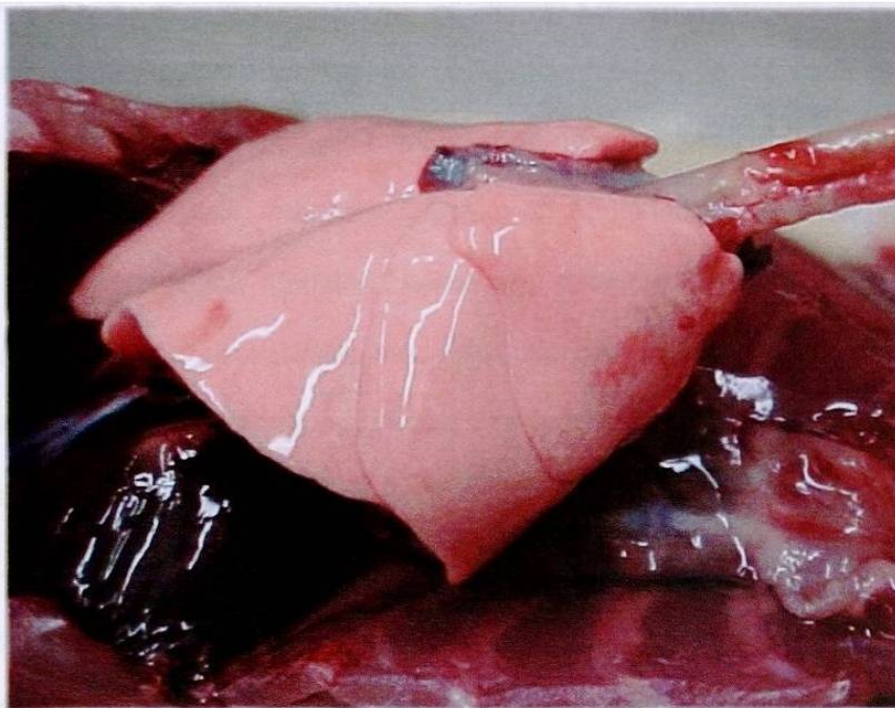


Figura 16. Pulmón normal en rata inoculada con solución salina fisiológica.

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 bronquiólos, se aprecia discreta descamación del epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado.

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

RESULTADOS

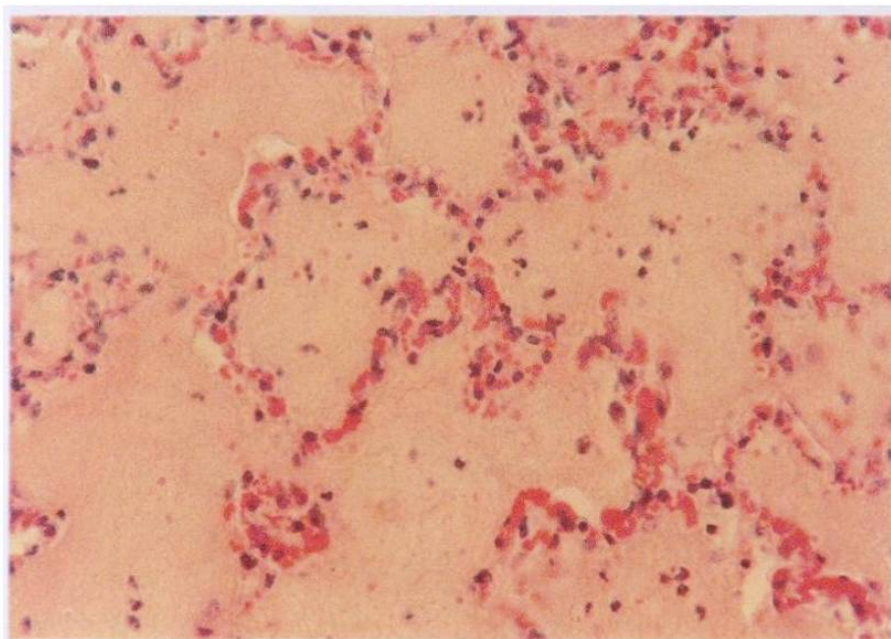


Figura 17. Edema y congestión pulmonar severo difuso en borrego inoculado con 3-metil indol. 40X

