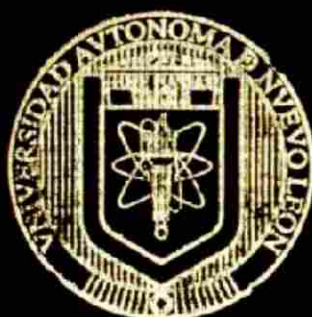


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA



EL CONEJO COMO MODELO PARA EL ESTUDIO
DEL DAÑO PULMONAR GENERADO POR EL
LIPOPOLISACARIDO DE
Pasteurella haemolytica **MEDIANTE LA REACCION DE**
SHWARTZMAN Y EL FENOMENO DE ARTHUS

Por

RAFAEL RAMIREZ ROMERO

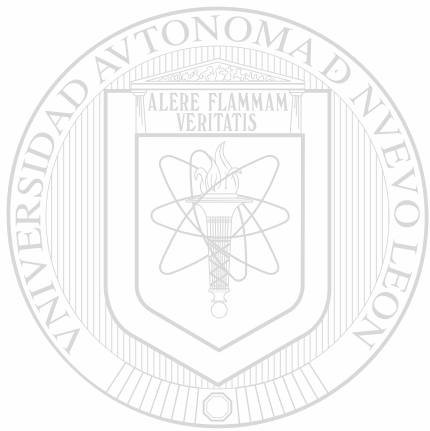
Médico Veterinario Zootecnista
Universidad Autónoma de Tamaulipas
Cd. Victoria, Tam.
1976

MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS

con Especialidad en Patología Animal
Universidad Nacional Autónoma de México
1986

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA VETERINARIA

Marzo, 1995



UNANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

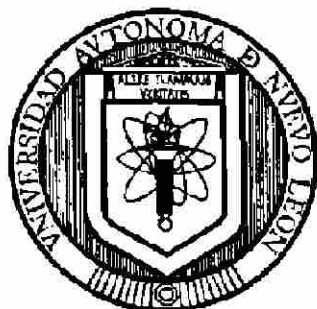
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
SF964
R3
c.1



1080073227

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EL CONEJO COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DAÑO
PULMONAR GENERADO POR EL LIPOPOLISACARIDO DE
Pasteurella haemolytica MEDIANTE LA REACCION DE
SHWARTZMAN Y EL FENOMENO DE ARTHUS

Por

RAFAEL RAMIREZ ROMERO
Médico Veterinario Zootecnista

Universidad Autónoma de Tamaulipas

Cd. Victoria Tam.

1976

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS

con Especialidad en Patología Animal

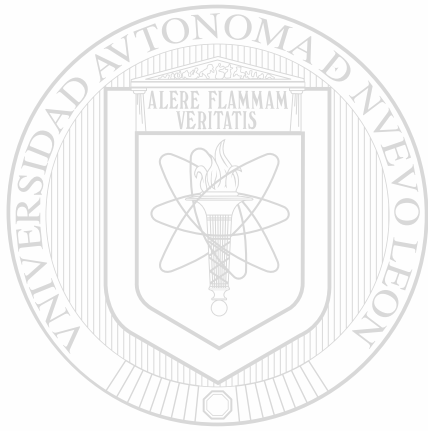
Universidad Nacional Autónoma de México

1986

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA VETERINARIA

Marzo, 1995

S 964



UANL

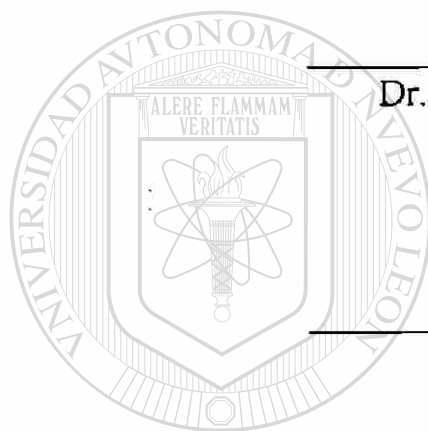
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EL CONEJO COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DAÑO
PULMONAR GENERADO POR EL LIPOPOLISACARIDO DE
Pasteurella haemolytica MEDIANTE LA REACCION DE
SIIWARTZMAN Y EL FENOMENO DE ARTHUS

Aprobación de la tesis:



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Manuel Rodríguez Quintanilla".

Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla
Asesor

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Kim A. Brogden".

Kim A. Brogden Ph.D.
Asesor Externo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Daniel K. Miller".

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Daniel K. Miller Ph.D.
Coasesor

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Julio Sepúlveda Saavedra".

Dr. Julio Sepúlveda Saavedra
Coasesor

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a mi asesor, Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla y coasesores, Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y Dr. Daniel K. Miller, por su apoyo y orientación en el desarrollo de este trabajo.

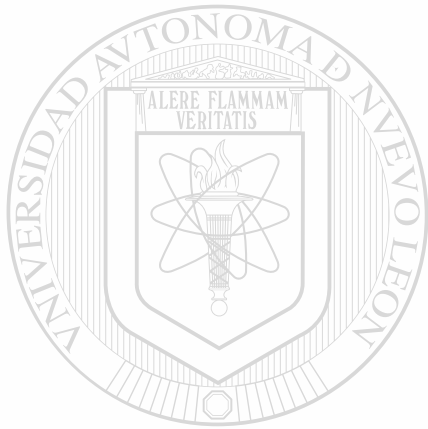
Asimismo, agradezco al Dr. Kim A. Brogden, asesor externo, por brindarme toda su ayuda, comprensión y motivación, durante la realización de los experimentos que conforman este estudio y además, por sus comentarios y sugerencias sobre la organización y presentación del escrito.

Agradezco también al Dr. Randall Cutlip, Jefe de la Respiratory Disease Research Unit, del National Animal Disease Center, United States Department of Agriculture, en Ames, Iowa, por aceptarme como investigador visitante y apoyarme siempre en la realización de mi investigación.

Deseo también manifestar mi agradecimiento a la Secretaría de Educación Pública por el apoyo financiero que me permitió realizar los ensayos preliminares de este trabajo, mediante los convenios 87-08-0199-38803 y 90-07-0201-901592 y quien también me sostuvo durante mi estancia en el National Animal Disease Center, USDA, en Ames, Iowa, mediante el apoyo: 91-06-017.

Mi reconocimiento a la Lic. María Dolores Hernández Rodríguez por su invaluable ayuda en la corrección de estilo de este documento; asimismo, a las Sritas. Norma Leticia Román Rodríguez y Maribel Robledo Cubillos, quienes realizaron el trabajo de mecanografía. Igualmente, agradezco al Dr. José Antonio Salinas Meléndez por sus valiosas sugerencias.

