

## CAPITULO I

### INTRODUCCION GENERAL

Se considera a las neumonías como los padecimientos de mayor importancia en los animales domésticos y, a las bacterias del género *Pasteurella* como los microorganismos más relacionados con ellas.

El término: pasteurelosis neumónica (PN), se emplea para referirse a las neumonías causadas por *Pasteurella* en todas las especies animales; sin embargo, resulta particularmente importante en los bovinos.

Cuando se estableció que la PN es el resultado de una alteración en los mecanismos de depuración pulmonar, ocasionada por diversos factores condicionantes durante el manejo del ganado (transporte prolongado, hacinamiento) o ambientales (cambios extremos en la temperatura, humedad relativa elevada), lo mismo que a infecciones virales predisponentes (rinotraqueítis infecciosa bovina, parainfluenza-3, diarrea viral bovina), se ha preferido llamarla complejo respiratorio bovino (CRB). No obstante, el término PN persiste debido a la relevancia de *Pasteurella haemolytica* (más que *Pasteurella multocida*) en la generación del daño pulmonar y, por ende, en las manifestaciones clínicas derivadas del padecimiento.

Existe una gran cantidad de información acerca de los mecanismos patológicos que intervienen en el desarrollo del daño pulmonar causado por *P. haemolytica*; sin embargo, quedan aún muchas dudas por resolver. Recientemente, el interés de los investigadores se ha dirigido hacia el estudio de los efectos inflamatorios de su endotoxina (ET).

Por otra parte, es importante señalar que casi la totalidad de esta información ha sido generada de trabajos experimentales con bovinos y ovinos. En efecto, hasta ahora perdura la opinión generalizada de que, en este importante padecimiento de los rumiantes, sólo éstos pueden ser utilizados como animales de experimentación.

Con anterioridad se han llevado a cabo escasos, aunque importantes, intentos por desarrollar un modelo de la PN en animales de laboratorio; no obstante, sus resultados han sido desdeñados, quizá porque *P. haemolytica* carece de patogenicidad para éstos animales y, en consecuencia, el daño tisular que se obtuvo en aquellos experimentos fue prácticamente nulo o no guardaba similitud con lo que se aprecia en casos naturales de la enfermedad.

Al considerar que el empleo de un modelo animal, aparte de los rumiantes, resulta imprescindible para el estudio de la patogénesis del daño pulmonar causado por *P. haemolytica*, y que el lipopolisacárido (LPS) de la bacteria ha demostrado ser el responsable de la mayoría de los efectos inflamatorios, se llevó a cabo este trabajo que tuvo como objetivo emplear al conejo para estudiar los efectos inflamatorios del LPS de *P. haemolytica*

sobre el pulmón, mediante la reacción de Shwartzman y el fenómeno de Arthus; lo anterior, al suponer que pudieran existir similitudes entre estos mecanismos inflamatorios y lo que sucede naturalmente en la PN.

## CAPITULO II

### REVISION DE LA LITERATURA

#### Patogénesis del Daño Pulmonar provocado por *Pasteurella haemolytica*.

Existen varios trabajos relacionados con la patogénesis de la PN del ganado; sin embargo, la mayoría coinciden en que aún no se comprende, en su totalidad la complejidad de las interacciones que generan el daño pulmonar en el animal enfermo (30,91).

Las condiciones de estrés y/o las infecciones virales que propician la colonización bacteriana, al vulnerar los mecanismos de defensa del sistema respiratorio, no serán tratados en esta sección, sino que la revisión se centrará en la generación del daño pulmonar en respuesta a los factores de virulencia de la bacteria. Una revisión del concepto multifactorial y plurietiológico del CRB, como ahora se le prefiere referir a la PN, se presenta en el apéndice B.

Los factores de virulencia de *P. haemolytica*, mayormente asociados con la generación de daño pulmonar son la leucotoxina y la endotoxina (18,29,78,91). Otros factores de virulencia, como son la cápsula, la hemolisina, la neuraminidasa, una proteasa neutra y proteínas de membrana, no han sido tan ampliamente estudiados, probablemente porque su efecto

sobre la promoción del daño pulmonar sea menos importante, aunque su participación en la patogenia haya sido propuesta (1,33,68,96). Inclusive, a pesar de que se ha referido la presencia de fimbrias, éstas no han sido fácilmente demostradas, por lo cual, su papel en la patogénesis también es cuestionable (33).

### La Leucotoxina

La leucotoxina (LT) es una proteína termolábil, producida solamente durante la fase de crecimiento logarítmico de la bacteria, con efecto tóxico específico para leucocitos de rumiantes (1,18,68,78,91,96). Esta auténtica exotoxina es producida por todos los serotipos de *P. haemolytica* (68,91).

La LT pertenece a un grupo de toxinas bacterianas denominadas: “citolisinas formadoras de poros”, por sus típicos efectos sobre las membranas celulares; estos poros de 0.9 a 1.2 nm de diámetro, permiten la disipación de los gradientes transmembrana de  $K^+$  y  $Na^+$ , ocasionando un desbalance coloide-osmótico y el consiguiente hinchamiento celular (18,68,91,96). Subsecuentemente, el  $Ca^{2+}$  extracelular puede entrar a la célula y lizarla, ya sea a través de la activación de fosfolipasas membranales o de la destrucción del citoesqueleto; la citólisis es evidente por la formación de graves defectos en la membrana reconocidos ultraestructuralmente y la detección de enzimas indicativas de la extrusión de componentes citoplásmicos, como la deshidrogenasa láctica (18).

La LT de *P. haemolytica* está genéticamente relacionada con la hemolisina de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y la alfa-hemolisina de *Escherichia coli*; estas citolisinas constituyen una familia de toxinas codificadas por genes con alta homología en las secuencias de su DNA (18). Al parecer, las secuencias repetidas de nueve aminoácidos en estas citolisinas, son los sitios de unión con el  $\text{Ca}^{2+}$ , imprescindible para su actividad tóxica (18).

Como ya se mencionó, la LT es una proteína, que además de termolábil es estable en presencia de oxígeno, no es dializable, no es hemolítica y es soluble en agua (91,96); otras propiedades son su estabilidad al pH, ya que retiene su actividad entre 4.5 y 9 (1,96). Su peso molecular es de 101 a 105 kDa; sin embargo, estas estructuras parecen ser las subunidades activas de una forma multimérica de 300 kDa o más (18,91).

Al parecer, para que ocurra la actividad tóxica de la LT se requiere que las bacterias la produzcan en estrecha proximidad con las células blanco, ya que, de otra forma, su sensibilidad a la proteólisis la inactivaría. Se ha estimado su vida media en menos de 60 min a 30° C (18). Por otra parte, se presume que la actividad de la LT se ejerce al ligarse a receptores en la superficie de las células susceptibles, por lo cual no requiere de ser internalizada (18,91).

Los efectos tóxicos de la LT se han demostrado *in vitro* en macrófagos, neutrófilos, linfocitos, células de linfoma y plaquetas (18,68,96). Asimismo,

*in vivo* se ha reconocido su efecto sobre leucocitos, particularmente sobre macrófagos (91).

La participación de la LT en la generación de daño tisular en el pulmón, ocurre a través de la activación y lisis de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y macrófagos. En efecto, la activación de fosfolipasas con la subsecuente liberación del factor activador plaquetario, la activación de compuestos con efectos quimiotácticos y vasoactivos derivados del ácido araquidónico, la desgranulación del arsenal enzimático contenido en los lisosomas, la generación de radicales tóxicos del oxígeno y la inducción de citocinas proinflamatorias como la interleucina -1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), contribuyen a la instauración de una respuesta inflamatoria y, en consecuencia, daño tisular (88,91). Asimismo, las plaquetas pueden también contribuir al liberar fibrinógeno y compuestos vasoactivos en presencia de la LT (18).

Como ha podido apreciarse, la LT de *P. haemolytica* no tiene un efecto directo en la generación del daño tisular; su participación en este sentido se finca en la activación y lisis de las células susceptibles. Por lo tanto, su función parece tener más relación con un mecanismo de defensa para la bacteria que con un factor promotor del daño tisular (29,88).

### La Endotoxina

La endotoxina (ET) es el otro factor de virulencia considerado de importancia, capaz, por sí mismo, de generar una respuesta inflamatoria

compatible con las lesiones que se reconocen en casos naturales de PN (90,91).

La endotoxina (ET) de *P. haemolytica* es similar al LPS de otras bacterias Gram negativas, tanto en propiedades fisicoquímicas como biológicas (96). Se estima que del 12 al 25% de la pared de esta bacteria está compuesta de LPS, principalmente de tipo liso (91,96).

Los mecanismos que generan la amplia gama de efectos patológicos derivados de los LPS tanto a nivel celular como sistémico, son muy complejos. Básicamente, el LPS puede interactuar con las membranas de las células a través de receptores de los polisacáridos o directamente por la inserción del lípido A; asimismo, puede ser internalizado por pinocitosis e inclusive, cuando se encuentra ligado a lipoproteínas plasmáticas mediante receptores específicos (CD-14) en macrófagos (46,62,91). Subsecuentemente, el LPS puede activar la célula al funcionar como un activador de las serinproteasas, merced al lípido A; además, puede alterar la membrana del retículo endoplásmico, permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$  y la consiguiente activación de las rutas metabólicas dependientes. Inclusive el LPS puede interactuar con la membrana mitocondrial externa, alterando el gradiente de protones y, por ende, la glucólisis oxidativa. Esta situación genera la activación de la ruta anaeróbica de la glucólisis que conlleva la producción de ácido láctico y radicales de oxígeno, así como la ruptura de lisosomas (55,91).

Particularizando sobre los efectos patológicos de los LPS, o más específicamente del lípido A, sobre las células endoteliales, puede decirse que inducen alteraciones en su forma hasta provocar picnosis y disminuyen la síntesis de DNA, RNA y proteínas. Estos efectos pueden deberse a la activación propia de las células por mecanismos dependientes de la proteincinasa C y el consiguiente recambio aumentado de fosfoinositol. Asimismo, debe considerarse que las células así activadas pueden generar una amplia gama de mediadores proinflamatorios como factor de activación plaquetaria (PAF), derivados del ácido araquidónico (prostaciclina PGI<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>), factor tisular (TF), inhibidor del activador del plasminógeno e IL-1 (91).

El efecto directo de la endotoxina sobre el epitelio alveolar es menos preciso; sin embargo, los cambios ultraestructurales asociados a la liberación de enzimas indicativas de daño tisular, ocurren con mayor notoriedad cuando la respuesta inflamatoria está presente, de tal forma que podrían considerarse secundarios a la propia inflamación (43,91). No obstante, debe tenerse en cuenta la acción efectora original de las células del epitelio respiratorio, puesto que son capaces de producir sus propios mediadores inflamatorios, los cuales actuarían de manera autocrina y/o paracrina, potencializando el evento (20).

Mediante técnicas sofisticadas de microscopía electrónica se han registrado los acontecimientos que ocurren en neumocitos II expuestos a LPS *in vitro*. Por principio, existe una acumulación inicial del LPS en las microvellosidades de la célula, probablemente ligado a receptores

específicos; posteriormente, hay internalización de las moléculas las cuales forman discretos cúmulos en el citoplasma; luego, se aprecia su localización condensada en el interior del núcleo en áreas libres de cromatina; asimismo, en algunas áreas de la membrana se demuestra acumulación de LPS y su asociación con tubulina en áreas adyacentes. Los sucesos descritos anteriormente, resultan evidentes a partir de 60 min y están acompañados de un agrandamiento del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear, lo mismo que de alteraciones en las mitocondrias (64).

Por otra parte, existe una relación directa entre los efectos de los LPS sobre los neumocitos II y alteraciones en el surfactante alveolar. En efecto, las células dañadas pueden producir una cantidad disminuida de surfactante y/o surfactante con una composición anormal de sus fosfolípidos. Además, la interacción directa de los LPS con el surfactante, causa un aumento en la tensión superficial. Todo lo anterior conduce a la generación de edema, hemorragia y atelectasia alveolar (14). Empero, el propio surfactante puede ejercer una acción protectora al inhibir los efectos de los LPS sobre PMN y macrófagos alveolares. Al respecto, se ha observado que los PMN incubados con LPS mezclado con surfactante, tienen una generación disminuida de radicales tóxicos de oxígeno y de lisozima, que cuando se estimulan directamente con LPS; los macrófagos, por su parte, tienen menor producción de IL-1 (39).

Los macrófagos alveolares y los macrófagos intravasculares del pulmón pueden interactuar directamente con las ET, ya sea que éstas lleguen al pulmón por vía aerógena o por vía sanguínea (91). Esta interacción conduce

a la activación de los macrófagos directa e indirectamente, mediante la activación del complemento (91). Los macrófagos, así activados, pueden generar una amplia gama de compuestos proinflamatorios, procoagulantes, radicales tóxicos de oxígeno y proteasas (91). Particularizando sobre los compuestos proinflamatorios, resultan muy evidentes los efectos flogísticos de la IL-1 y el TNF cuando se administran LPS por vía endotraqueal (81). Al parecer la IL-1 posee un efecto inflamatorio más potente que el TNF (81).

Como ya se señaló, los efectos inflamatorios derivados de la estimulación de los macrófagos se ejerce mayormente a través de citocinas, que a su vez atraen y/o activan a los PMN (IL-1, IL-8 y TNF), inducen la expresión de moléculas de adhesión en estas células (familia de moléculas de adhesión CD-18 [integrinas]), lo mismo que en las células endoteliales (moléculas de adhesión ELAM-1 e ICAM-1); igualmente, generan actividad procoagulante en las superficies endoteliales (TF o tromboplastina, factor V, inhibidor del activador del plasminógeno y PAF) y, finalmente, participan en el control del flujo sanguíneo mediante sustancias vasodilatadoras (PGI<sub>2</sub>) (6,46,62 ).

No obstante, los macrófagos activados por ET, ya sea que ésta se administre por vía endotraqueal o endovenosa, también generan citocinas que moderan y aminoran la afluencia de PMN y, por ende, la respuesta inflamatoria; estas citocinas son la IL-6 y el factor transformante del crecimiento (TGF), cuya acción básica se ejerce por la regulación negativa sobre la producción de TNF (82). Por otra parte, en animales y humanos que sufren de procesos sépticos e inflamatorios, se ha demostrado la producción natural de un antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra) (26). Este

antagonista, producido por el linaje celular monocitos-macrófagos, compite con la IL-1 al ocupar sus receptores en las superficies celulares, pero no desencadena las respuestas típicas de la IL-1 (5,26). Recientemente, se ha demostrado que los PMN pueden ser la fuente más importante de IL-1ra cuando se induce una respuesta inflamatoria en el pulmón mediante la administración endotraqueal de LPS (80).