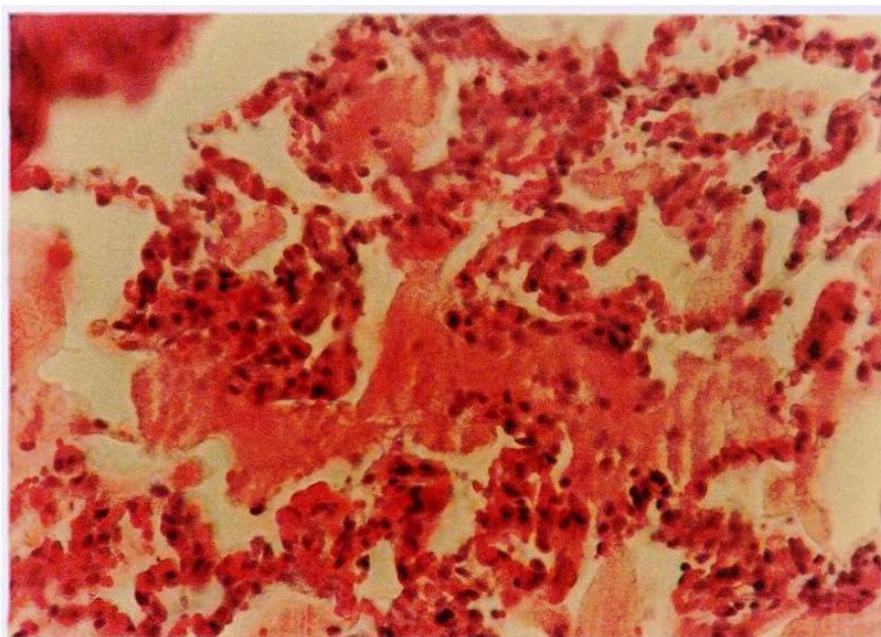


Figura 18. Presencia de membranas hialinas en intersticio pulmonar en borrego inoculado con 3-metil indol. 40X

RESULTADOS

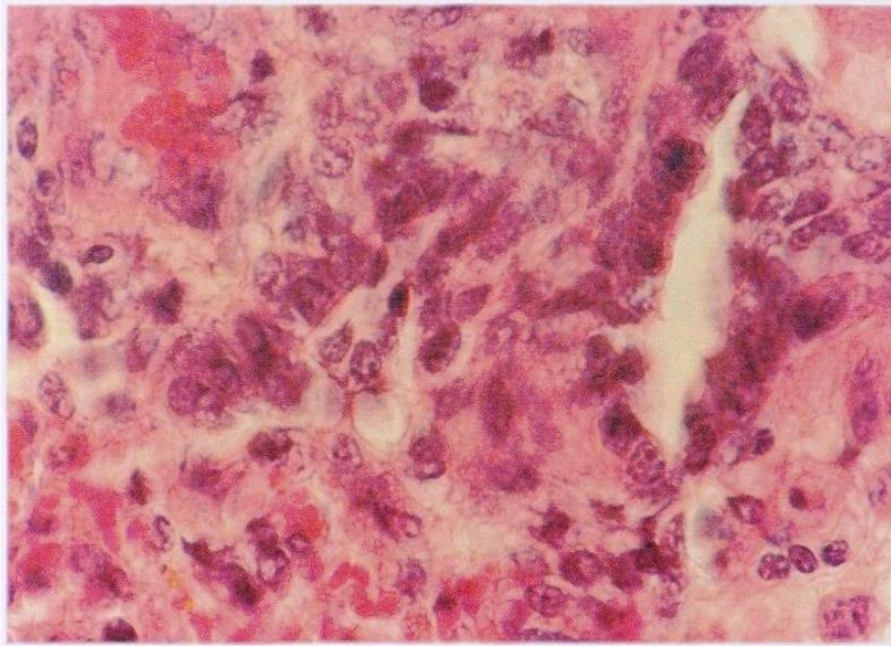


Figura 19. Hiperplasia de neumocitos tipo II (epitelialización) en borrego inoculado con 3-metil indol. 100X