Finalmente, mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Nuevo León, por haber apoyado siempre mi superación profesional.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

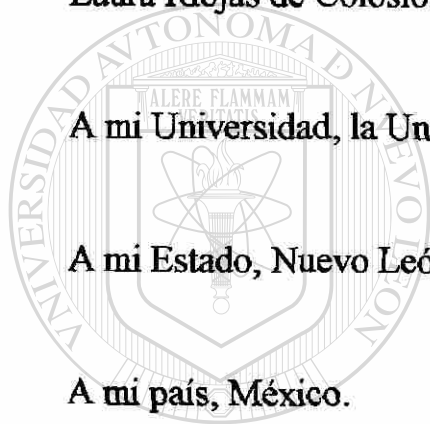
A mi esposa, María Dolores y mi hija, Cecilia.

**A la memoria de Luis Donaldo Colosio Murrieta y de su esposa Diana
Laura Riojas de Colosio.**

A mi Universidad, la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A mi Estado, Nuevo León.

A mi país, México.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

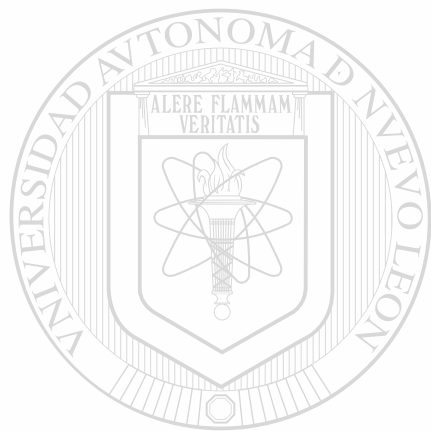


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
I.	Introducción	1
II.	Revisión de la Literatura	4
	La Leucotoxina	5
	La Endotoxina	7
III.	Plan de Trabajo	17
IV.	Trabajo Experimental	19
	Experimento 1	
	Inducción de la Reacción de Shwartzman en el Pulmón del Conejo Empleando Lipopolisacárido de <i>Pasteurella haemolytica</i>	19
	Experimento 2	
	Contribución Mayor del Inóculo por Vía Respiratoria en el Desarrollo de la Reacción de Shwartzman en el Pulmón del Conejo	48
	Experimento 3	
	Efecto de la Inmunización Pasiva Sobre la Reacción de Shwartzman en el Pulmón del Conejo Empleando Lipopolisacárido de <i>Pasteurella haemolytica</i>	53
	Experimento 4	
	Inducción de la Reacción de Arthus en el Pulmón del Conejo Empleando Lipopolisacárido de <i>Pasteurella haemolytica</i>	69
V.	Discusión	87

Capítulo	Página
VI Conclusiones	91
Literatura Citada	92
Apéndice A	
Procedimientos Estadísticos	104
Apéndice B	
El Complejo Respiratorio de los Bovinos	126



UANL

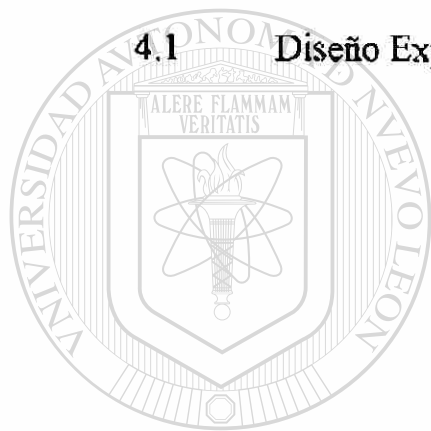
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.1	Diseño Experimental	28
2.1	Diseño Experimental	50
3.1	Diseño Experimental	59
4.1	Diseño Experimental	75



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.1 Comparación de los valores: Total de células, macrófagos, PMN, linfocitos, monocitos, proteína y deshidrogenasa láctica, obtenidos de LBA en los diferentes grupos	42
2.1 Comparación de los valores: Total de células, macrófagos, PMN, proteína y deshidrogenasa láctica, obtenidos de LBA en los diferentes grupos	52
3.1 Comparación de los valores: Total de células, macrófagos, PMN, linfocitos, monocitos, proteína y deshidrogenasa láctica, obtenidos de LBA en los diferentes grupos	66
4.1 Comparación de los valores: Total de células, macrófagos, PMN, linfocitos y monocitos, obtenidos de LBA en los diferentes grupos	83

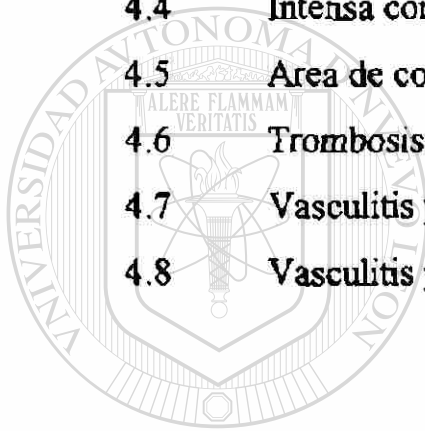
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Pulmones sin cambios macroscópicos	30
1.2	Arquitectura normal en alvéolos	30
1.3	Pulmones con áreas hemorrágicas	31
1.4	Extensa consolidación y exudado en bronquiolos	31
1.5	Extensa consolidación y abundante infiltración de PMN	33
1.6	Abundante infiltración de PMN en dermis	33
1.7	Pulmones turgentes y congestionados	34
1.8	Engrosamiento y celularidad en septos alveolares	34
1.9	Reacción de Shwartzman típica	35
1.10	Intensa hemorragia en dermis	35
<hr/>		
1.11	Trombosis y hemorragia en dermis	36
1.12	Pulmones turgentes y con áreas de consolidación	36
1.13	Exudado serofibrinoso en alveolos	38
1.14	Presencia de fibrina en una área de consolidación	38
1.15	Trombosis en una arteria	39
1.16	Reacción de Shwartzman típica	39
1.17	Trombosis en pequeñas venas de la dermis	40
3.1	Pulmones turgentes con hemorragias y consolidación	61
3.2	Area consolidada con abundante exudado serofibrinoso	61
3.3	Area de consolidación con necrosis	62

Figura		Página
3.4	Abundante edema alveolar	62
3.5	Area parcialmente consolidada	63
3.6	Area con intensa infiltración de PMN	63
3.7	Area parcialmente consolidada	64
4.1	Arquitectura alveolar normal	77
4.2	Pulmones turgentes y congestionados	77
4.3	Pulmones turgentes y congestionados	78
4.4	Intensa consolidación con zonas de necrosis	78
4.5	Area de consolidación y necrosis	79
4.6	Trombosis de una arteria	79
4.7	Vasculitis y trombosis en dermis	80
4.8	Vasculitis y trombosis en dermis	80