Los PMN no resultan activados directamente por los LPS; sin embargo, en pequeñas cantidades, los LPS sensibilizan a estas células para desarrollar una potente respuesta en presencia de un segundo agonista. De esta forma, el factor C5a del complemento, factores quimiotácticos bacterianos (oligopéptidos formilados), leucotrienos (LTB-4) y citocinas (IL-1, TNF, IL-8 y posiblemente también los factores estimulantes de la colonización [CSFs]), pueden actuar como agonistas secundarios y favorecer la respuesta exacerbada de los PMN (91). Empero, resulta evidente que estos agonistas secundarios (con excepción de los factores quimiotácticos bacterianos), también son inducidos por los propios LPS.

Los PMN, así activados, son los responsables del daño tisular al liberar radicales tóxicos de oxígeno y enzimas lisosomales; sin embargo, también contribuyen a perpetuar el estímulo flogístico al producir ellos mismos IL1, PAF y LTB-4 (6,73,91). Otro fenómeno derivado del efecto de las citocinas sobre los PMN es la expresión de moléculas de adhesión, indispensables para la acumulación de estas células en los sitios donde se requiere de la respuesta inflamatoria (26,46). Finalmente, los PMN pueden también regular la respuesta inflamatoria al producir por su cuenta IL-6 (80,82).

A nivel molecular, la activación de los PMN, luego de la ligadura de un factor quimiotáctico a su receptor, se debe a una proteína que a su vez une GTP al complejo agonista-receptor previamente formado; subsecuentemente, ocurre la hidrólisis del fosfatidilinositol mediante fosfolipasas A2 y C, dando lugar a fosfatos de inositol y diacilglicerol. En consecuencia, hay una elevación del calcio libre en el citosol y la activación de la proteincinasa C que conlleva la fosforilación de proteínas (6,73).

Los LPS pueden activar directa e indirectamente a las plaquetas. El efecto directo depende de la activación de la proteincinasa C y las consecuencias subsecuentes, mientras que la activación indirecta parece corresponder a la activación del complemento. Las plaquetas, así activadas, liberan productos proinflamatorios como PAF, prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos (TXA<sub>2</sub>), así como también factores de la coagulación (V, VIII y fibrinógeno), sustancias vasoactivas (serotonina) y enzimas lisosomales (46,55,91). Por lo anterior, la contribución de las plaquetas en la respuesta inflamatoria es significativa; no obstante, la depleción de plaquetas en el borrego no modifica los efectos patológicos de la respuesta pulmonar ante un desafío sistémico con LPS (91).

Los LPS pueden también activar a los linfocitos, los cuales participan en la respuesta inflamatoria al generar TNF, interferón gamma (IFN- $\delta$ ) y CSFs. Estos mediadores pueden, a su vez, activar macrófagos y así favorecer el evento flogístico (55,91). Por otra parte, el papel de los linfocitos en los mecanismos de defensa específicos, es decir, en la respuesta inmune, es indispensable. Los LPS favorecen la mitogénesis de los linfocitos; asimismo,

al estimular a los macrófagos, la liberación de IL-1 estimula a los linfocitos T para interactuar con los linfocitos B a través de citocinas, particularmente IL-2, para instaurar una respuesta inmune adecuada, inclusive contra los propios LPS. Vale mencionar que los LPS pueden también actuar como adyuvantes (55).

Como ya se mencionó, los LPS pueden activar los diferentes mediadores sistémicos de la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, el complemento puede resultar activado por acción de los LPS, tanto por la vía clásica como por la ruta alterna. Como se recordará, el lípido A actúa como activador de las serinproteasas y, en consecuencia, puede activar la fracción Clq del complemento en ausencia de anticuerpos. Esta activación conduce a la generación de la fracción convertasa (C4-2) de C3 y toda la cascada dependiente. Asimismo, los LPS promueven la ligadura del factor B con pequeñas cantidades de C3b activando la ruta alterna; por otra parte, los polisacáridos componentes de la fracción O de los LPS, pueden generar la producción de la convertasa de C3, estableciéndose los ingredientes para la activación alterna (55). Finalmente, debe considerarse la importante participación de las anafilatoxinas (C3a, C5a) en la instauración del evento flogístico a través de su efecto vasoactivo y de quimiotaxia sobre los PMN; asimismo, la acción de C3b como opsonina (46,55).

Los mecanismos de la coagulación y de la fibrinólisis también se ven afectados por efecto de los LPS. En primer término, la actividad de serinproteasa del lípido A también activa el factor XII (Hageman) de la ruta intrínseca de la coagulación y, por lo tanto, toda la cascada dependiente. Por

otra parte, como ya se ha señalado, las superficies endoteliales son influidas en favor de una acción procoagulante por efecto de los LPS a través de la acción de citocinas (IL-1, TNF) (46,55,62,91).

La activación del factor XII conlleva la activación del sistema de cininas, de la fibrinólisis y del complemento (55,91). Sin embargo, la activación desequilibrada de estos sistemas es capaz de provocar una multitud de efectos inflamatorios desfavorables, al establecerse rutas de retroactivación reiterativas que exacerban el evento.

Se ha propuesto que el daño tisular que se observa en la PN es precisamente un ejemplo del imbalance entre los mecanismos anteriormente expuestos. En efecto, los macrófagos alveolares de las zonas afectadas del pulmón, tuvieron hasta 30 veces más actividad procoagulante que los macrófagos de las áreas no afectadas y 37 veces más que macrófagos de pulmones normales; en cambio, cuando se comparó la actividad profibrinolítica de leucocitos pulmonares (macrófagos alveolares y PMN, principalmente) obtenidos de zonas afectadas y de no afectadas, se apreció una actividad 23 y 4 veces menor, respectivamente, en comparación con células normales (17). Además, mediante procedimientos de inmunohistoquímica, se demostró una intensa reactividad a la tromboplastina (TF), tanto en macrófagos como en células alveolares de áreas con severa inflamación (17).

A manera de colofón, resulta evidente que la proliferación de *P. haemolytica* en las superficies alveolares, desarrolla una serie de eventos

flogísticos dependientes de la activación de los macrófagos pulmonares, tanto de los alveolares como de los intravasculares. Esta activación genera una serie de factores proinflamatorios, dentro de los cuales se destacan la IL-1 y el TNF. El fenómeno inflamatorio resultante es el reflejo de una complicada interacción de los componentes inflamatorios derivados tanto de células como del plasma; su retroactivación reiterada y su traslape en efectos, conduce a la generación de un daño tisular exacerbado en el pulmón. Todo parece indicar que el LPS de *P. haemolytica* tiene un efecto protagónico más importante que la LT.

## CAPITULO III

### PLAN DE TRABAJO

Como ya se mencionó en el Capítulo I, el objetivo general de este trabajo fue emplear al conejo como modelo animal para estudiar los efectos inflamatorios del LPS de *P. haemolytica* sobre el pulmón. Los experimentos fueron diseñados para conocer estos efectos inflamatorios a través de la reacción de Shwartzman y el fenómeno de Arthus, que a su vez se constituyeron en los objetivos particulares.

Se supuso que las lesiones provocadas tanto por la reacción de Shwartzman como por el fenómeno de Arthus, tendrían respectivamente, semejanzas con las lesiones que se observan en casos naturales de PN. De confirmarse las hipótesis anteriores, podría entonces presumirse la participación de mecanismos patogénicos relacionados con estos fenómenos inflamatorios experimentales, en el desarrollo de las lesiones neumónicas de la PN.

Para conseguir lo anterior se diseñaron originalmente, tres experimentos. El primero fue decisivo y se condujo para conocer el efecto inflamatorio del LPS de la bacteria en el pulmón del conejo y su capacidad para inducir la reacción de Shwartzman, tanto en la piel como en el pulmón. Este ensayo se describe en el experimento 1. Los otros dos se condujeron conociendo de

antemano el poder flogístico del LPS sobre el pulmón; entonces, se probó el efecto que la inmunización pasiva podría tener sobre la respuesta inflamatoria del pulmón ante el desafío pulmonar con el LPS, incluyendo la reacción de Shwartzman. Este ensayo se describe en el experimento 3. Finalmente, en el experimento 4 se procedió a conocer la respuesta del pulmón ante el LPS de la bacteria, cuando existía previamente un estado de hipersensibilidad; ésto compatible con una reacción de Arthus activa. No obstante, después del experimento inicial, surgió la inquietud de saber si la respuesta inflamatoria del pulmón se veía influida por la dosis del LPS administrado por vía endotraqueal, al grado de modificar las observaciones que se habían obtenido previamente; por ésta razón fue incluido como experimento 2 este breve ensayo. Con base en lo anterior, se ha decidido presentar en el Capítulo IV cada experimento por separado.

## CAPITULO IV

### TRABAJO EXPERIMENTAL

#### Experimento 1

#### Inducción de la Reacción de Shwartzman en el Pulmón del Conejo Empleando Lipopolisacárido de *Pasteurella haemolytica*

##### Resumen

Se indujo la reacción de Shwartzman (RS) en el pulmón de conejos con interés de comparar las lesiones provocadas con las que se presentan, naturalmente, en la pasteurelosis neumónica (PN) y, en su caso, proponer una patogenia similar. Para inducirla primero se administró una dosis preparatoria de lipopolisacárido (LPS) de *Pasteurella haemolytica* (50µg) por vía endotraqueal, seguida 24 h más tarde, por una dosis provocativa del mismo LPS (100 µg) por vía endovenosa. Doce horas después los animales se sacrificaron. El pulmón derecho se empleó para estudios de histopatología, mientras que el izquierdo para realizar lavados bronquioalveolares (LBA). Para comparación se incluyeron grupos que recibieron solamente el LPS de *P. haemolytica* por vía endotraqueal o endovenosa (la inoculación faltante correspondió a solución salina fisiológica

[SSF]), así como también otro grupo al que se administró LPS de *Escherichia coli* tal y como se describió al principio y otro más que recibió SSF de la misma manera. Las lesiones más notorias correspondieron a los animales que recibieron LPS de *P. haemolytica* por vía endotraqueal y a los animales que se les provocó la RS, empleando tanto el LPS de *P. haemolytica* como el de *E. coli*, si bien en éstos últimos fueron menos intensas. Las lesiones consistieron en congestión, hemorragias y áreas de consolidación. Microscópicamente se apreció una neumonía intersticial con abundante exudado serofibrinoso en alveolos; asimismo, áreas de consolidación compuestas por hemorragias, necrosis y un intenso infiltrado de polimorfonucleares (PMN). Los animales a los que se indujo la RS presentaron además hemorragias perivasculares y trombosis. Los animales que recibieron el LPS de *P. haemolytica* por vía endovenosa presentaron solamente neumonía intersticial y el grupo que recibió SSF por ambas vías no presentó lesiones. Por otra parte, no se reconocieron diferencias entre los grupos en lo que concierne a número total de células, macrófagos, proteína y deshidrogenasa láctica, obtenidos mediante LBA; sin embargo, los PMN, monocitos y linfocitos sí resultaron diferentes, particularmente en los animales que recibieron el LPS de *P. haemolytica* por vía endotraqueal y en los que se les indujo la RS con el mismo LPS. Se concluye que el LPS de *P. haemolytica* es capaz de provocar una reacción flogística en el pulmón tanto por vía endotraqueal como endovenosa, aunque la respuesta es mucho más intensa en la primera; asimismo, que la RS no provoca una respuesta inflamatoria más intensa que la sola inoculación endotraqueal del LPS de *P. haemolytica*. Finalmente, que el conejo es un buen modelo para evaluar la respuesta inflamatoria pulmonar provocada por el LPS de *P. haemolytica*.

## Introducción

El daño tisular generado por la respuesta inflamatoria en el pulmón es una de las formas más comunes de enfermedad tanto en el hombre (61) como en los animales (69). Las endotoxinas o LPS, componentes mayoritarios de la pared de las bacterias Gram negativas (62), son los principales responsables en muchos de estos casos (65,91).

Evidencias clínicas y experimentales sugieren que la activación del complemento, particularmente la fracción C5, y los PMN, participan en el desarrollo del daño pulmonar mediado por LPS (65,77). Sin embargo, más recientemente, ha quedado de manifiesto la relevancia de la interleucina-1 (IL-1 ) y del factor de necrosis tumoral (TNF) en estos eventos inflamatorios (65,80,81,87). De hecho, se estima que los LPS ejercen su acción primordial indirectamente a través de células sensibilizadas por éstos y la consiguiente inducción de mediadores proinflamatorios. Al respecto, se considera a los macrófagos, tanto a los alveolares como a los intravasculares, como las células más importantes en la promoción del daño tisular en el pulmón (81,91).

*P. haemolytica* es la bacteria de mayor importancia en las neumonías de los bovinos y ovinos; sin embargo, carece de patogenicidad para los demás animales domésticos (25,68,96). El LPS de esta bacteria se ha postulado como un importante factor de virulencia en el desarrollo de la severa

bronconeumonía fibrinopurulenta que caracteriza a la pasteurelosis neumónica (PN) (12,13,66,88,89,90,91).

Tanto las características fisicoquímicas como las propiedades biológicas del LPS de *P. haemolytica* son similares a las de otras bacterias Gram negativas (96). La capacidad para provocar la RS en la piel del conejo es una de las propiedades biológicas más notables del LPS de *P. haemolytica* (63).

La RS es un fenómeno inflamatorio semejante a una reacción alérgica, inducida sobre todo por LPS y originalmente descrita en la piel del conejo. Este fenómeno resulta de un imbalance en los mecanismos de coagulación y fibrinólisis con la participación también del complemento y los PMN (49,52,75). Más recientemente se ha demostrado que la IL-1 y el TNF participan de manera relevante (7,53).