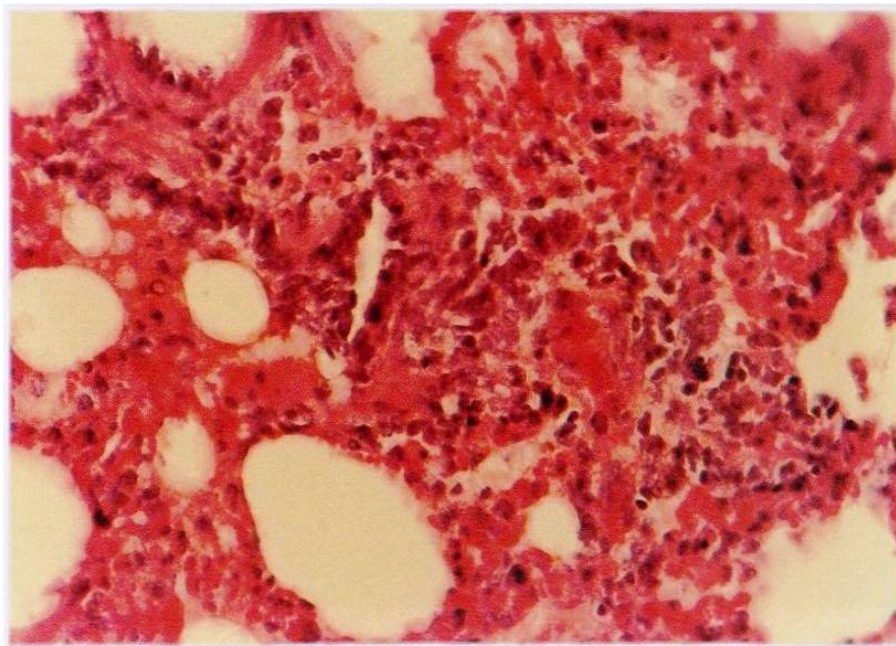


Figura 20. Engrosamiento alveolar marcado con presencia de infiltrado inflamatorio compuesto por células mononucleares en borrego inoculado con 3-metil indol. 40X