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

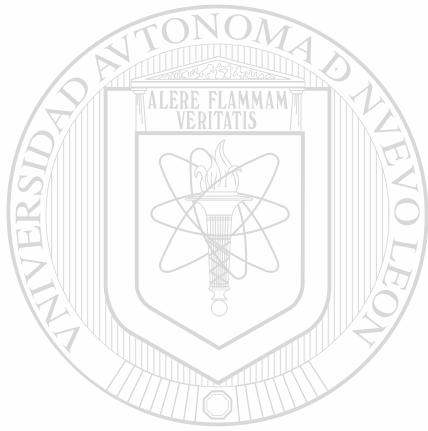
Existe una gran cantidad de información acerca de los mecanismos patológicos que intervienen en el desarrollo del daño pulmonar causado por *P. haemolytica*; sin embargo, quedan aún muchas dudas por resolver. Recientemente, el interés de los investigadores se ha dirigido hacia el estudio de los efectos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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 lisarla, 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 Ca²⁺, 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 blancas, 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 A₂ 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 PGI₂, prostaglandina E₂, PGE₂), 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 microscopia 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 (PGI₂) (6,46,62).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 (TXA₂), 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- δ) 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

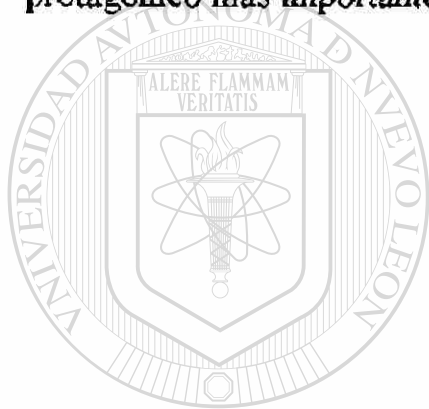
otra parte, como ya se ha señalado, las superficies endoteliales son influidas en favor de una acción procoagulante por efecto de los LPS a través de la acción de citocinas (IL-1, TNF) (46,55,62,91).

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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO III

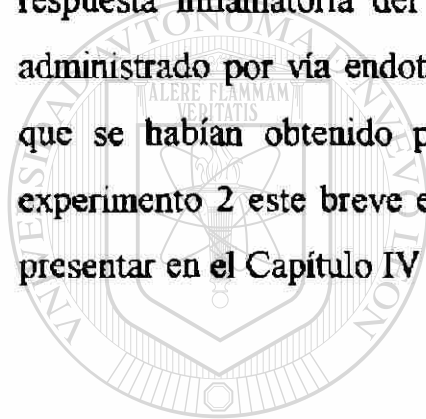
PLAN DE TRABAJO

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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 patogenicia 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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 dehidrogenasa 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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®



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

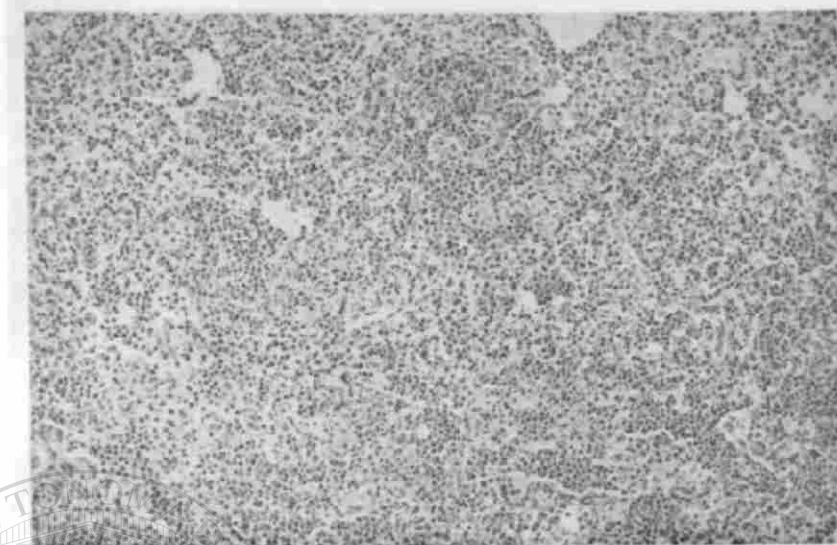
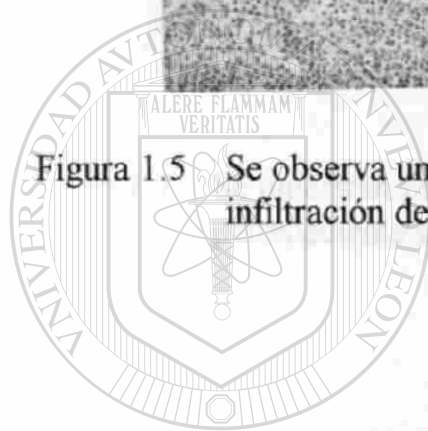


Figura 1.5 Se observa una área de extensa consolidación y abundante infiltración de PMN. Conejo perteneciente al grupo 3. 100 X.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®



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

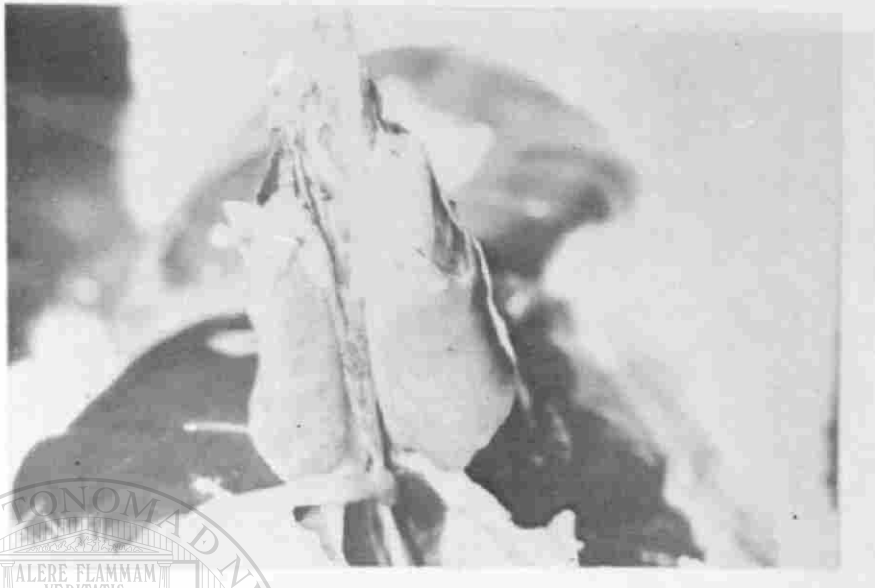
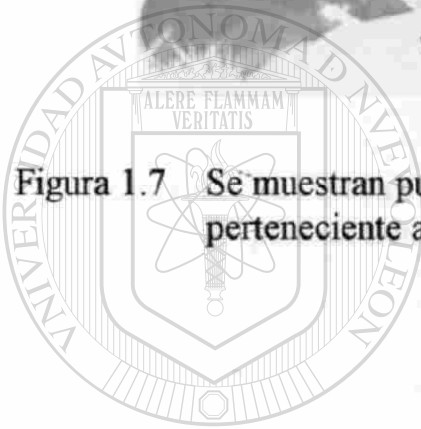