La RS puede ser local o generalizada dependiendo de la ruta de administración de la primera dosis de LPS (inoculación preparatoria). En el primer caso el inóculo debe ser intradérmico mientras que en el segundo es endovenoso. Subsecuentemente, 18 a 24 h después, los animales reciben una dosis del LPS por vía endovenosa (inoculación desencadenante). En la RS local aparecerá una lesión hemorrágica y necrotizante en el área de la piel que recibió la inoculación preparatoria. En la forma generalizada el animal sufrirá de un fenómeno de coagulación intravascular diseminada, similar al shock séptico (49,52). Además, también se ha descrito una forma univisceral de la RS en la cual el órgano blanco, sea el riñón, el hígado o el pulmón, recibe el inóculo preparatorio (49).

Recientemente, se ha logrado provocar la RS en el pulmón de conejos, empleando LPS de *P. multocida* (59). Con base en los resultados obtenidos en ese experimento, se propuso que la RS podría estar involucrada en la patogénesis de la PN (59). En el presente trabajo se prosigue con la experiencia adquirida, pero ahora empleando el LPS obtenido de *P. haemolytica* tipo A1, la bacteria mayormente asociada con el desarrollo de las lesiones pulmonares características de la PN; lo anterior, buscando confirmar tanto la hipótesis previa para explicar la patogenia del padecimiento, como la utilidad del conejo para este propósito.

### Material y Métodos

Lipopolisacáridos. Se extrajo el LPS de una cepa de *P. haemolytica* tipo A1 denominada 82-25. El procedimiento se realizó empleando una solución compuesta por fenol, cloroformo y éter de petróleo en proporción 2:5:8 respectivamente, según el procedimiento recomendado (32). El LPS de *E. coli* (026:B6) fue obtenido comercialmente (List Laboratories, Inc. Campbell, CA). Se empleó SSF libre de pirógenos (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) como vehículo para las inoculaciones.

Animales. Se emplearon 40 conejos Nueva Zelanda, machos de 2.2 kg de peso al inicio del experimento (Small Stock Industries, Pea Ridge, AR). Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales con alimento comercial y agua *ad libitum*.

Serología. Previamente, se determinó en los conejos la presencia de anticuerpos hacia los LPS de *E. coli* (Grupo 2) y *P. haemolytica* (grupos 3, y 5), empleando una prueba de hemoaglutinación pasiva con eritrocitos de borrego adsorbidos con los LPS respectivos (56). El procedimiento fue como sigue: los eritrocitos fueron lavados tres veces con una solución 0.01 M PBS, pH 7.2 y ajustada a una suspensión al 1%. Los LPS de *P. haemolytica* y de *E. coli* fueron añadidos a cada una de las suspensiones en cantidades de 50 µg; subsecuentemente, fueron incubados a 37°C durante una hora. Posteriormente, los eritrocitos fueron nuevamente lavados en tres ocasiones con PBS pH 7.2 y ajustados a una suspensión de 0.5%. A continuación, se realizaron diluciones dobles seriadas del suero de los conejos en un volumen de 50 µl de PBS en microplacas. A estas diluciones se añadieron 50 µl de los eritrocitos sensibilizados. Luego las microplacas fueron agitadas en un agitador automático (Microtiter Plate Shaker, Lab-line Instruments, Inc.), para ser incubadas por 2 h en un cuarto con temperatura controlada a 37°C.

Inoculación. Se establecieron 5 grupos de 8 conejos cada uno. El grupo 1 recibió SSF (1.5ml) por vía endotraqueal y SSF (1.0ml) por vía endovenosa, 24 h más tarde; el grupo 2 recibió 50 µg de LPS de *E. coli* por vía endotraqueal y 100 µg del mismo LPS por vía endovenosa, contenidos en volúmenes similares. Al grupo 3 se le administró 50 µg de LPS de *P. haemolytica* por ruta endotraqueal y SSF por vía endovenosa; el grupo 4 recibió SSF por ruta endotraqueal y 100 µg del LPS de *P. haemolytica* por vía endovenosa, y al grupo 5 se le administró LPS de *P. haemolytica* tanto

por vía endotraqueal como endovenosa. En el cuadro 1.1 se presenta el diseño experimental correspondiente.

Para el procedimiento de inoculación endotraqueal (preparatoria) los animales se tranquilizaron con clorhidrato de ketamina (Ketaset, Aveco, Co., Inc., Fort Dodge, IA) y maleato de acepromazina (Promace, Ayerst Laboratories, Inc., New York, NY). Después de la inoculación endotraqueal los animales se mantuvieron en una posición vertical por 1 min, para asegurarse que el inóculo alcanzaría las porciones distales del pulmón. La inoculación endovenosa se realizó en la vena marginal de la oreja.

A manera de indicador de la RS que se pretendía inducir en el pulmón, se realizó una inoculación intradérmica del LPS de *P. haemolytica* (100 µg del LPS en 0.1ml de SSF) al tiempo que se realizaba la inoculación endotraqueal del mismo LPS, en los grupos 3, 4 y 5. Lo anterior para que ante la inoculación desencadenante, se indujera una RS local en la piel de los animales de los grupos correspondientes.

Necropsia. A las 36 h posteriores al inóculo preparatorio (12 h después del desencadenante), los conejos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Sleepaway, Fort Dodge Laboratories, Inc., Fort Dodge, IA) y luego desangrados por sección de los grandes vasos abdominales. A continuación, se abrió la cavidad torácica para exponer los pulmones; en este punto la tráquea fue comprimida con unas pinzas hemostáticas. Todo el paquete visceral se extrajo cuidadosamente y se registraron las lesiones macroscópicas; asimismo, se tomaron fotografías de los pulmones de todos

los animales. Posteriormente, se procedió a comprimir el bronquio que conducía al pulmón derecho, justo después de la bifurcación de éstos. Luego, se tomaron pequeñas piezas de tejidos del pulmón derecho para fijarlas por inmersión en formalina al 10% amortiguada y procesarlas posteriormente por los procedimientos convencionales. Vale mencionar que aparte de la tinción de rutina (H&E) se realizó también una tinción especial para demostrar fibrina (38). Otros pequeños trozos del tejido se emplearon para estudios bacteriológicos de rutina para comprobar esterilidad.

Por otra parte, se examinaron las lesiones cutáneas de cada animal y también se tomaron fotografías de ellas. Asimismo, se tomaron pequeños trozos de la piel dañada para fijarlas en formalina al 10% amortiguada y procesarlas posteriormente por los procedimientos convencionales (38).

Lavados Bronquioalveolares. Los LBA se llevaron a cabo en el pulmón izquierdo. Con una jeringa de 20 ml adaptada a un catéter, se depositaron en la tráquea 15 ml de SSF (dejando la pinza hemostática comprimiendo el bronquio que conducía al pulmón derecho), los cuales fueron posteriormente aspirados con la misma jeringa casi en su totalidad. Este procedimiento se llevó a cabo en seis ocasiones. Finalmente, se determinó el volumen total recuperado. Una muestra de este fluido se utilizó para determinar la cantidad total de células en un aparato automatizado (Nova Celltrak 2, Waltham, Mass). El fluido restante se centrifugó a 200 X g durante 20 min (H6000A rotor, RC3C Sorvall Centrifuge, DuPont, Wilmington, DE). El paquete celular se resuspendió en SSF para preparar frotis teñidos (Diff-Quick, American Scientific Products, McGaw Park, IL) y proceder a su conteo

diferencial. Vale mencionar que la determinación total de las células se realizó por duplicado, de tal manera que de cada animal se obtuvieron dos valores y, por ende, también valores dobles del conteo diferencial. Lo anterior, con la intención de obtener un número mayor de observaciones. Finalmente, el sobrenadante se empleó para determinar el total de proteínas (10), utilizando reactivos comerciales (Biorad Laboratories, Richmon, CA), lo mismo que para determinar la concentración de deshidrogenasa láctica (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO).

Microbiología. Rutinariamente se tomaron pequeñas piezas del pulmón derecho para realizar su estudio bacteriológico. Las muestras se inocularon en agar trypticasa soya con 0.5% de sangre de borrego desfibrinada (Dimed Corp., St. Paul, MN) y agar MacConkey (Difco, Lab., Detroit, MI). Las placas se incubaron por 48 horas a 37° C y se examinaron diariamente.

Análisis Estadístico. Los resultados obtenidos de los LBA concernientes a total de células, macrófagos, PMN, linfocitos, monocitos, proteína y deshidrogenasa láctica, fueron comparados entre los diferentes grupos, empleando el análisis de varianza a través de un diseño completamente al azar (72). Posteriormente, cuando se demostraron diferencias entre los grupos, se realizó una comparación de las medias mediante la prueba de Scheffé (72).

Cuadro 1.1

## DISEÑO EXPERIMENTAL

	0 horas* Inoculación Endotraqueal	0 horas* Inoculación Intradérmica	24 horas Inoculación Endovenosa	36 horas Sacrificio
Grupo 1	1.5 ml SSF	no	1 ml SSF	si
Grupo 2	LPS <i>E. coli</i> 50 µg/1.5 ml SSF	no	LPS <i>E. coli</i> 100 µg/1 ml SSF	si
Grupo 3	LPS <i>P. h.</i> 50 µg/1.5 ml SSF	LPS <i>P. h.</i> 100 µg/0.1 ml SSF	1 ml SSF	si
Grupo 4	1.5 ml SSF	LPS <i>P. h.</i> 100 µg/0.1 ml SSF	LPS <i>P. h.</i> 100 µg/1 ml SSF	si
Grupo 5	LPS <i>P. h.</i> 50 µg/1.5 ml SSF	LPS <i>P. h.</i> 100 µg/0.1 ml SSF	LPS <i>P. h.</i> 100 µg/1 ml SSF	si si

SSF: Solución Salina Fisiológica; LPS: Lipopolisacárido de *E. coli* o de *P. haemolytica* (*P. h.*), según corresponda.

\* La inoculación endotraqueal y la intradérmica se realizaron simultáneas y correspondieron a las inoculaciones preparatorias. Sólo los grupos 3, 4 y 5, que recibieron LPS de *P. haemolytica* fueron incluidos en el ensayo cutáneo.

## Resultados

Serología. Mediante la prueba de hemoaglutinación pasiva, se determinó que los animales de todos los grupos, resultaron negativos al LPS de la cepa 026:B6 de *E. coli* (<1:10), lo mismo que al LPS de *P. haemolytica*, cepa 82-25 (<1:5). En ambos casos, se incluyeron sueros control para corroborar los resultados de la prueba.

Microbiología. Los estudios bacteriológicos resultaron negativos en la mayoría de los casos, y sólo en unos cuantos, se aisló *Achromobacter sp.* Lo anterior se consideró resultado de contaminación durante la manipulación de las muestras.

Patología. Los animales del grupo 1 que recibieron SSF por ambas vías, no mostraron cambios macroscópicos (figura 1.1) ni microscópicos en sus pulmones (figura 1.2).

Los conejos del grupo 3 que recibieron LPS de *P. haemolytica* por vía endotraqueal y luego SSF por vía endovenosa, presentaron un daño moderado en sus pulmones, caracterizado por falta de colapso, pequeñas áreas de consolidación de color rojizo-grisáceo y hemorragias (figura 1.3).

Microscópicamente, estos animales presentaron congestión intersticial e infiltración de numerosos PMN. En muchas áreas se apreciaron numerosos bronquiolos y alveolos con severo edema alveolar, rico en proteína, acompañado de numerosos PMN. Las zonas de total consolidación correspondieron a hemorragias, necrosis, exudado serofibrinoso y abundante infiltración de PMN; también se reconoció edema y PMN infiltrando alrededor de algunos vasos sanguíneos. En algunos vasos sanguíneos de mediano calibre se apreció infiltración subendotelial de PMN (figuras 1.4 y 1.5).

Los animales del grupo 3 no presentaron una RS positiva en la piel; no



Figura 1.1. Se muestran los pulmones sin cambios macroscópicos. Conejo perteneciente al grupo 1.

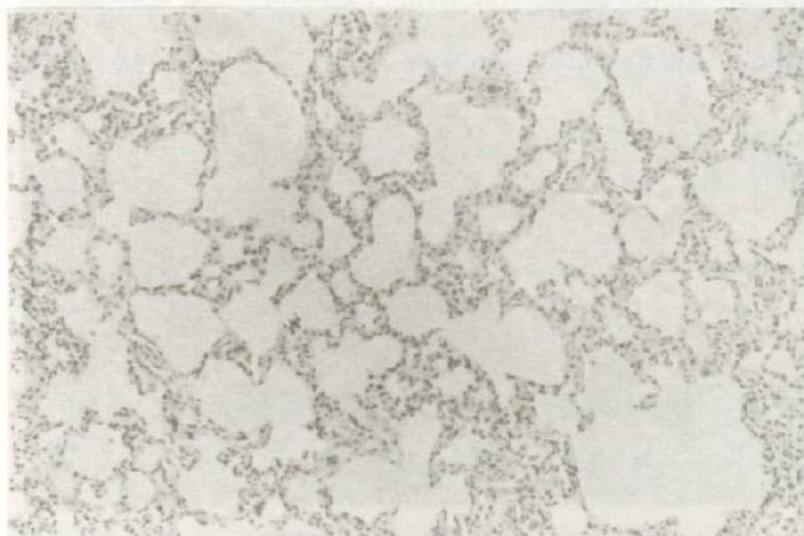


Figura 1.2 Se observa la arquitectura normal en los alveolos. Conejo incluido en el grupo 1. 160 X



Figura 1.3. Se muestran pulmones con áreas hemorrágicas. Conejo perteneciente al grupo 3.



Figura 1.4 Se observa una área de extensa consolidación y exudado en bronquiolos. Conejo perteneciente al grupo 3. 100 X.

obstante, microscópicamente se reconoció congestión, infiltración difusa de PMN e histiocitos, lo mismo que focal asociada al sitio del inóculo (figura 1.6).

En los pulmones de los animales que recibieron SSF por vía endotraqueal y luego LPS de *P. haemolytica* por vía endovenosa (grupo 4), se reconoció una discreta congestión en la mayoría de ellos. Microscópicamente se apreció edema intersticial y en algunas áreas edema alveolar. Los PMN se observaron infiltrando en intersticio y sólo ocasionalmente en la luz de los alveolos. También se apreció edema e infiltración de PMN alrededor de algunos vasos sanguíneos. Eventualmente, se observaron PMN localizados subendotelialmente en venas de mediano calibre y en algunos casos, ocluyéndolas (figura 1.7).