RESULTADOS

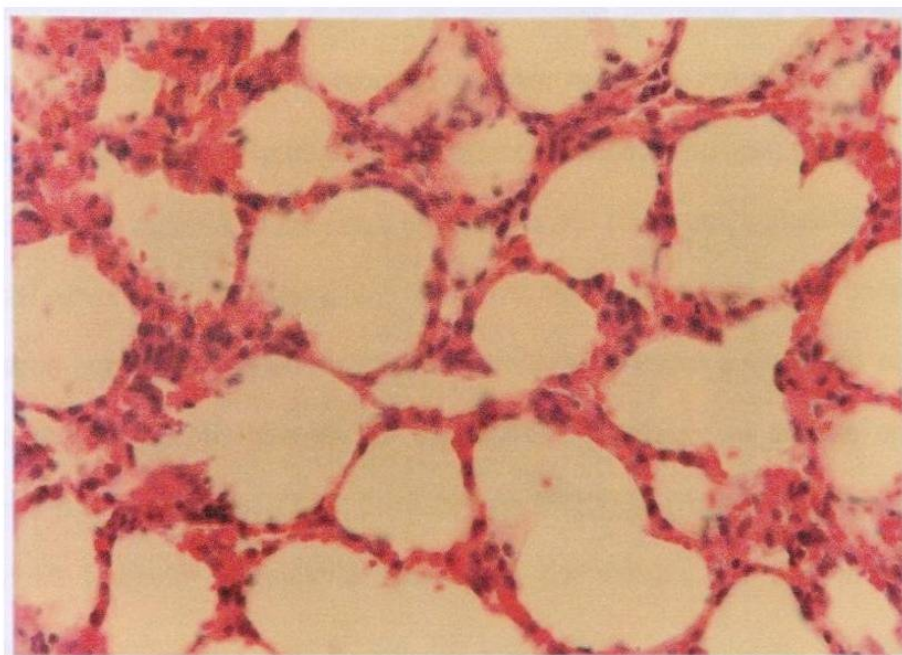


Figura 21. Congestión discreta en alvéolos de borrego inoculado con propilenglicol. 40X

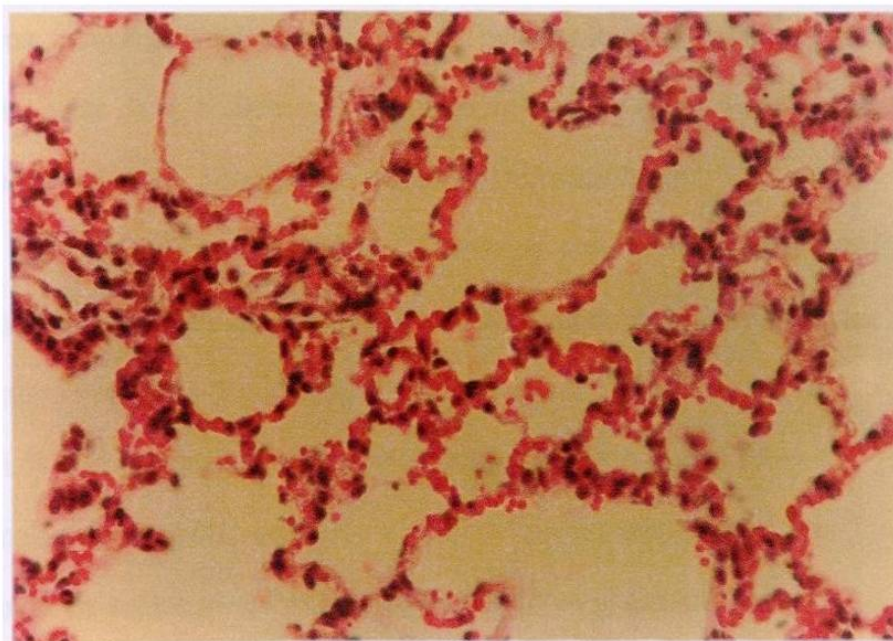


Figura 22. Alvéolos normales en borrego inoculado con solución salina fisiológica. 40X

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 linfoide de los acúmulos linfoides. 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.