Figura 1.7 Se muestran pulmones turgentes y congestionados. Conejo perteneciente al grupo 4.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

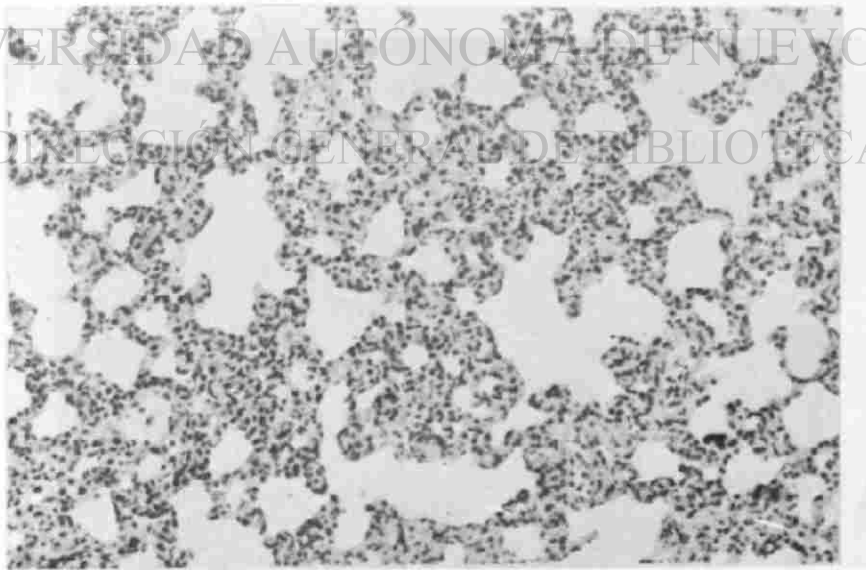
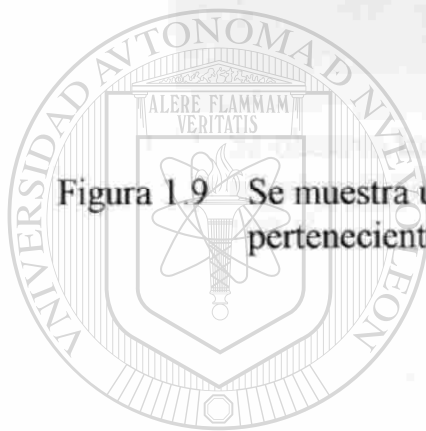


Figura 1.8 Se observa una área con engrosamiento y celularidad de los septos alveolares. Conejo incluido en el grupo 4. 160 X.



Figura 1.9 Se muestra una reacción de Shwartzman típica. Conejo perteneciente al grupo 4.



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

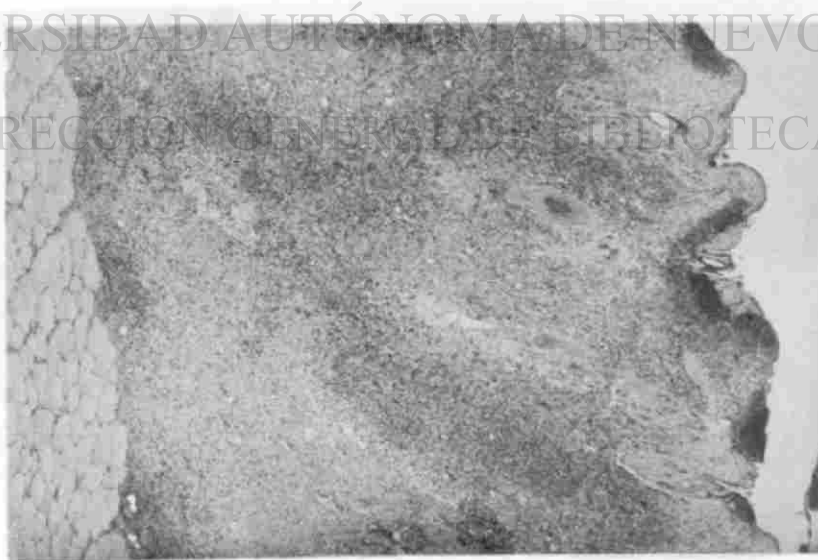
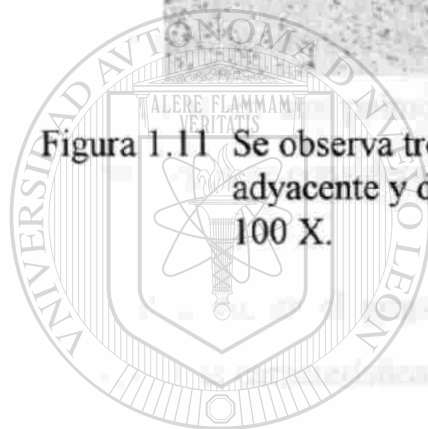


Figura 1.10 Se observa una área con intensa hemorragia que involucra dermis. Conejo perteneciente al grupo 4. 40 X.



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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

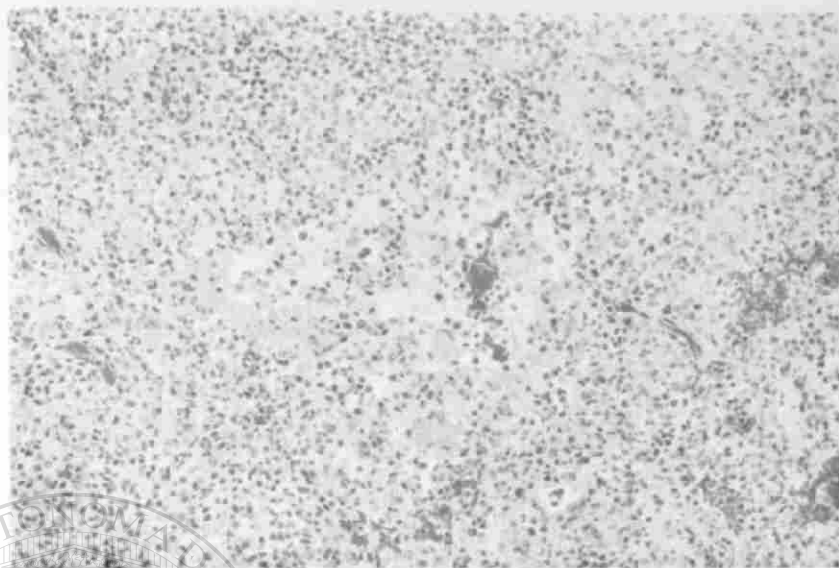
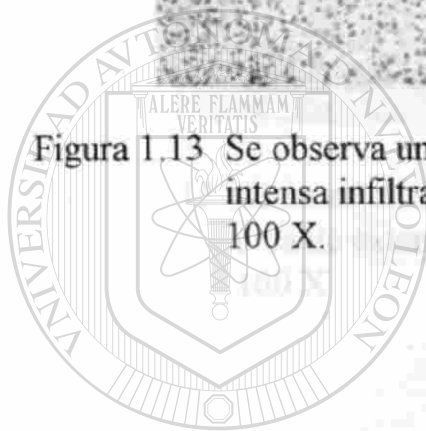