La piel de los animales de este grupo presentó una RS típica, como cabría esperarla (figura 1.8). Histológicamente se reconocieron áreas de extensa hemorragia y necrosis, así como trombosis de los vasos sanguíneos asociada a vasculitis. Los PMN fueron las células que mayormente se reconocieron en este proceso inflamatorio (figura 1.9 y 1.10).

Los animales de los grupos 2 y 5 que recibieron respectivamente LPS de *E. coli* y *P. haemolytica*, primero por vía endotraqueal y subsecuentemente por ruta endovenosa, tuvieron cambios en sus pulmones, similares a los que se observaron en los animales del grupo 3; aunque en algunos casos, las lesiones hemorrágicas fueron más notorias (figura 1.11). De igual forma, los cambios histológicos fueron similares a los del grupo 3; sin embargo, en las

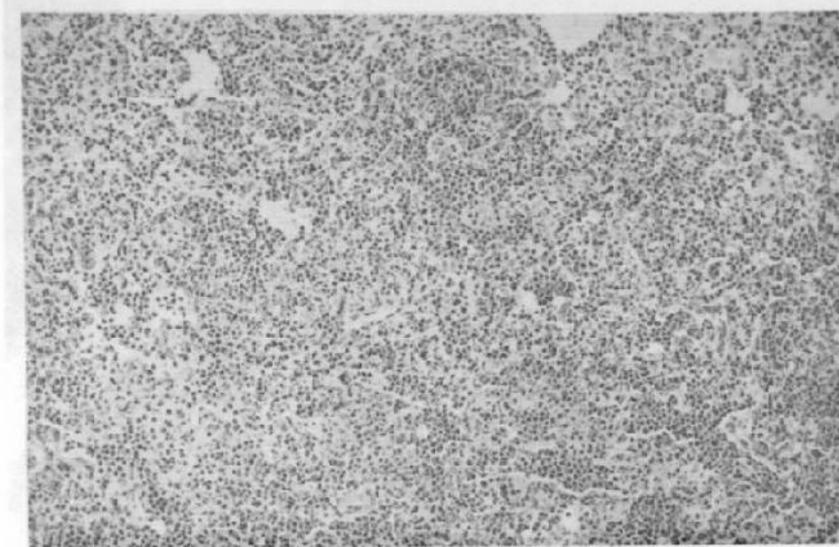


Figura 1.5 Se observa una área de extensa consolidación y abundante infiltración de PMN. Conejo perteneciente al grupo 3. 100 X.



Figura 1.6 Se observa una área con abundante infiltración de PMN, necrosis y edema, en dermis. Conejo perteneciente al grupo 3. 100 X.

Figura 1.8

septos alveolares. Conejo incluido en el grupo 4. 160 X.

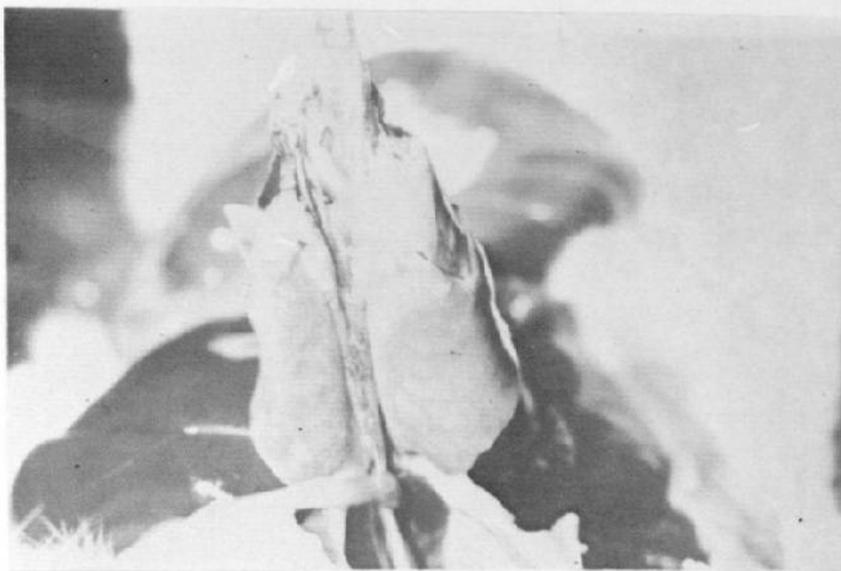


Figura 1.7 Se muestran pulmones turgentes y congestionados. Conejo perteneciente al grupo 4.

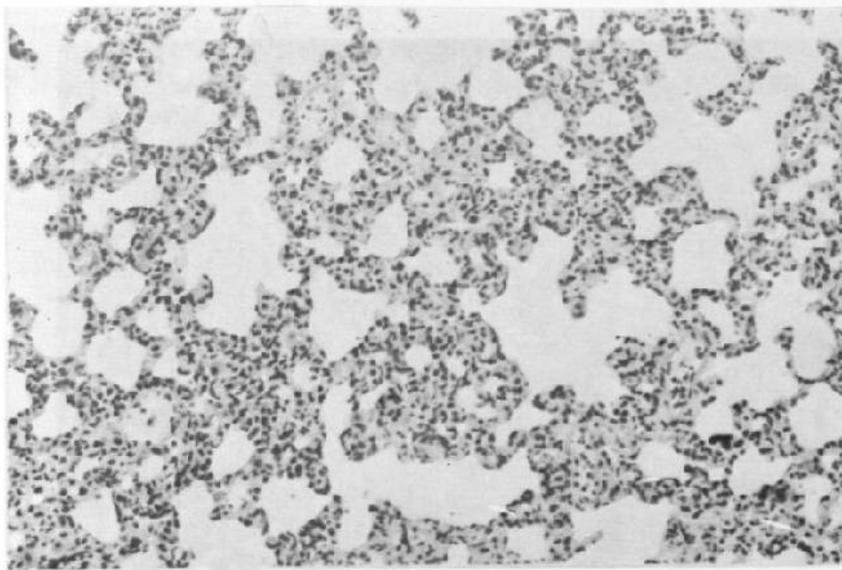


Figura 1.8 Se observa una área con engrosamiento y celularidad de los septos alveolares. Conejo incluido en el grupo 4. 160 X.

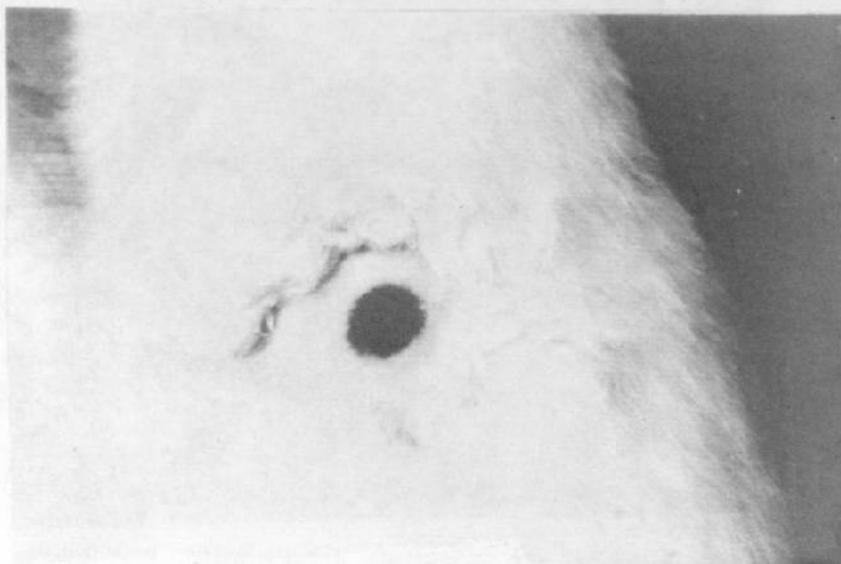


Figura 1.11 Se observa trombosis y hemorragia en dermis con infiltración  
Figura 1.9 Se muestra una reacción de Shwartzman típica. Conejo perteneciente al grupo 4.

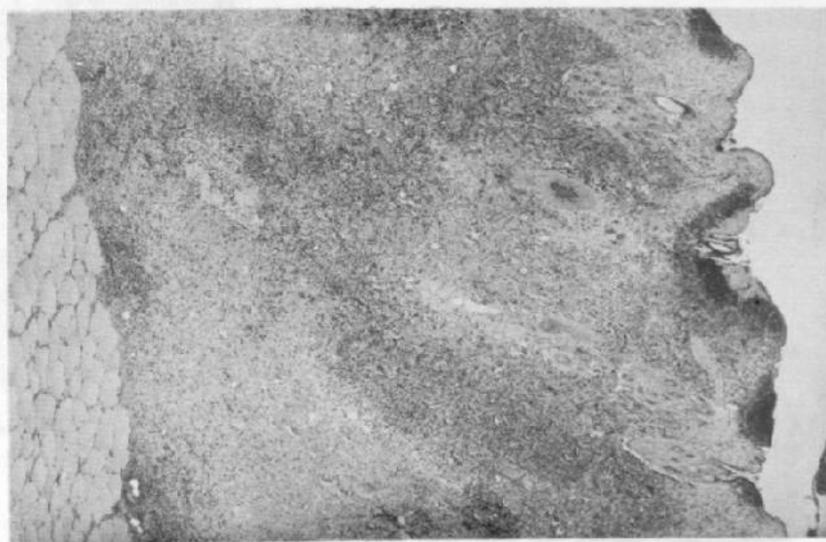


Figura 1.10 Se observa una área con intensa hemorragia que involucra  
dermis. Conejo perteneciente al grupo 4. 40 X.



**Figura 1.11** Se observa trombosis y hemorragia en dermis con infiltración adyacente y difusa de PMN. Conejo perteneciente al grupo 4. 100 X.



**Figura 1.12** Se observan pulmones turgentes y con áreas de consolidación. Conejo incluido en el grupo 5.

zonas de mayor daño, caracterizadas por edema alveolar rico en proteína, necrosis, hemorragias y abundante infiltración de PMN, las tinciones especiales demostraron positividad para fibrina. Esta intensidad en la respuesta inflamatoria fue más manifiesta en los animales del grupo 5 (figuras 1.12 y 1.13). Por otra parte, aunque las lesiones vasculares en estos grupos fueron similares a las anteriormente descritas, se observó trombosis parcialmente constituida en algunos vasos de mediano calibre (figura 1.14), lo cual resultó también más evidente en el grupo 5. Vale señalar que en estos grupos murió un animal en cada uno de ellos, mostrando intensas lesiones hemorrágicas en sus pulmones y también, en riñones, hígado e intestino; estos hallazgos se consideraron indicativos de una reacción sistémica.

Finalmente, en el grupo 5 se presentó una RS en la piel de todos los animales. Las características histológicas fueron similares a las del grupo 4.

Lavados Bronquioalveolares. Los análisis de varianza demostraron que existían diferencias significativas entre los grupos, cuando se compararon total de células ( $p < 0.05$ ), PMN ( $p < 0.005$ ), linfocitos ( $p < 0.025$ ) y monocitos ( $p < 0.005$ ). Mientras que macrófagos, proteína y deshidrogenasa láctica, no mostraron diferencia entre los grupos ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, cuando se realizó la prueba de Scheffé para identificar las diferencias entre las medias, se pudo constatar que sólo las comparaciones de PMN, linfocitos y monocitos, resultaban realmente diferentes entre los grupos. Al respecto, el grupo 3 mostró ser el que aportaba los valores más elevados, pero nunca diferentes del grupo 5. En la tabla 1.1 se presentan el total, la media y la

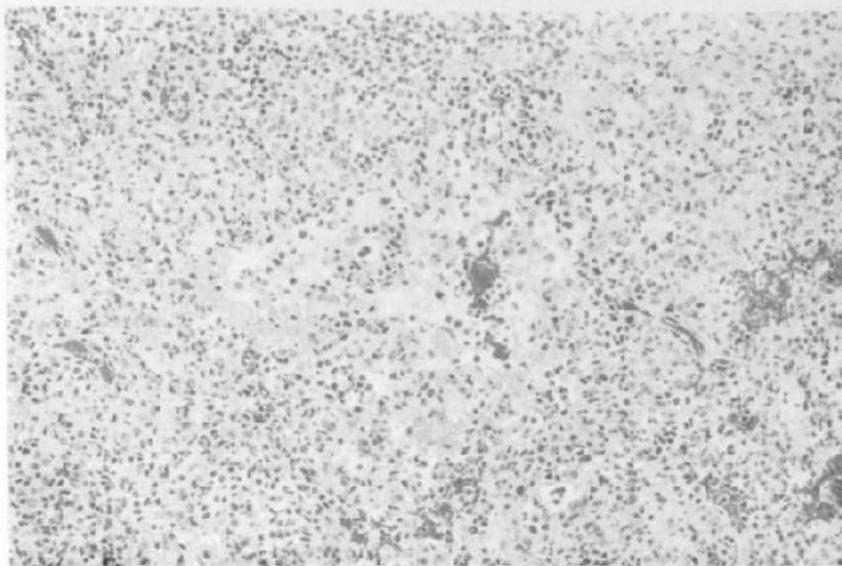


Figura 1.13 Se observa una área con exudado serofibrinoso en alveolos e intensa infiltración de PMN. Conejo perteneciente al grupo 5. 100 X.

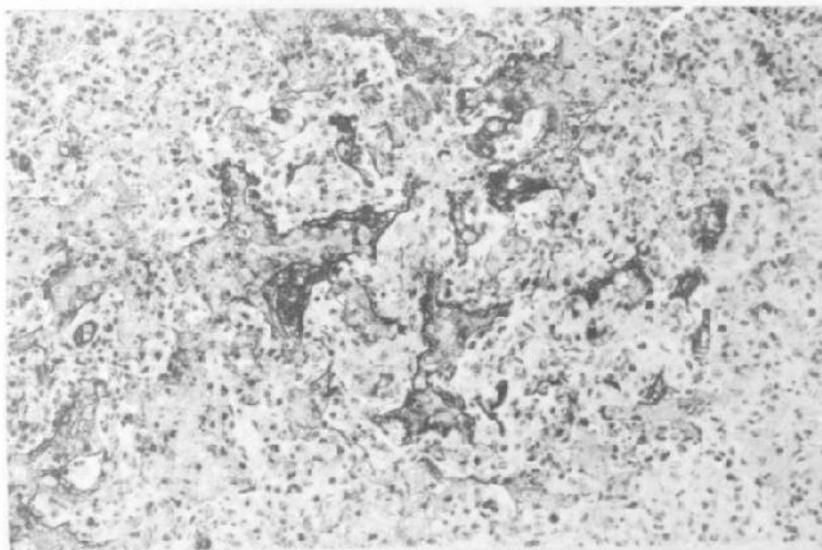


Figura 1.14 Se observa positividad a la presencia de fibrina en una área de consolidación y necrosis. Conejo perteneciente al grupo 5. 160 X.