RESULTADOS

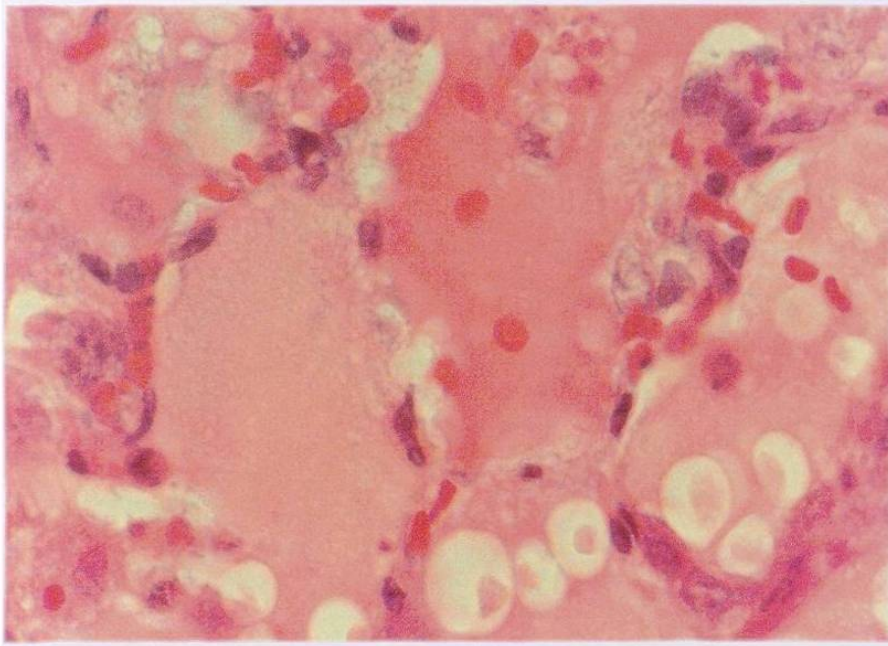


Figura 23. Edema intersticial severo difuso en pulmón de rata inoculada con 3-metil indol. 100X

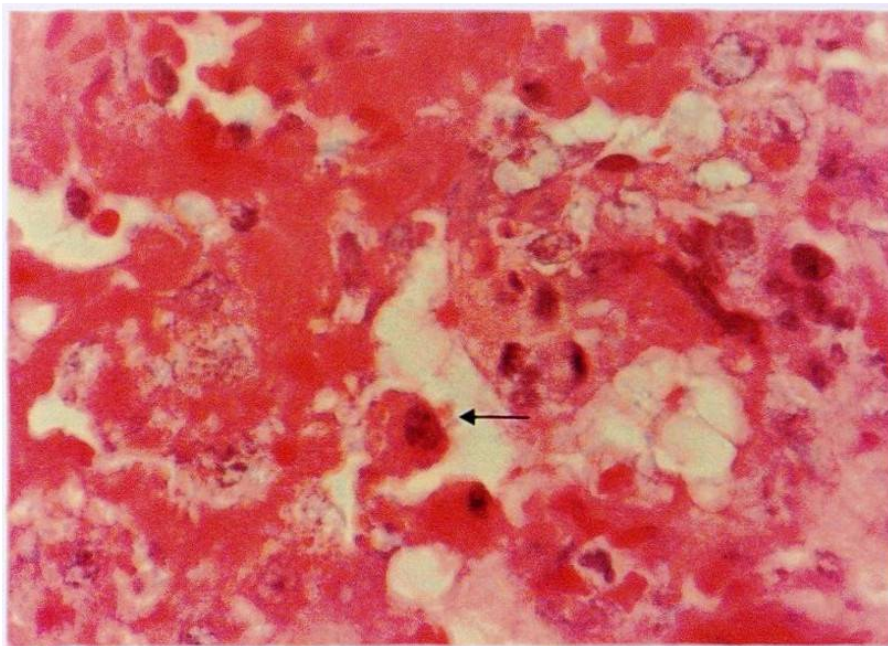


Figura 24. Macrófagos alveolares fagocitando eritrocitos (eritrofagia). Véase la flecha. 100X