Figura 1.13 Se observa una área con exudado serofibrinoso en alveolos e intensa infiltración de PMN. Conejo perteneciente al grupo 5. 100 X.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

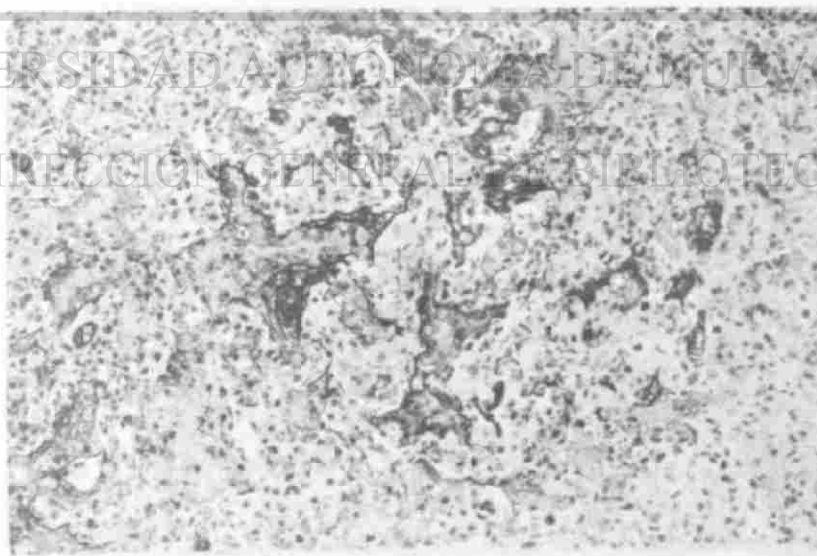


Figura 1.14 Se observa positividad a la presencia de fibrina en una área de consolidación y necrosis. Conejo perteneciente al grupo 5. 160 X.

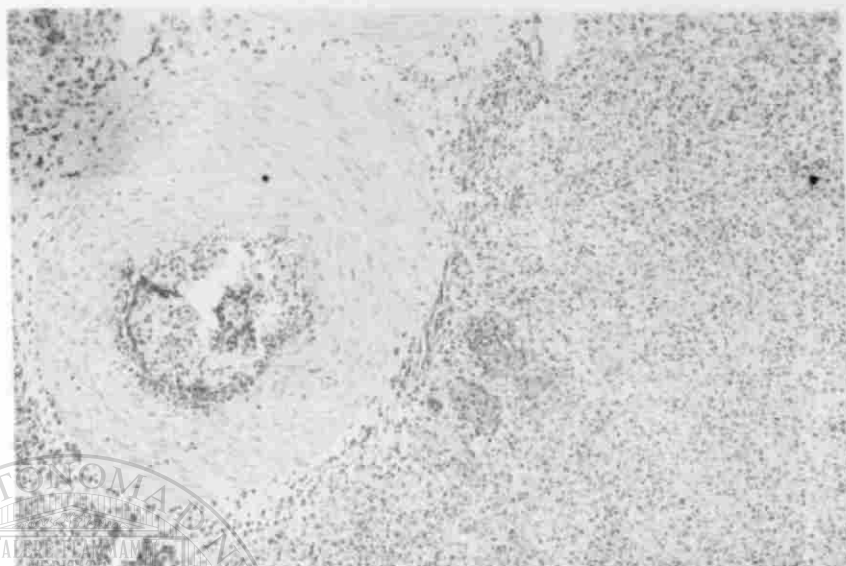


Figura 1.15 Se muestra trombosis en una arteria de mediano calibre en una área de extensa consolidación. Conejo perteneciente al grupo 5.
100 X.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

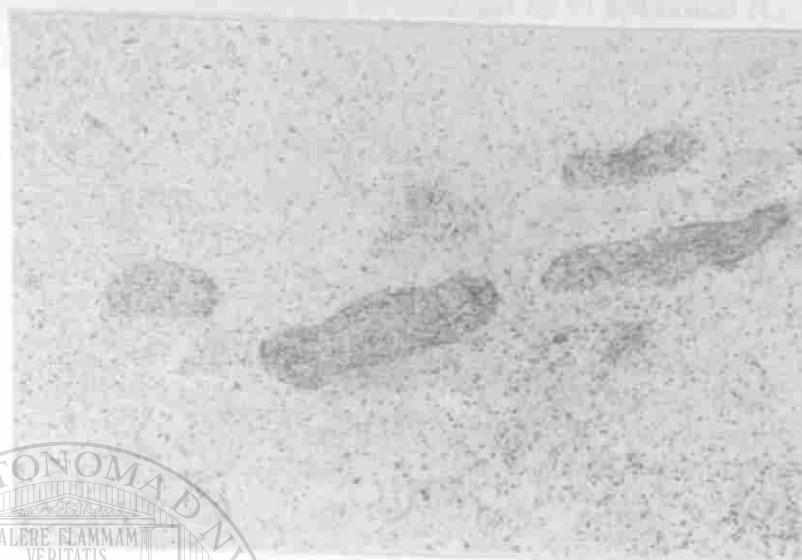
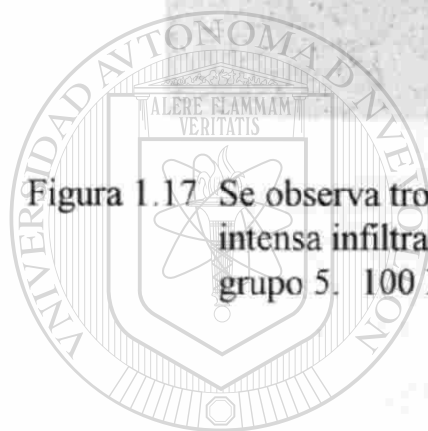


Figura 1.17 Se observa trombosis en pequeñas venas de la dermis; asimismo intensa infiltración de PMN y edema. Conejo perteneciente al grupo 5. 100 X.