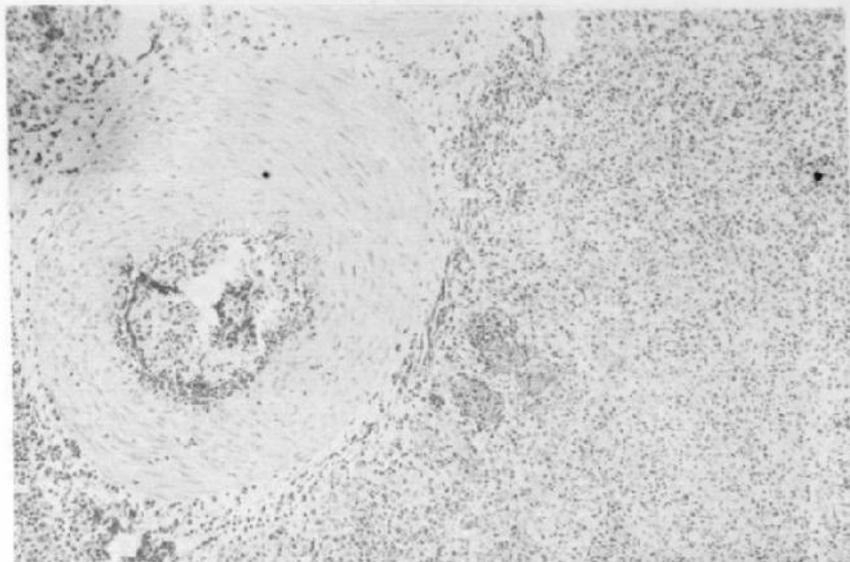


Figura 1.15 Se muestra trombosis en una arteria de mediano calibre en una área de extensa consolidación. Conejo perteneciente al grupo 5. 100 X. 100 X.

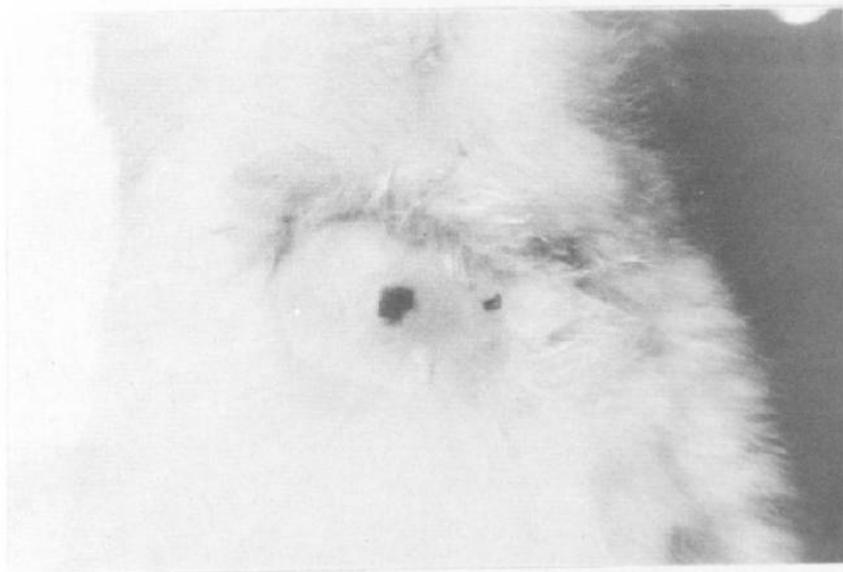


Figura 1.16 Se muestra una reacción de Shwartzman típica. Conejo perteneciente al grupo 5.

de los datos obtenidos de todas las variables en los diferentes grupos, en tanto que los resultados más importantes se detallan en el apéndice A.



Figura 1.17 Se observa trombosis en pequeñas venas de la dermis; asimismo intensa infiltración de PMN y edema. Conejo perteneciente al grupo 5. 100 X.

desviación estándar de todas las variables en los diferentes grupos, en tanto que los procedimientos estadísticos se detallan en el apéndice A.

Tabla 1.1

COMPARACION DE LOS VALORES: TOTAL DE CELULAS, MACROFAGOS, PMN,  
LINFOCITOS, MONOCITOS, PROTEINA Y DESHIDROGENASA LACTICA,  
OBTENIDOS DE LBA EN LOS DIFERENTES GRUPOS

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	
Total de Células	11,300	13,400	15,500	10,500	10,900	T
	706.25 a	957.14 a	968.75 a	656.25 a	778.57 a	M
	288.60	224.34	532.56	189.62	361.99	DE
Macrófagos	9,305	8,362	8,208	7,019	7,727	
	581.56 a	597.28 a	513.00 a	438.68 a	551.92 a	
	212.20	249.64	257.71	139.76	230.93	
PMN	1,779	4,957	6,665	3,013	2,701	
	111.18 a	354.07 bc	416.56 c	188.31 ab	192.92 abc	
	96.20	211.64	290.24	178.01	146.46	
Linfocitos	68	20	216	178	155	
	4.25 ab	1.42 a	13.50 c	11.12 bc	11.07 abc	
	5.73	3.63	13.21	6.33	7.64	
Monocitos	210	135	528	347	410	
	13.12 ab	9.64 a	33.00 c	21.68 abc	29.28 bc	
	10.65	5.98	22.12	11.62	16.45	
Proteína	4.17	6.77	6.69	4.88	3.67	
	0.52 a	0.84 a	0.83 a	0.61 a	0.45 a	
	0.27	0.77	0.59	0.65	0.29	
Deshidrogenasa Láctica	0	86	221	197	128	
	0.00 a	10.75 a	27.62 a	24.62 a	16.00 a	
	0.00	20.61	42.08	38.57	21.81	

T: Total, M: Media, DE: Desviación Estándar. Los valores han sido estimados por ml. Las literales iguales entre los grupos significan ausencia de diferencia, mientras que las literales distintas corresponden a diferencias significativas mediante la prueba de Scheffé.

## Discusión

Las lesiones que caracterizan la severa neumonía fibrinosa que se presenta en los casos de PN incluyen intensa exudación de fibrina en alveolos con trombosis de los capilares, áreas de hemorragia, necrosis con participación predominante de PMN y trombosis en linfáticos interlobulillares, al igual que en vasos sanguíneos (3,4,27,40,60,83). Dado que estas lesiones también forman parte de la RS (49,52,75) se ha propuesto que este fenómeno pudiera participar en la patogénesis de la lesión pulmonar (59).

Por otra parte, las interacciones entre el LPS de *P. haemolytica* y los componentes tisulares del pulmón, también avalan la propuesta anterior, por ejemplo: durante la inducción de neumonía fibrinosa mediante la administración endotraqueal de *P. haemolytica*, el LPS derivado, interactúa con las superficies epiteliales, macrófagos y PMN; pero también lo hace con PMN en intersticio, células endoteliales de capilares y macrófagos intravasculares del pulmón (88,90,91). Además, se ha detectado un desbalance en las actividades procoagulante y profibrinolítica de los macrófagos alveolares y de los PMN, recolectados de sitios con lesión neumónica inducida por *P. haemolytica*; este desequilibrio favorece el desarrollo de trombosis (17). Inclusive, *P. haemolytica* muerta lo mismo que su LPS, son capaces de provocar edema alveolar, exudación de fibrina y

agregación de PMN y plaquetas en capilares, cuando se administran por vía respiratoria (88,89,90).

Como puede apreciarse, los datos anteriores señalan la alta sensibilidad del pulmón al efecto del LPS de *P. haemolytica*, lo cual podría interpretarse como equivalente al efecto preparatorio en la RS. En tanto que, la demostración de elevados niveles plasmáticos de LPS, luego de la administración endotraqueal del LPS de *P. haemolytica* (70) y el hecho de que la inoculación endovenosa de la bacteria también induzca lesiones en pulmón compatibles con las que se reconocen en casos naturales de PN (76), avalan la posibilidad de que en su patogenia pudiera participar también un efecto desencadenante por ruta endovenosa, tal y como acontece en la RS.

La RS univisceral en el pulmón del conejo, se ha descrito con lesiones predominantes hemorrágicas y de necrosis. La gravedad de las lesiones pulmonares, puede asociarse con cambios en otros órganos, particularmente en riñones e hígado, causando, inclusive, la muerte de los animales (67). En cambio, en el presente experimento, las lesiones pulmonares fueron los cambios más significativos, salvo dos animales, uno en el grupo 2 y el otro en el 5, que murieron mostrando lesiones sistémicas. La diferencia puede ser explicada por las dosis empleadas, ya que en el experimento referido anteriormente se emplearon 2.5 mg de LPS de *E.coli* como dosis de preparación y 0.8 como dosis desencadenante (67), mientras que aquí se emplearon 50 y 100 µg de LPS de *P. haemolytica*, respectivamente. Por lo tanto, puede decirse que en este modelo, a la dosis empleada, el LPS de *P. haemolytica* es lo suficientemente flogístico como para provocar lesiones,

sin que existan complicaciones sistémicas en la mayoría de los animales inoculados.

La RS en el pulmón, empleando LPS de *P. multocida* provocó intensas lesiones en los pulmones de conejos, caracterizadas por extensas zonas de consolidación notoriamente infiltradas por PMN, necrosis, hemorragias y, en algunos casos, trombosis (59). Sin embargo, en este estudio se empleó el LPS de una bacteria a la que el conejo es sumamente susceptible (68) y, por otra parte, se ignoró la presencia de anticuerpos naturales, lo cual debió haber influido en el desarrollo de la lesión; no obstante, la discusión se centró sobre la PN del ganado (59). En cambio, en el presente experimento, se empleó el LPS de *P. haemolytica*, una bacteria cuya patogenicidad está limitada casi exclusivamente a rumiantes, mientras que otros animales, incluyendo el conejo, no son naturalmente susceptibles (68). Además, se descarta la participación de anticuerpos naturales, conforme los resultados negativos en la prueba de hemoaglutinación pasiva. En consecuencia, puede afirmarse que las lesiones que aquí se indujeron corresponden exclusivamente al efecto flogístico del LPS de *P. haemolytica*.

En el presente estudio las lesiones del grupo 5 confirman que la RS se parece a la PN, particularmente por el desarrollo de trombosis y exudación de fibrina, como se había propuesto antes (59); sin embargo, queda de manifiesto que la sola inoculación endotraqueal provoca una reacción flogística en el pulmón superior a la endovenosa y que no se establece sinergismo entre ambas cuando se asocian en una RS. De hecho, la respuesta flogística reconocida mediante LBA, determina que la subsecuente

inoculación endovenosa (desencadenante) en la RS, disminuye la intensidad de la respuesta inflamatoria endotraqueal. Esta situación contrasta con lo referido en el estudio previo en el que se indujo la RS en el pulmón, empleando LPS de *P. multocida*, porque en éste se apreció que las rutas de inoculación (primero endotraqueal y luego endovenosa), empleadas para provocar la RS, resultaban sinérgicas (59); sin embargo, no se evaluó la respuesta inflamatoria por medio de LBA (59), tal y como aquí sucedió.

Con relación a la mayor contribución de la ruta endotraqueal en la generación de la respuesta inflamatoria del pulmón, puede mencionarse un estudio en borregos en donde se observó que el espacio alveolar es más flogístico que el endovenoso, ante la exposición por estas rutas del LPS de *E. coli* y que, a pesar de esta respuesta exudativa mayor, las células del epitelio no muestran alteraciones en su morfología ni en su función (92). Observaciones similares han sido realizadas en ratas, encontrándose una desproporcionada respuesta inflamatoria por PMN en ausencia de indicadores enzimáticos de daño celular en los LBA (44), lo cual corresponde con lo que aquí se encontró.

Al respecto, pudiera ser también que la administración endotraqueal sea lo suficientemente flogística, de tal manera que la inoculación endovenosa subsecuente no aporta un estímulo mayor en la RS, o que se haya desarrollado un efecto de tolerancia temprana ante la administración endotraqueal del LPS de *P. haemolytica* y que éste haya impedido la exposición plena de la respuesta inflamatoria esperada ante el desafío endovenoso subsecuente. Como se sabe, pequeñas dosis de LPS

administradas previamente a un desafío mayor con el mismo compuesto, previenen el desarrollo de efectos indeseables como el shock; a este efecto protector se le ha llamado tolerancia temprana (35,36).

Con anterioridad se han expresado opiniones que señalan a los rumiantes como los modelos más adecuados y casi exclusivos para el estudio de *P. haemolytica* y sus efectos patológicos (16); no obstante, en este experimento se demuestra que el conejo es también un modelo adecuado porque refleja ampliamente los efectos patológicos del LPS en su pulmón. Asimismo, queda de manifiesto la importancia de la endotoxina en el desarrollo del daño pulmonar; lo anterior, al considerar que empleando únicamente el LPS de la bacteria, pudo provocarse un daño pulmonar compatible con las lesiones de PN, en un animal que no es susceptible naturalmente a *P. haemolytica* (68). Por otra parte, se ha demostrado que la leucotoxina de *P. haemolytica* no provoca daño pulmonar en el ratón cuando se administra por vía endotraqueal (45).

Finalmente, se concluye que el conejo es un buen modelo para experimentar con el LPS de *P. haemolytica* en el desarrollo de lesiones neumónicas y que la RS en el pulmón, refleja, en gran parte, las lesiones que se reconocen en los casos de PN; empero, es la ruta endotraqueal la que genera una respuesta flogística más intensa y, por lo tanto le corresponde una participación protagónica más relevante en el desarrollo de las lesiones neumónicas pulmonares.

## Experimento 2

### Contribución Mayor del Inóculo por Vía Respiratoria en el Desarrollo de la Reacción de Shwartzman en el Pulmón del Conejo

Como se ha señalado en el trabajo anterior, la Reacción de Shwartzman (RS) en el pulmón del conejo, se considera un modelo de daño pulmonar compatible con lo que ocurre naturalmente en los casos de pasteurelosis neumónica (PN) del ganado (experimento 1). Por este motivo, se ha empleado en esta serie de experimentos el lipopolisacárido (LPS) de *Pasteurella haemolytica*, considerándose también que este compuesto es el factor de virulencia más importante de la bacteria en el desarrollo de la lesión pulmonar.