RESULTADOS

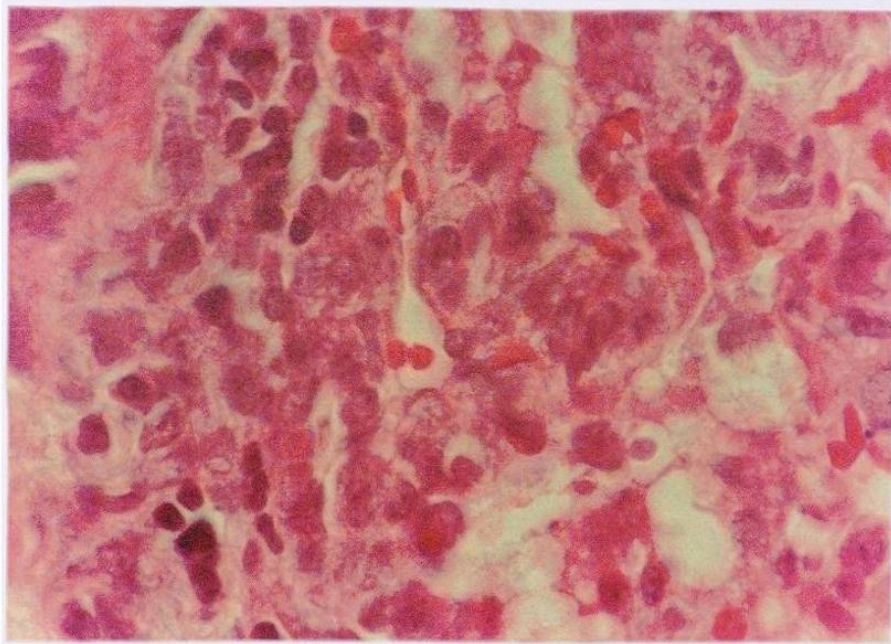


Figura 25. Hiperplasia de neumocitos tipo I y II (epitelialización). 100X

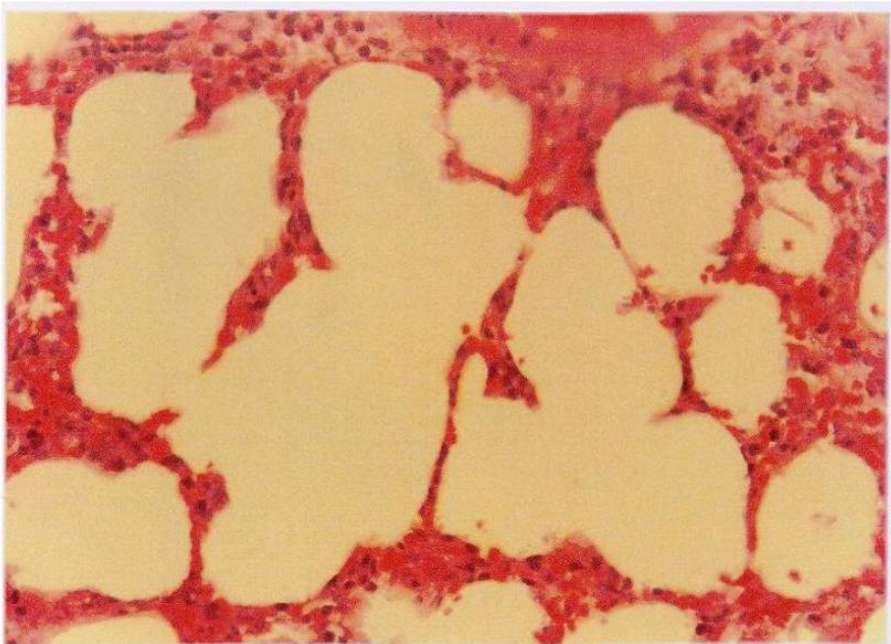


Figura 26. Enfisema intersticial severo. 40X

RESULTADOS

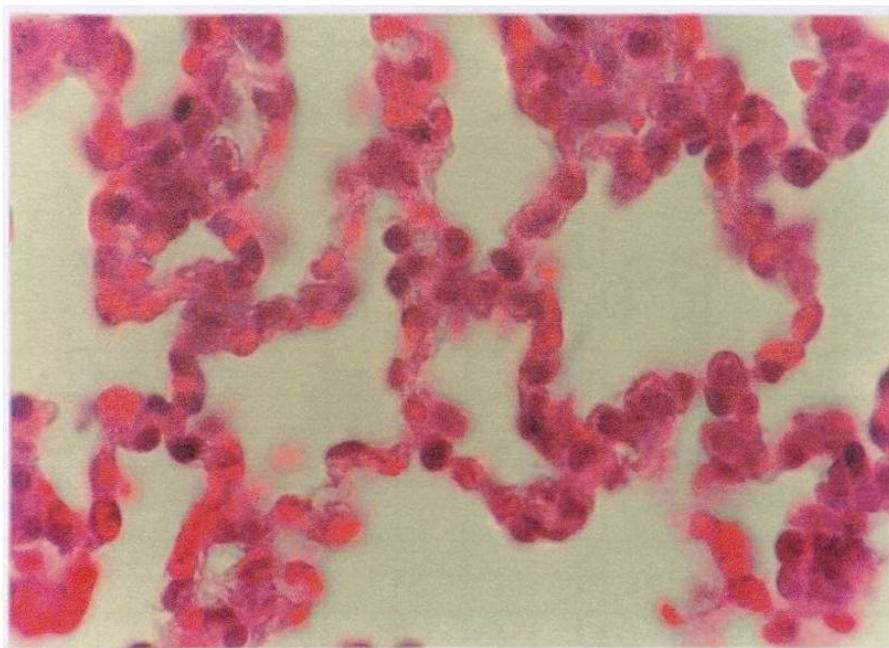


Figura 27. Engrosamiento alveolar discreto y congestión discreta difusa en rata inoculada con propilenglicol. 100X



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

Grupo	Epitelio intestinal	Mucosa gástrica	Capítulo y colon ciego	Estómago	Hígado de rumiantes (x1)	Glándulas salivales (sublingual)	Corazón	Pancreas	Estómago	Intestino	Testículo	Uterino	Epitelio pulmonar	Tráquea	Neumonía	Neurona	Musculatura	Prostata de machos	Testículo
1 (DM)	√√	√	√√	√√	√	√	-	√	√	√	-	-	√√	-	√	-	√	-	-
2 (DM)	√√	√√	√√	√√	√	√	√√	√	√	√	√	√	√	-	√	√√	-	√	-
3 (DM)	√√	√	√	-	√	√	-	√	√	-	-	√√	√	-	-	-	-	√	-
4 (DM)	√√	√√	√√	√√	√√	√	-	√	√	√	-	-	√√	-	-	-	-	-	√√
5 (DM)	√√	√√	√√	√√	-	√√	-	√	√	√	-	-	√√	√	√	-	√	-	√
6 (DM)	√√	√√	√√	√√	√√	√√	-	√	√√	-	√√	-	√√	√√	√√	√	-	-	√
7 (DM)	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√	√	√	-	√	-	√	-	√	-	√	-	-
8 (DM)	√√	√√	√	√√	√	√√	-	√	√	-	√	-	√	-	√	-	√	-	-
9 (PG)	√	√	√	-	√	√	-	√	√	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-
10 (PG)	√	√	√	-	√	√	-	√	√√	-	√	-	√	-	√	-	√	-	-
11 (SSP)	-	-	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