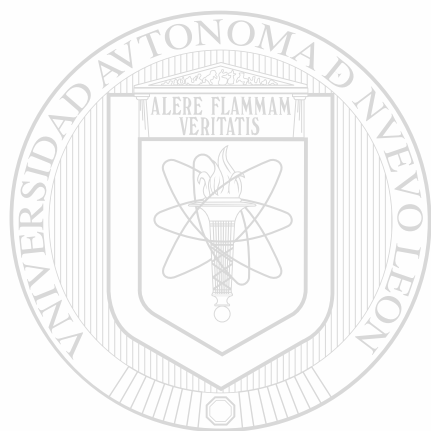
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 pasteurelisis 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 µg 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	6,400	T
	983.33 a	1,066.66 a	M
	98.31	103.27	DE
Macrófagos	1,609	3,344	
	268.16 a	557.33 b	
	72.15	123.74	
PMN	4,195	2,956	
	699.16 a	492.66 b	
	168.42	126.62	
Proteína	4.60	2.19	
	1.53 a	0.73 a	
	0.95	0.41	
Deshidrogenasa	104	27	
Láctica	34.66 a	9 a	
	33.56	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 1.0×10^{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* (1.0×10^{10} UFC/ml) para emulsificarse por sonicación durante 1 min en hielo. La concentración final fue de 3.1×10^8 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 μ 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> 50 µg/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> 50 µg/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> 100 µg/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

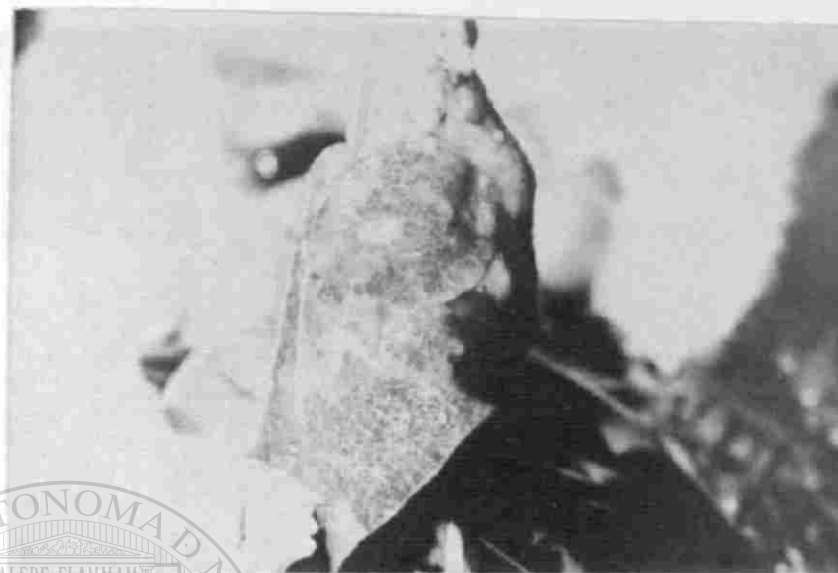


Figura 3.1 Pulmones que se muestran turgentes con hemorragias y áreas de consolidación. Conejo perteneciente al grupo 1a.

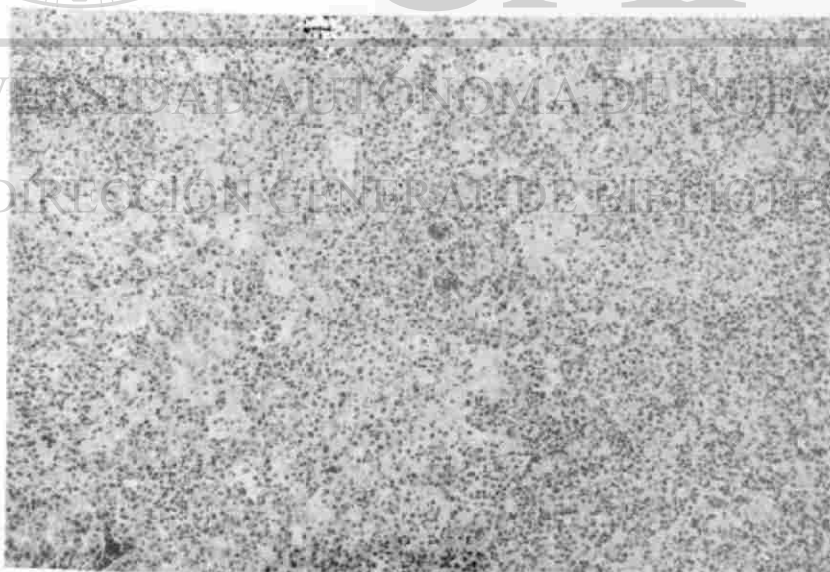


Figura 3.2 Se observa una área consolidada con abundante exudado serofibrinoso y numerosos PMN infiltrando. Conejo perteneciente al grupo 1a. 60 X.

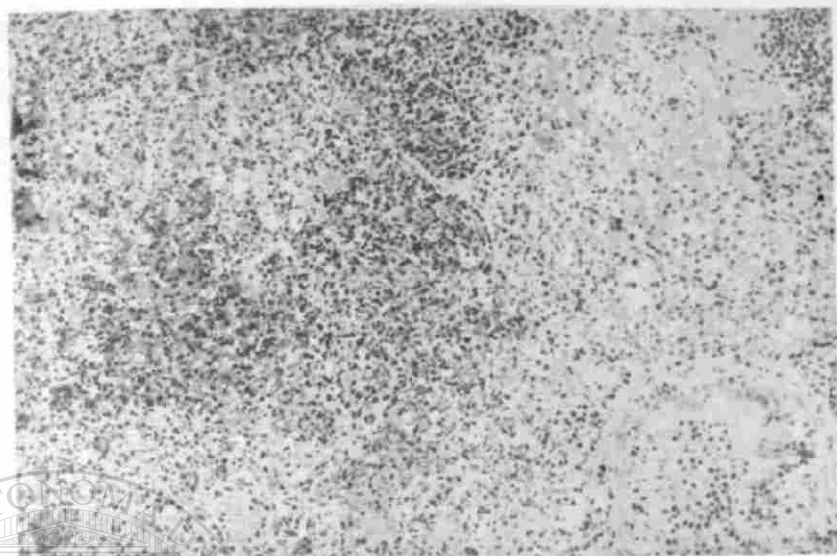
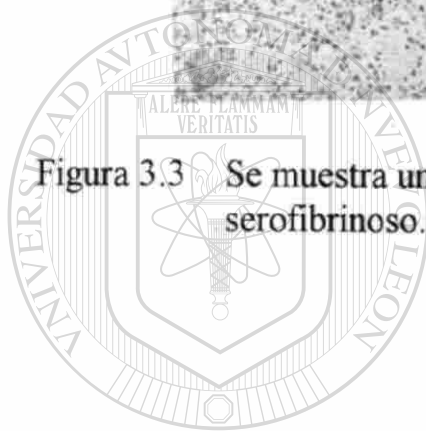