En el experimento anterior se demostró, mediante lavados bronquioalveolares (LBA), que la afluencia de polimorfonucleares (PMN) a los espacios alveolares fue mayor en los animales que únicamente recibieron el inóculo por vía endotraqueal, mientras que aquellos que recibieron además el inóculo endovenoso 24 h después, para generar la RS en sus pulmones, tuvieron menor número de células (experimento 1); si bien, estadísticamente no hubo diferencias entre estos grupos ( $p > 0.05$ ). Lo anterior pudo deberse a un fenómeno de tolerancia temprana (experimento 1) o bien, simplemente, a que a la dosis empleada para la inoculación endotraqueal, la respuesta inflamatoria en el pulmón haya sido suficiente, sin que hubiera una mayor

contribución del desafío endovenoso. En el presente experimento se ha explorado esta posibilidad y por esto, se ha incrementado a 100  $\mu\text{g}$  la dosis del LPS de *P. haemolytica* empleada en la inoculación endotraqueal. La intención fue comparar la respuesta flogística de la vía endotraqueal contra la endotraqueal y, subsecuentemente, la endovenosa, tal y como se ha descrito en la RS, evaluando tanto las células recobradas mediante LBA como proteína y deshidrogenasa láctica, así como los cambios histológicos como se realizó en el experimento anterior.

Se emplearon 6 conejos Nueva Zelanda con las mismas características del caso anterior y mantenidos en las mismas condiciones. Los animales se dividieron en dos grupos de tres individuos cada uno. El LPS de *P. haemolytica* fue el mismo también. De igual forma, se determinó mediante la prueba de hemoaglutinación pasiva, la ausencia de anticuerpos contra el LPS de *P. haemolytica*. Finalmente, los procedimientos de inoculación, necropsia, LBA, recolección de muestras y proceso histológico, fueron semejantes a los realizados en el experimento anterior. Para el procedimiento estadístico de los valores obtenidos de los LBA, se empleó la prueba “t” Student, mancomunando las varianzas (72). En el cuadro 2.1 se presenta el diseño experimental y en el apéndice A todos los procedimientos estadísticos.

Cuadro 2.1

## DISEÑO EXPERIMENTAL

	0 horas Inoculación Endotraqueal	24 horas Inoculación Endovenosa	36 horas Sacrificio
Grupo 1	LPS <i>P.h.</i> * 100 µg/1.5 ml SSF	1 ml SSF **	si
Grupo 2	LPS <i>P.h.</i> 100 µg/1.5 ml SSF	LPS <i>P.h.</i> 100 µg/1 ml SSF	si

\* LPS *P.h.* : Lipopolisacárido de *Pasteurella haemolytica*

\*\* SSF: Solución Salina Fisiológica

Las lesiones histológicas fueron similares a las que se reconocieron en el experimento previo; es decir, en ambos casos hubo neumonía intersticial con abundante exudado serofibrinoso en alveolos, zonas de consolidación con hemorragias, necrosis y un intenso infiltrado de PMN. Lesiones vasculares caracterizadas por hemorragias perivasculares y trombosis, se apreciaron en dos de los animales incluidos en el grupo 2 .

Los datos arrojados por los LBA, demostraron que no existió diferencia ( $p > 0.05$ ) en el número total de células, proteína ni deshidrogenasa láctica. Sin embargo, los macrófagos resultaron significativamente superiores

( $p < 0.05$ ) en el grupo 2 (RS), mientras que los PMN lo fueron ( $p < 0.05$ ) en el grupo 1 (tabla 2.1). No obstante, se confirman los resultados del experimento anterior, en el sentido de que la inoculación endotraqueal genera una respuesta inflamatoria en el pulmón, similar a la que se provoca cuando además de ésta, se administra subsecuentemente un inóculo endovenoso, para generar una RS. Es decir, la inoculación endovenosa posterior al inóculo endotraqueal, no contribuye a generar una mayor respuesta inflamatoria; por lo tanto, la capacidad de respuesta inflamatoria del pulmón es mayor por vía aerógena.

Se concluye que en el modelo propuesto para generar la RS en el pulmón, la inoculación endotraqueal tiene una participación mayor que la subsecuente inoculación endovenosa, en la generación del daño pulmonar.

Tabla 2.1

COMPARACION DE LOS VALORES: TOTAL DE CELULAS, MACROFAGOS, PMN,  
 PROTEINA Y DESHIDROGENASA LACTICA, OBTENIDOS DE LBA EN LOS  
 DIFERENTES GRUPOS

	Grupo 1	Grupo 2	
Total de Células	5,900 983.33 a 98.31	6,400 1,066.66 a 103.27	T M DE
Macrófagos	1,609 268.16 a 72.15	3,344 557.33 b 123.74	
PMN	4,195 699.16 a 168.42	2,956 492.66 b 126.62	
Proteína	4.60 1.53 a 0.95	2.19 0.73 a 0.41	
Deshidrogenasa Láctica	104 34.66 a 33.56	27 9 a 10.14	

T: Total, M: Media, DE: Desviación Estándar. Los valores han sido estimados por ml. Las literales iguales entre los grupos significan ausencia de diferencia, mientras que las literales distintas corresponden a diferencias significativas mediante la prueba "t" Student.

### Experimento 3

#### Efecto de la Inmunización Pasiva Sobre la Reacción de Shwartzman en el Pulmón del Conejo Empleando Lipopolisacárido de *Pasteurella haemolytica*

##### Resumen

La reacción local de Shwartzman (RS) puede inducirse en el pulmón de conejos, empleando el lipopolisacárido (LPS) de *Pasteurella haemolytica*. Se ha considerado que las lesiones provocadas por este fenómeno reflejan, en gran parte, aquellas que se reconocen en casos naturales de pasteurelisis neumónica (PN) en el ganado bovino y en ovinos. En este estudio se examinó la influencia de la inmunidad pasiva en el desarrollo de las lesiones pulmonares provocadas por la RS. Se emplearon dos grupos de conejos, el primer grupo recibió 4 ml de suero hiperinmune de conejo, preparado contra la cepa de *P. haemolytica* 82-25. El título de este suero contra el LPS de la bacteria fue de 1:2560, determinado por la prueba de hemoaglutinación pasiva. El segundo grupo no recibió suero hiperinmune, sino solución salina fisiológica (SSF). Veinticuatro horas después los grupos fueron subdivididos. La RS se provocó inoculando por vía endotraqueal 50 µg del LPS de la misma cepa de *P. haemolytica* y, 24 horas más tarde, administrando 100 µg del mismo compuesto por vía endovenosa; a estos inóculos se les denominó preparatorio y desencadenante, respectivamente. Este procedimiento se realizó tanto con animales inmunizados como no inmunizados. Además, se

incluyeron animales que recibieron solamente el inóculo preparatorio o el desencadenante. Todos los animales fueron sacrificados a las 36 h, lo que correspondió a 60 h posteriores a la inmunización pasiva o a la administración de SSF, según el caso. Secciones del pulmón derecho se emplearon para observar los cambios patológicos, mientras que el pulmón izquierdo se empleó para realizar lavados bronquioalveolares (LBA) y determinar el número total de células y su conteo diferencial, así como proteína y deshidrogenasa láctica. Las lesiones reconocidas en los pulmones de los animales con RS fueron similares en severidad a las que se registraron en los conejos que recibieron únicamente la inoculación endotraqueal del LPS. Los animales que recibieron la inmunización pasiva, presentaron una desproporción en las lesiones pulmonares; algunos mostraron lesiones discretas, pero en otros éstas fueron mucho más severas que en los animales que no recibieron inmunización. Por otra parte, se identificaron diferencias estadísticas entre los animales inmunizados y los no inmunizados, en lo que concierne a número total de células, conteos diferenciales de éstas y proteína, siendo los valores mayores para los conejos inmunizados. No se reconocieron diferencias en las determinaciones de deshidrogenasa láctica. Asimismo, pudo corroborarse que la respuesta inflamatoria por vía aerógena es más intensa que la endovenosa y, que por lo tanto, la inflamación pulmonar que se provoca en la RS, ocurre primordialmente por el inóculo endotraqueal. Inclusive, la respuesta inflamatoria inducida por la administración endotraqueal del LPS es la única que se potencializa cuando los animales han recibido la inmunización pasiva.

## Introducción

Existen opiniones encontradas con respecto a la influencia de la inmunización pasiva sobre el desarrollo de las manifestaciones patológicas que caracterizan al estado de endotoxemia; en algunos casos se ha demostrado un efecto inhibitorio, mientras que en otros, no se ha reconocido influencia alguna (11,23,24,47,95). Inclusive, recientemente, se ha intentado inhibir la acción patológica de los LPS, mediante anticuerpos dirigidos contra las citocinas mediadoras (34,47).

Los procedimientos de inmunización anteriormente referidos, también se han empleado para evaluar su acción sobre la RS, ya que ésta es considerada un buen indicador de los efectos patológicos de las endotoxinas (11,34,37,47). Recientemente, se ha propuesto que la RS inducida en el pulmón, presenta lesiones similares a las que ocurren naturalmente en la (PN) y, que por lo tanto, comparten mecanismos patológicos similares (59).

En un modelo de pasteurelosis en el ratón, se han referido efectos protectores cuando se administran pasivamente anticuerpos de bovino contra *P. haemolytica* (48). Con base en lo anterior, se ha realizado este experimento que tuvo como objetivo valorar el efecto de la inmunización pasiva sobre la respuesta inflamatoria generada por el LPS de *P. haemolytica*, en el pulmón de conejos mediante la RS.

## Material y Métodos

Animales. Se emplearon 30 conejos Nueva Zelanda, machos de 2.2 kg de peso al inicio del experimento. Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales con alimento comercial y agua *ad libitum*.

Serología. Previamente, se determinó en los conejos la presencia de anticuerpos contra el LPS de *P. haemolytica*, mediante una prueba de hemoaglutinación pasiva con eritrocitos de borrego adsorbidos con el LPS correspondiente (56).

Lipopolisacárido. Se extrajo el LPS de una cepa de *P. haemolytica* tipo A1 denominada 82-25. El procedimiento se realizó empleando una solución compuesta por fenol, cloroformo y éter de petróleo en proporción 2:5:8, respectivamente (32).

Antisuero. La cepa 82-25 de *P. haemolytica* A1 fue usada para preparar una vacuna. La bacteria fue cultivada durante toda una noche a 37°C en 10 placas de dextrosa almidón agar (Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI). El cultivo fue removido de las placas y suspendido en 50 ml de una solución salina 0.85% con 0.3% de formalina para mantenerse toda una noche a temperatura ambiente. Las células bacterianas muertas fueron sedimentadas por centrifugación a 7000 rpm por 5 min (5900 X g) (Sorvall Centrifuge, SS-34 rotor, DuPont, Wilmington, DE) y luego vueltas resuspender en una

solución salina con formalina similar a la anterior. Las células fueron lavadas una vez más y subsecuentemente, se ajustó su concentración a  $1.0 \times 10^{10}$  UFC/ml, empleando un espectrofotómetro calibrado a 600 nm (Coleman Model 35, Spectrophotometer, Bacharach Inc., Pittsburgh, PA).

Para preparar la vacuna se emplearon 16 ml de adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI) depositados en un tubo de 50 ml mantenido en agitación en hielo. Luego se añadieron 15 ml de solución salina con formalina y 1 ml de las células de *P. haemolytica* ( $1.0 \times 10^{10}$  UFC/ml) para emulsificarse por sonicación durante 1 min en hielo. La concentración final fue de  $3.1 \times 10^8$  UFC/ml de vacuna.

Se vacunaron dos conejos machos de 2.5 kg, empleando 3.2 ml del biológico, siguiendo el procedimiento recomendado en la literatura (2). Posteriormente, se obtuvo el suero de estos animales cuyo título contra el LPS de *P. haemolytica* cepa 82-25 fue de 1:2560, determinado mediante la prueba de hemoaglutinación pasiva (56).

Inmunización Pasiva. Se aplicaron 4 ml del suero hiperinmune por vía subcutánea a 15 conejos; los restantes recibieron SSF.

Inoculación del LPS. Veinticuatro horas después de que los animales recibieron suero hiperinmune o SSF, se establecieron 6 grupos. Tres de ellos correspondieron a los animales inmunizados pasivamente y los otros tres a los que no se inmunizaron. La RS se provocó inoculado por vía endotraqueal 50 µg del LPS de la misma cepa de *P. haemolytica* y 24 horas más tarde

administrando 100 $\mu$ g del mismo compuesto por vía endovenosa; a estos inóculos se les denominó preparatorios y desencadenantes, respectivamente. Este procedimiento se realizó tanto en animales inmunizados como no inmunizados. Además, se incluyeron animales que sólo recibieron el inóculo preparatorio o el desencadenante. Los procedimientos de la inoculación preparatoria y desencadenante se han descrito con anterioridad (experimento 1). En el cuadro 3.1 se presenta el diseño experimental correspondiente.

Necropsia y Recolección de las Muestras. Todos los animales fueron sacrificados a las 36 horas, lo que correspondió a 60 horas posteriores a la inmunización pasiva o la administración de SSF. Las particularidades del procedimiento ya han sido descritas, lo mismo que el manejo de las muestras para los procedimientos histológicos (experimento 1).

Lavados Bronquioalveolares. El procedimiento de los lavados bronquioalveolares (LBA) y el manejo de las muestras también se ha descrito con anterioridad (experimento 1).

Análisis Estadístico. Los resultados obtenidos de los LBA concernientes a total de células, macrófagos, PMN, linfocitos, monocitos, proteína y deshidrogenasa láctica fueron comparados entre los diferentes grupos, empleando el análisis de varianza a través de un diseño complemente al azar (72). Subsecuentemente, cuando se demostraron diferencias en los grupos, se realizó una comparación mediante contrastes (72), confrontando primero grupos inmunizados contra no inmunizados y luego, grupos que recibieron el LPS por diferentes vías, sin importar que fueran inmunizados o no.