Tabla 4

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

Grupo	Epitelio intestinal	Mucosa gástrica	Capítulo y colon ciego	Estómago	Hígado de rumiantes (x1)	Glándulas salivales (sublingual)	Corazón	Pancreas	Estómago	Intestino	Testículo	Uterino	Epitelio pulmonar	Tráquea	Neumonía	Neurona	Musculatura	Prostata de machos	Testículo
1 (DM)	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	-	√√	-	√√	-	√√	-	-
2 (DM)	√	√√	√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	-	-	-	√√	-	√√	-	-
3 (DM)	√√	√	√	-	√√	√√	-	√√	√√	-	√√	√√	-	-	-	-	-	-	-
4 (DM)	√√	√√	√√	√√	√√	√√	-	√√	-	√√	√√	-	√√	-	-	-	-	-	-
5 (DM)	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√	√√	√√	-	√√	√	√√	-	√√	-	-
6 (DM)	√√	√√	√√	√√	√√	√√	-	√√	√	-	√√	-	√√	-	√√	-	√√	-	-
7 (DM)	√	-	√	√√	√√	√√	-	√√	√	-	√√	-	√√	-	√√	-	√√	-	-
8 (DM)	√√	-	√√	√√	√√	√√	-	√√	√√	√√	√√	-	√√	-	√√	-	√√	-	-
9 (PG)	√	-	√	-	√	√	-	√√	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-
10 (PG)	√	-	√	-	√	√	-	√√	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-
11 (SSP)	-	-	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

√ = 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.

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 Ruminal *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 Sistemically 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).



DONATIVO