Figura 3.3 Se muestra una área de consolidación con necrosis y exudado serofibrinoso. Conejo perteneciente al grupo 1a. 100 X.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

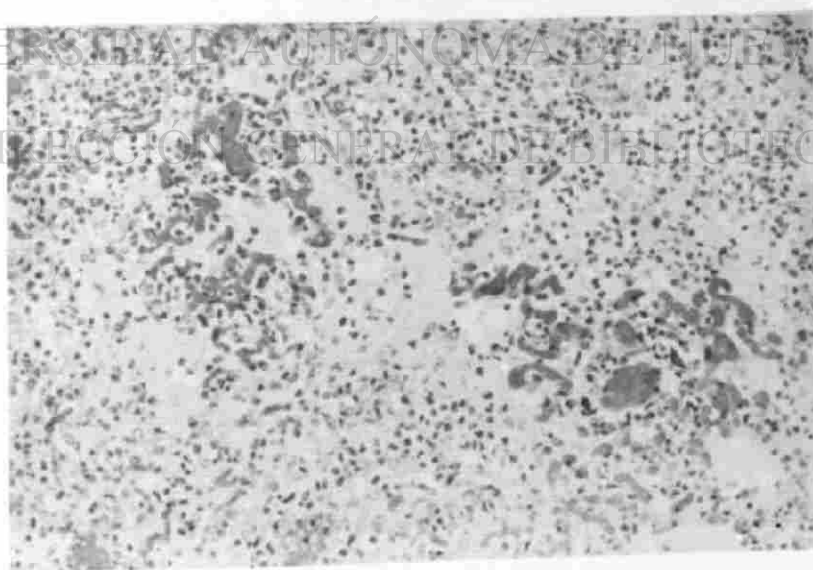


Figura 3.4 Se observa una área con abundante edema alveolar. Conejo perteneciente al grupo 2a. 100 X.

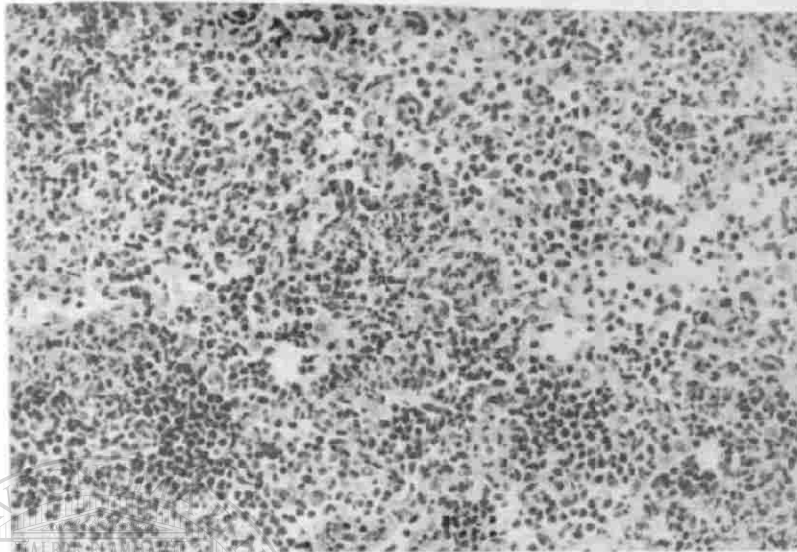


Figura 3.5 Se presenta una área parcialmente consolidada con abundantes PMN infiltrando septos alveolares y también exudado en la luz alveolar. Conejo perteneciente al grupo 2a. 160 X.

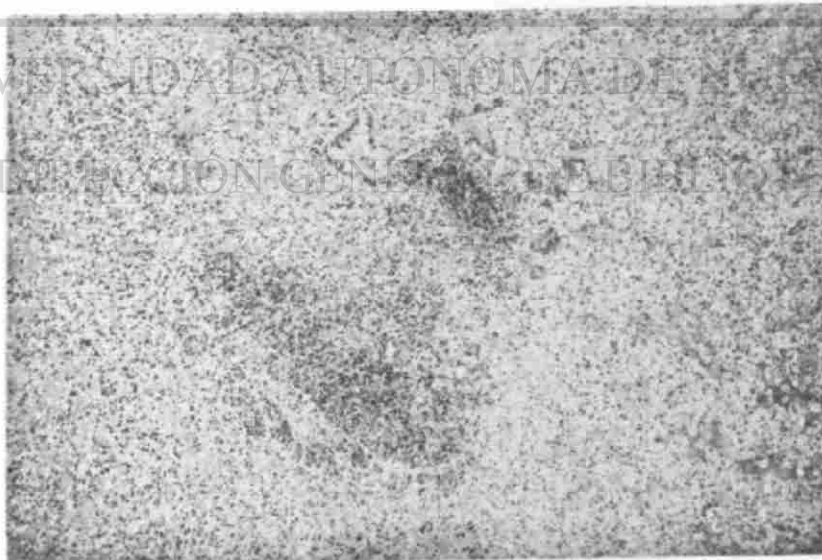


Figura 3.6 Se observa una área con intensa infiltración de PMN y abundante exudado serofibrinoso. Conejo perteneciente al grupo 3a. 100 X.

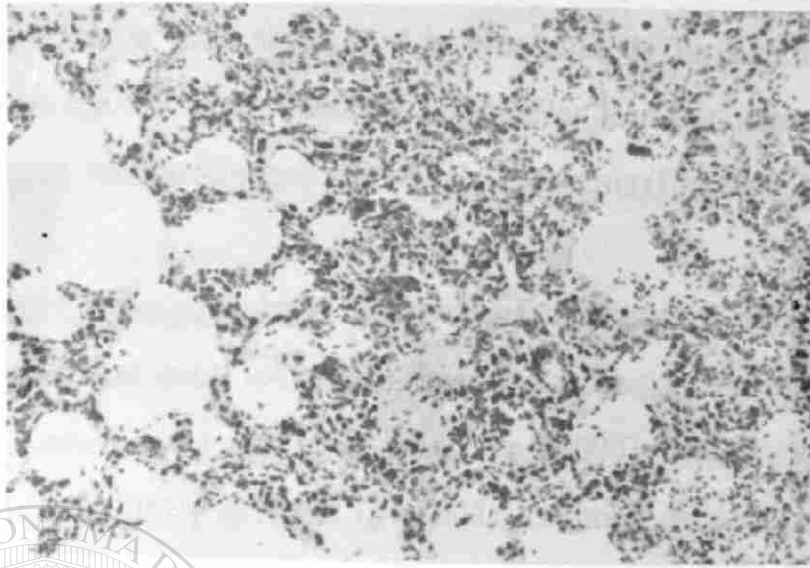
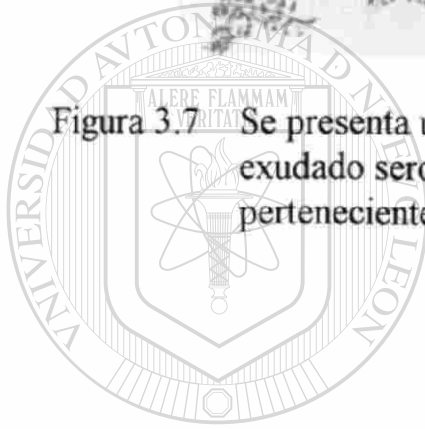


Figura 3.7 Se presenta una área parcialmente consolidada con abundante exudado serofibrinoso y obliteración de capilares. Conejo perteneciente al grupo 3 a. 160 X.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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	9,700acci*	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	6,388acej	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.