Cuadro 3.1

## DISEÑO EXPERIMENTAL

	- 24 h Inmunización Pasiva*	0 h Inoculación Endotraqueal	24 h Inoculación Endovenosa	36 h Sacrificio
Grupo 1	no	LPS <i>P.h.</i> 50µg/1.5 ml SSF	1 ml SSF	si
Grupo 2	no	1.5 ml SSF	LPS <i>P.h.</i> 100 µg/1 ml SSF	si
Grupo 3	no	LPS <i>P.h.</i> 50 µg/1.5 ml SSF	LPS <i>P.h.</i> 100 µg/1 ml SSF	si
Grupo 1a	si	LPS <i>P.h.</i> 50µg/1.5 ml SSF	1 ml SSF	si
Grupo 2a	si	1.5 ml SSF	LPS <i>P.h.</i> 100 µg/1 ml SSF	si
Grupo 3a	si	LPS <i>P.h.</i> 50 µg/1.5 ml SSF	LPS <i>P.h.</i> 100µg/1 ml SSF	si

LPS *P. h.* = Lipopolisacárido de *Pasteurella haemolytica*

SSF = Solución Salina Fisiológica

\* La inmunización pasiva se realizó 24 horas antes de la inoculación endotraqueal. Se inoculó por vía subcutánea, 4 ml de suero hiperinmune con título 1.2560.

## Resultados

**Serología.** Mediante la prueba de hemoaglutinación pasiva se determinó que los animales de todos los grupos resultaron negativos al LPS de la cepa 82-25 de *P. haemolytica*.

Patología. Los conejos del grupo 1 que recibieron LPS de *P. haemolytica* por vía endotraqueal y luego 24 horas más tarde SSF por vía endovenosa, presentaron cambios macroscópicos en sus pulmones, caracterizados por falta de colapso, pequeñas áreas de consolidación rojogrisáceo y hemorragias. Cambios similares a los anteriores se apreciaron en los animales del grupo 1a, quienes recibieron el LPS por las mismas vías, pero 24 horas antes fueron inmunizados pasivamente. No obstante, vale señalar que algunos de estos animales presentaron lesiones hemorrágicas más intensas en sus pulmones (figura 1).

Microscópicamente se apreció, tanto en los animales del grupo 1 como del grupo 1a, congestión en septos alveolares con infiltración de numerosos PMN. En la mayoría de los bronquiolos y alveolos se observó un edema rico en proteína acompañado de numerosos PMN. En las zonas de consolidación se observó necrosis, hemorragias y un exudado serofibrinoso, también con numerosos PMN (figuras 3.1 y 3.2).

En los pulmones de los animales del grupo 2 que recibieron SSF por vía endotraqueal y posteriormente LPS por vía endovenosa, se apreció, macroscópicamente, congestión y falta de colapso. Microscópicamente se observó edema intersticial, y en algunas áreas, alveolar. Los PMN se encontraron infiltrando los septos y sólo ocasionalmente la luz alveolar. Estos cambios fueron similares para el grupo 2a (figuras 3.3 y 3.4).

Los animales de los grupos 3 y 3a que recibieron el LPS, primero por vía endotraqueal y luego endovenosa, presentaron lesiones macroscópicas y

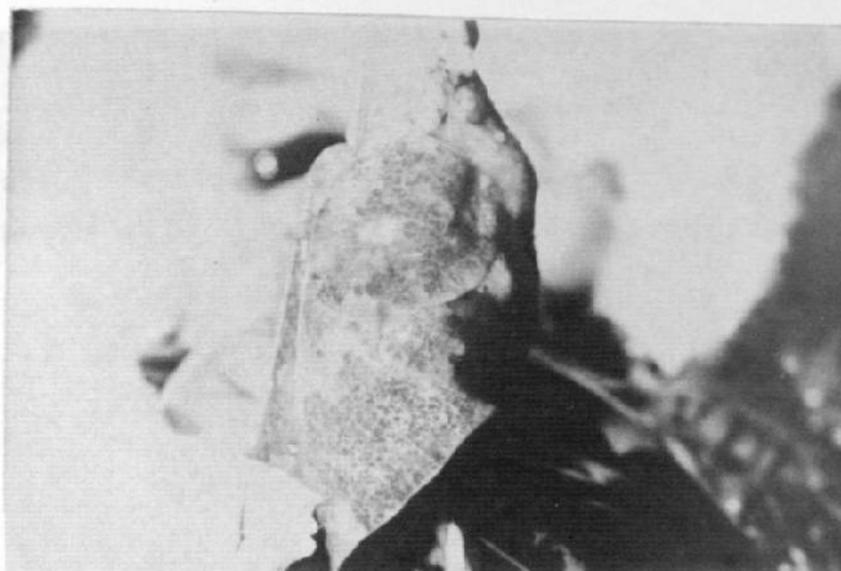


Figura 3.1 Pulmones que se muestran turgentes con hemorragias y áreas de consolidación. Conejo perteneciente al grupo 1a. 100 X.

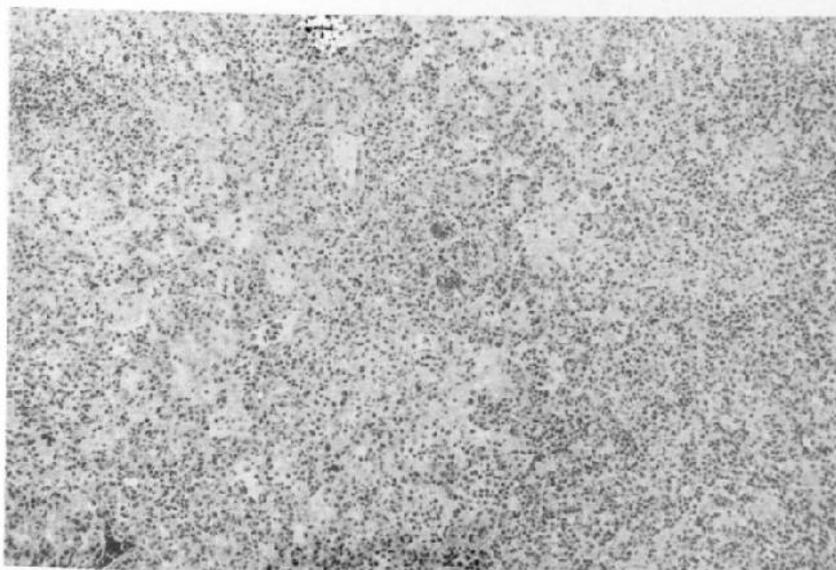


Figura 3.2 Se observa una área consolidada con abundante exudado serofibrinoso y numerosos PMN infiltrando. Conejo perteneciente al grupo 1a. 60 X.

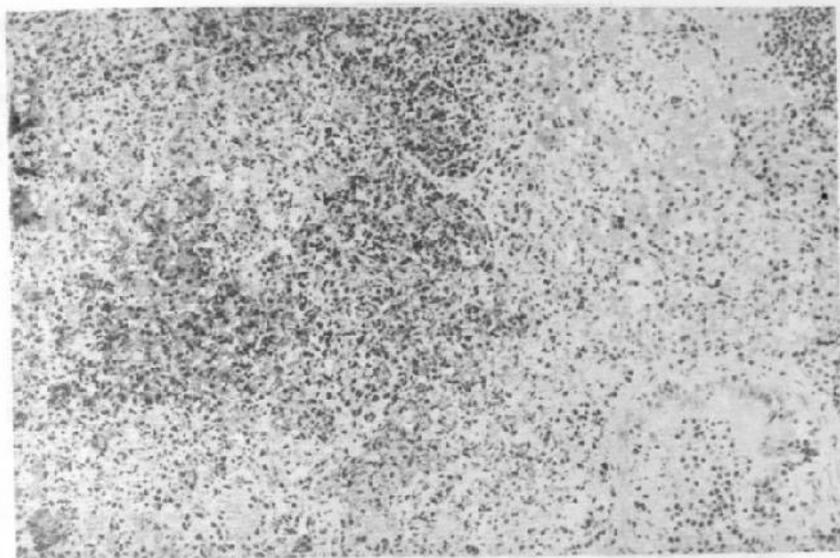


Figura 3.3 Se muestra una área de consolidación con necrosis y exudado serofibrinoso. Conejo perteneciente al grupo 1a. 100 X.

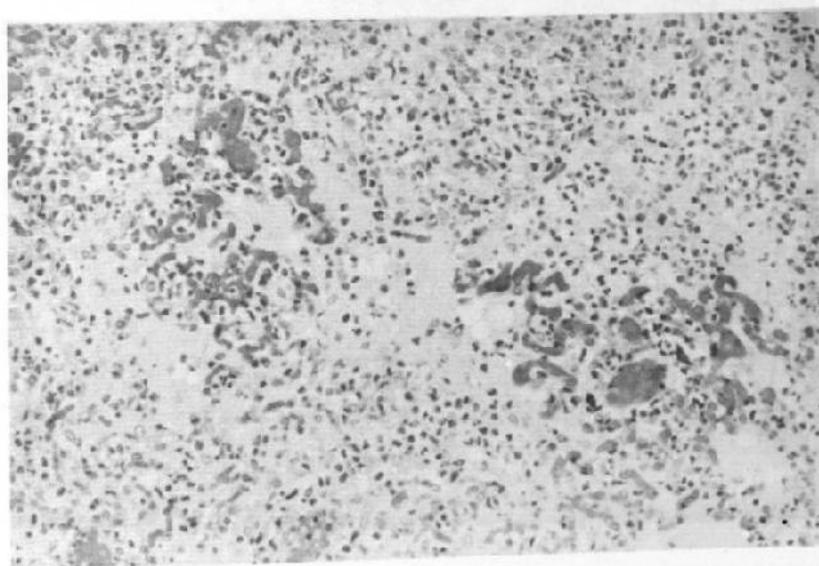


Figura 3.4 Se observa una área con abundante edema alveolar. Conejo perteneciente al grupo 2a. 100 X.

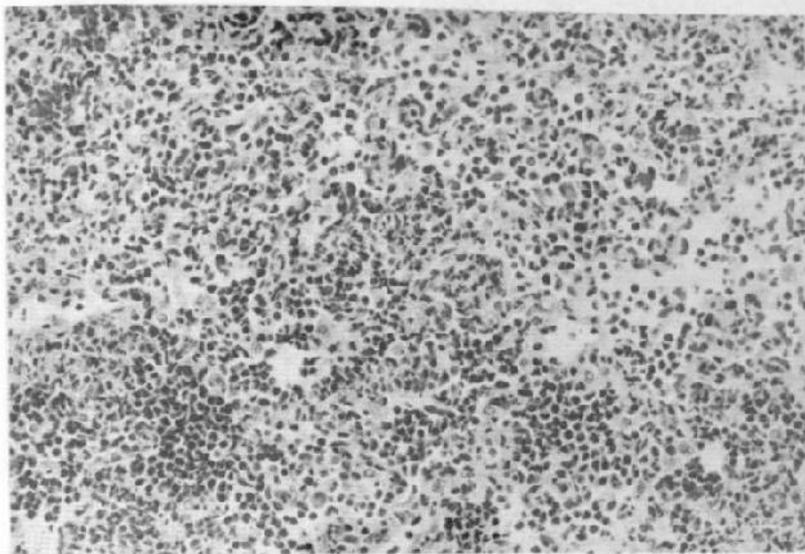


Figura 3.5 Se presenta una área parcialmente consolidada con abundantes PMN infiltrando septos alveolares y también exudado en la luz alveolar. Conejo perteneciente al grupo 2a. 160 X.



Figura 3.6 Se observa una área con intensa infiltración de PMN y abundante exudado serofibrinoso. Conejo perteneciente al grupo 3a. 100 X.

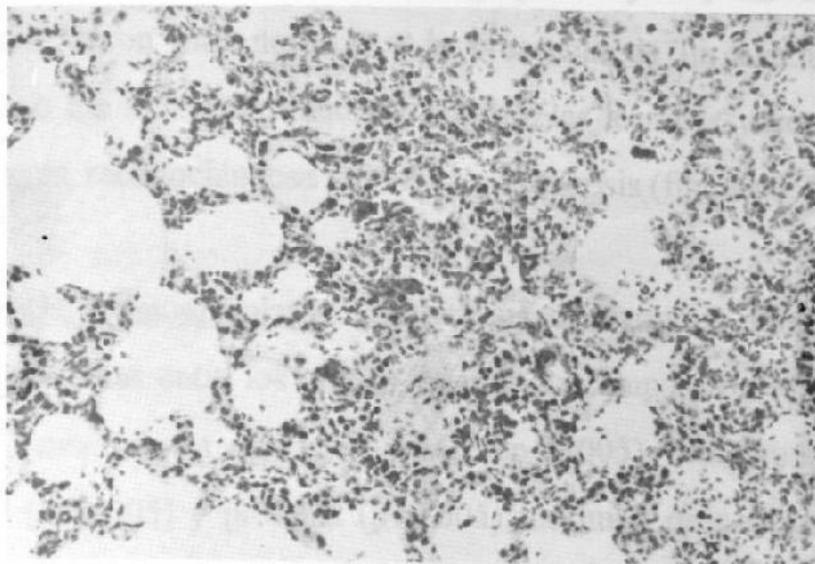


Figura 3.7 Se presenta una área parcialmente consolidada con abundante exudado serofibrinoso y obliteración de capilares. Conejo perteneciente al grupo 3 a. 160 X.

microscópicas similares a las de los grupos 1 y 1a; sin embargo, las hemorragias fueron más notorias y la presencia de un exudado alveolar serofibrinoso fue más consistente. Asimismo, las lesiones vasculares fueron más evidentes, reconociéndose vasculitis y trombosis (figuras 3.5 y 3.6).

Lavados Bronquioalveolares. Los análisis de varianza demostraron que existían diferencias entre los grupos, cuando se compararon total de células ( $p < 0.005$ ), macrófagos ( $p < 0.05$ ), PMN ( $p < 0.005$ ), linfocitos ( $p < 0.005$ ), monocitos ( $p < 0.005$ ) y proteína ( $p < 0.005$ ); no hubo diferencias cuando se comparó deshidrogenasa láctica ( $p > 0.1$ ). A partir de lo anterior se buscó el origen de estas diferencias mediante contrastes, lo que demostró que la inmunización contribuyó a generar las diferencias, salvo en el caso de los PMN y la proteína. Estas diferencias se debieron a que la cantidad de células recuperadas de los lavados fue mayor en los conejos inmunizados. En el caso de los PMN y la proteína, las diferencias se originaron de la ruta de administración del LPS, resultando que la ruta endotraqueal es más flogística que las otras. De hecho, se demostró, tanto en animales inmunizados como no inmunizados, que la ruta endotraqueal es más flogística, y que cuando los animales han sido previamente inmunizados aún puede apreciarse una respuesta mayor. En la tabla 3.1 se resumen estos datos, mientras que en el apéndice A se presentan todos los procedimientos estadísticos.

Tabla 3.1

COMPARACION DE LOS VALORES: TOTAL DE CELULAS, MACROFAGOS, PMN, LINFOCITOS, MONOCITOS, PROTEINA Y DESHIDROGENASA LACTICA, OBTENIDOS DE LBA EN LOS DIFERENTES GRUPOS

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1a	Grupo 2a	Grupo 3a	
	1235*	124	134	1235	124	134	
Total de Células	9,700acei*	5,600adg	7,000afg	15,300bcej	7,600bdg	7,500bfg	T
	970	560	700	1,530	760	750	M
	533.43	96.60	402.76	794.49	271.62	84.98	DE
Macrófagos	5,136acei	4,072acg	4,730aeg	7,054bcei	6,538bcg	5,936beg	
	513.60	407.20	473.00	705.40	653.80	593.60	
	256.96	163.17	218.82	220.30	229.56	74.60	
PMN	4,103acei	1,237adg	1,996afg	6,888acej	713adg	1,273afg	
	410.30	123.70	199.60	688.80	71.30	127.30	
	296.17	138.80	173.49	561.92	38.78	49.72	
Linfocitos	172acei	92adg	77afg	445bcej	125bdg	105bfg	
	17.20	9.20	7.70	44.50	12.50	10.50	
	14.71	5.45	6.23	31.02	35.61	6.41	
Monocitos	348acei	219adg	233afg	1,068bcej	311bdg	223bfg	
	34.80	21.90	23.30	106.80	31.10	22.30	
	17.71	8.41	14.84	86.98	26.54	12.22	
Proteína	3.10acei	3.21acg	2.16afg	9.40acej	5.20acg	1.97afg	
	0.62	0.64	0.43	1.88	1.04	0.39	
	0.42	0.84	0.26	0.88	0.79	0.41	
Deshidrogenasa	48**	70	115	359	89	123	
Láctica	9.60	14.00	23.00	71.80	17.80	24.60	
	13.60	24.68	25.32	43.21	17.52	37.75	

T: Total; M: Media; DE: Desviación Estándar. Los valores han sido estimados por ml.

\* Los números están relacionados con las literales y representan los contrastes y las significancias, respectivamente; así, en el contraste 1 se comparan los grupos 1, 2 y 3 Vs. 1a, 2a y 3a, en el 2 los grupos 1 y 1a Vs. 2 y 2a, en el 3 los grupos 1 y 1a Vs. 3 y 3a, en el 4 los grupos 2 y 2a Vs. 3 y 3a y en el 5 el grupo 1 Vs. 1a. Por consiguiente, las literales a y b, c y d, e y f, g y h e i y j, representan las comparaciones de los contrastes respectivos. Las literales iguales entre los grupos significan ausencia de diferencia, mientras que las literales distintas corresponden a diferencia significativa. En este caso, se emplearon los valores totales para realizar los contrastes.

\*\* No se realizaron contrastes en el caso de deshidrogenasa láctica, porque no se reconocieron diferencias significativas entre los grupos a partir del análisis de varianza.

## Discusión

En el presente experimento la administración del suero hiperinmune no redujo la intensidad de las lesiones ni tampoco la afluencia de células inflamatorias en los alveolos, conforme a las observaciones de histopatología y las células recuperadas de los lavados bronquioalveolares, respectivamente. Esta apreciación concuerda con otras investigaciones en donde se refiere que la inmunización pasiva no disminuye los efectos patológicos de las endotoxinas (23,47,95). También concuerda con un estudio en ovinos, en el que se demostró que la inmunización pasiva no reduce los efectos patológicos de un desafío por aerosol con *P. haemolytica* (86).

Con base en lo anterior, puede afirmarse que los anticuerpos producidos mediante procedimientos de inmunización rutinarios, utilizando bacterinas convencionales de *P. haemolytica*, no ofrecen protección cuando se utilizan para proveer de un estado de inmunidad pasiva contra las neumonías por *P. haemolytica*. Por el contrario, la respuesta inflamatoria y el daño pulmonar fueron más intensos en los animales que recibieron el suero hiperinmune. Esto también concuerda con los informes que refieren una respuesta desfavorable en bovinos inmunizados con bacterinas convencionales contra *P. haemolytica* (25,50). En el siguiente experimento se explorará esta posibilidad empleando también al conejo como modelo.

Por otra parte, las lesiones que aquí se produjeron son compatibles con las referidas en los experimentos 1 y 2, y también a las descritas en modelos de inflamación pulmonar mediados por complejos inmunes (54,97). La razón de estas semejanzas en las lesiones pulmonares, a pesar de las diferencias en la patogenia del daño pulmonar, quizá radique en que la respuesta inflamatoria en el pulmón, al igual que en otros tejidos, es estereotipada y no permite vislumbrar diferencias a partir del cuadro inflamatorio agudo (59).

## Experimento 4

### Inducción de la Reacción de Arthus en el Pulmón del Conejo Empleando Lipopolisacárido de *Pasteurella haemolytica*

#### Resumen

Se ha propuesto que un fenómeno de hipersensibilidad compatible con una reacción de Arthus (RA) puede participar en los mecanismos patológicos de la severa bronconeumonía fibrinopurulenta que caracteriza a la pasteurelosis del ganado (PN). Por otra parte, se ha referido que el lipopolisacárido (LPS) de esta bacteria es quien contribuye mayormente en el desarrollo del daño pulmonar. Con base en lo anterior, se realizó el presente experimento que tuvo como objetivo provocar en el pulmón del conejo, una respuesta inflamatoria a través de un fenómeno hipersensible compatible con la RA, empleando el LPS de *Pasteurella haemolytica*. El procedimiento consistió en inmunizar a un grupo de conejos con una bacterina de *P. haemolytica*, acompañada de adyuvante incompleto de Freund; también se incluyeron animales que se inmunizaron con albúmina de bovino y otros dos grupos que solo recibieron el adyuvante. Se constató mediante pruebas de hemoaglutinación pasiva y precipitación en agar que los animales inmunizados reaccionaban positivamente; hasta entonces, se procedió a desafiar a todos los animales por vía endotraqueal. Fueron desafiados con el LPS de *P. haemolytica* tanto un grupo que había sido inmunizado con la

bacterina como otro que recibió solamente el adyuvante; el grupo que fue inmunizado con albúmina fue desafiado con este antígeno y, finalmente, un grupo que solamente había recibido el adyuvante fue desafiado con solución salina fisiológica (SSF). Los animales se sacrificaron a las 12 h posteriores al desafío. Sus pulmones, derecho e izquierdo, fueron empleados para realizar patología y lavados bronquioalveolares (LBA), respectivamente. Los estudios de patología demostraron que la respuesta inflamatoria más intensa ocurrió en los animales que fueron desafiados con el LPS de *P. haemolytica*. Los análisis estadísticos realizados con las células recobradas mediante LBA, confirmaron los hallazgos patológicos; sin embargo, lograron además demostrar que los animales que habían sido inmunizados con la bacterina tuvieron la respuesta flogística más importante. Con base en estos resultados, se afirma que la respuesta inmune inducida por la bacterina contribuye a generar una respuesta inflamatoria más intensa ante un desafío endotraqueal con el LPS de la bacteria.

### Introducción

La severa neumonía fibrinopurulenta asociada a la infección por *P. haemolytica* es una de las enfermedades que más pérdidas causa en la ganadería de Norteamérica. Buscando disminuir estas pérdidas se han desarrollado diversos inmunógenos, tales como bacterinas, vacunas vivas o químicamente modificadas, biológicos preparados con sobrenadantes de cultivos o con subunidades, así como también vacunas recombinantes; sin embargo, tanto en condiciones experimentales como en estudios de campo, la eficacia de estos biológicos ha sido inconsistente (9,25,50,51).

En terminos generales, la respuesta inmune contra *P. haemolytica*, inducida por bacterinas tradicionales de células completas es contraproducente (25,50). Se ha propuesto que esta condición puede reflejar un fenómeno de hipersensibilidad compatible con la RS (58). Al respecto, se han reconocido depósitos de complejos inmunes en casos de PN (42).

Recientemente, se ha referido un modelo de daño pulmonar en el conejo, empleando LPS de *P. haemolytica* para provocar una reacción de Shwartzman (experimento 1). Las características de las lesiones reflejan, al menos en parte, las lesiones que se presentan naturalmente en los casos de PN del ganado (experimento 1). Posteriormente, se ha demostrado que en este modelo, la respuesta inflamatoria derivada de la administración del LPS por vía aerógena, contribuye preponderantemente en la generación del daño pulmonar (experimentos 1 y 2). Además, cuando se administra suero hiperinmune contra *P. haemolytica* previo al desafío endotraqueal con el LPS de la bacteria, la respuesta inflamatoria es aún más grave (experimento 3). Con la influencia de estos antecedentes, se ha desarrollado el presente experimento que tuvo como objetivo inducir un daño en el pulmón del conejo compatible con la RA, empleando LPS de *P. haemolytica*.

### Material y Métodos

Animales. Se emplearon 32 conejos Nueva Zelanda con un peso aproximado de 2 kg al inicio del experimento. Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales y se les administró agua y alimento comercial

*ad libitum*. Los animales se distribuyeron en 4 grupos de 8 animales cada uno, como se verá más adelante.

Lipopolisacárido. Se extrajo el LPS de una cepa de *P. haemolytica* tipo A1, denominada 82-25. El procedimiento se realizó empleando una solución compuesta por fenol, cloroformo y éter de petróleo en proporción 2:5:8, respectivamente (32). Este LPS fue similar al empleado en los experimentos 1, 2 y 3.

Preparación de la Bacterina. La cepa 82-25 de *P. haemolytica* A1 se empleó para preparar la bacterina. El procedimiento ha sido descrito previamente en el experimento 3.

Preparación de los Inmunógenos. Se prepararon tres inmunógenos, todos incluyendo adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI). El primero se preparó empleando 16 ml del adyuvante mezclado con 16 ml de solución salina 0.85% con 0.3% de formalina. El segundo inmunógeno se preparó empleando 16 ml del adyuvante y 16 ml de solución salina 0.85% conteniendo 0.3% de formalina y 50 mg de albumina sérica de bovino (RIA Grade, Fraction V, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El tercer inmunógeno se preparó empleando 16 ml del adyuvante y 15 ml de solución salina 0.85% conteniendo 0.3% de formalina y 1 ml de *P. haemolytica* ( $1.0 \times 10^{10}$  UFC/ml); la concentración final de este inmunógeno fue  $3.1 \times 10^8$  UFC/ml. Todas las mezclas descritas fueron emulsificadas por sonificación durante 1 min en hielo.

Procedimiento de Inmunización. Los animales se inmunizaron siguiendo un protocolo para obtener sueros hiperinmunes descrito previamente (2). Cada animal recibió 6.4 ml del inmunógeno; en los grupos correspondientes se administraron 10 mg de albumina o  $2.0 \times 10^9$  UFC por animal. En el cuadro 4.1 se presenta el diseño experimental.

Serología. Se realizaron dos estudios serológicos, el primero correspondió a las muestras que se colectaron justo durante la segunda inmunización y el segundo se realizó antes del desafío a los 30 días. Para los grupos 2 y 4 se utilizó la prueba de hemoaglutinación pasiva empleando eritrocitos de ovino adsorbidos con el LPS de *P. haemolytica* (56), tal y como se realizó en los experimentos anteriores. Por otra parte, a los animales del grupo 3 se les practicó una prueba de precipitación en gel de agar (15).

Desafío. Todos los animales fueron desafiados por la ruta endotraqueal recibiendo 1.5 ml de inóculo; el grupo 1 recibió SSF solamente; el Grupo 2 recibió 50  $\mu$ g del LPS de *P. haemolytica*; los animales del grupo 3 fueron desafiados con 50  $\mu$ g de albúmina sérica de bovino y, por último, el grupo 4 recibió también 50  $\mu$ g del LPS. El procedimiento de inoculación ha sido descrito previamente en los experimentos anteriores. Vale señalar, además, que los animales recibieron una inoculación intradérmica de albúmina (grupo 3) o LPS (grupo 4) con la intención de provocar una RA como indicador. Estos inóculos correspondieron a 100  $\mu$ g del LPS o de albúmina, contenidos en 0.1 ml de SSF.

Necropsia y Recolección de las Muestras. Todos los animales fueron sacrificados a las 12 h posteriores al desafío endotraqueal. Las particularidades del procedimiento ya han sido descritas, lo mismo que el manejo de las muestras para los procesos histológicos (experimento 1).

Lavados Bronquioalveolares. El procedimiento de los LBA y el manejo de las muestras, también se han descrito con anterioridad (experimento 1), con la excepción de que no se realizaron determinaciones de proteína ni de deshidrogenasa láctica.

Análisis Estadístico. Los resultados obtenidos de los LBA concernientes a total de células, macrófagos, PMN, linfocitos y monocitos, fueron comparados entre los diferentes grupos, empleando el análisis de varianza a través de un diseño completamente al azar (72). Subsecuentemente, cuando se demostraron diferencias entre los grupos se procedió a comparar las medias mediante la prueba de Scheffé (72).

Cuadro 4.1

## DISEÑO EXPERIMENTAL

	Día 0 Primera Inmunización**	Día 15 Segunda* Inmunización**	Día 30 Desafío* Endotraqueal	Día 30 Sacrificio
Grupo 1	Salina	Salina	SSF	si
Grupo 2	Salina	Salina	LPS	si
Grupo 3	Albúmina	Albúmina	Albúmina***	si
Grupo 4	LPS	LPS	LPS***	si

\* Durante la segunda inmunización y previo al desafío, se tomaron muestras de sangre para realizar estudios serológicos. En los grupos 2 y 4 se realizó hemoaglutinación pasiva contra el LPS *P. haemolytica* y en el grupo 3 precipitación en gel de agar.

\*\* Se administraron 3.2 ml del inmunógeno en cada inmunización.

\*\*\* Justo al tiempo de desafío los animales de estos grupos recibieron una inoculación intradérmica de LPS o albúmina según correspondía, para provocar una RA.