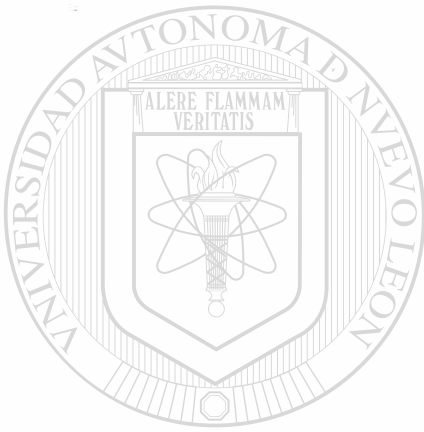
** No se realizaron contrastes en el caso de deshidrogenasa láctica, porque no se reconocieron diferencias significativas entre los grupos a partir del análisis de varianza.

Discusión

En el presente experimento la administración del suero hiperimmune 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 hiperimmune. 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).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Introducción

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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* (1.0×10^{10} UFC/ml); la concentración final de este inmunógeno fue 3.1×10^8 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 2.0×10^9 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 μ g del LPS de *P. haemolytica*; los animales del grupo 3 fueron desafiados con 50 μ g de albúmina sérica de bovino y, por último, el grupo 4 recibió también 50 μ 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 μ 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).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

Resultados

Serología. Los títulos más altos de anticuerpos contra el LPS de *P. haemolytica*, se obtuvieron de las muestras colectadas antes del desafío en el grupo 4. La mayoría de los animales respondieron con títulos elevados, los valores más comunes fueron 1:1280 y 1:2560; sólo dos animales presentaron títulos de 1:320. En los animales del grupo 2 el título mayor fue de 1:5 en dos animales.

En el grupo inmunizado con albúmina también se reconocieron franjas de precipitación bien definidas en todos los animales, justo al momento de su desafío.

Patología. Los conejos del grupo 1 no presentaron lesiones en sus pulmones, ni macroscópica ni microscópicamente. En el grupo 2 se apreciaron macroscópicamente pequeñas áreas de consolidación rojo-grisáceas con hemorragias; lesiones similares se observaron en los animales del grupo 4, pero en éstos las hemorragias fueron más notorias. En el grupo 3 se apreció congestión en la mayoría de los casos y sólo en algunos la consolidación se limitó al hilio de los pulmones. Microscópicamente las lesiones en el grupo 2 correspondieron a congestión e infiltración intersticial de PMN; sin embargo, en las zonas de mayor daño se observaron áreas de necrosis, hemorragias, intensa exudación de PMN y exudado serofibrinoso

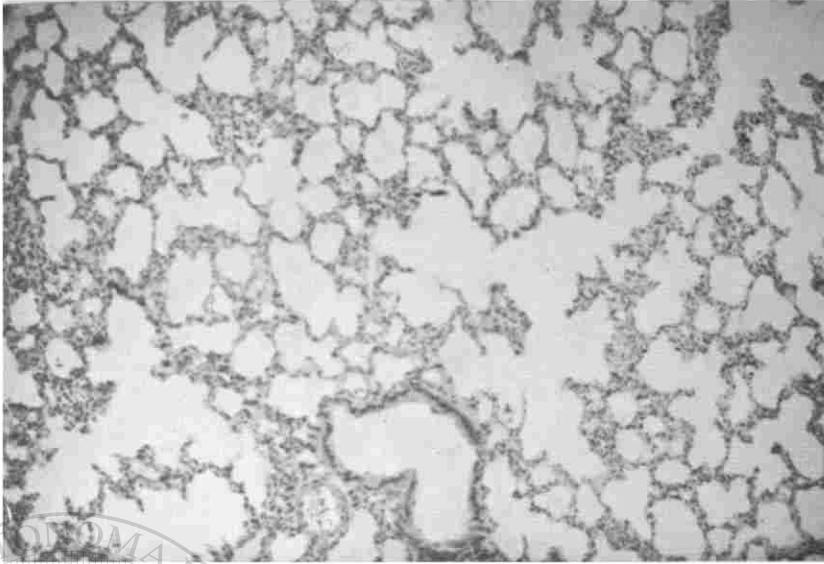


Figura 4.1 Se presenta una área con arquitectura alveolar normal. Conejo perteneciente al grupo 1. 100 X.



Figura 4.2 Se muestran pulmones turgentes congestionados y con áreas de consolidación. Animal perteneciente al grupo 2.

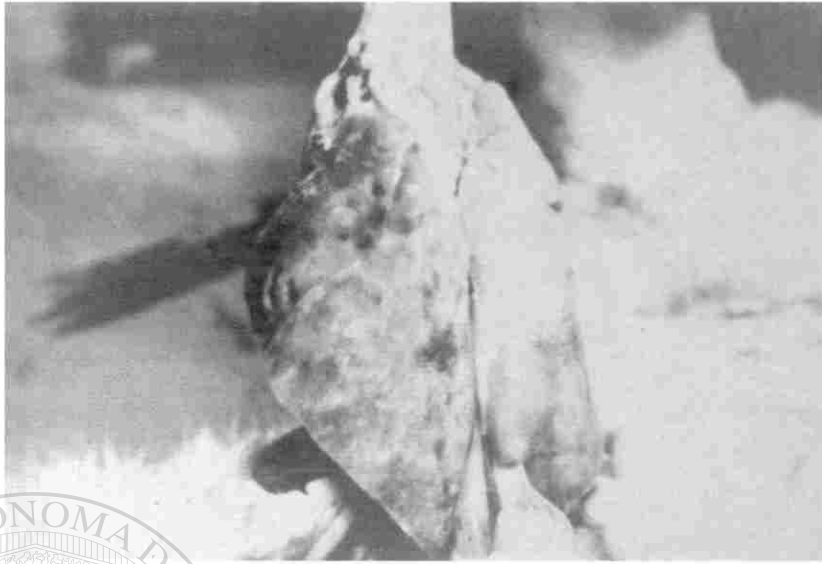
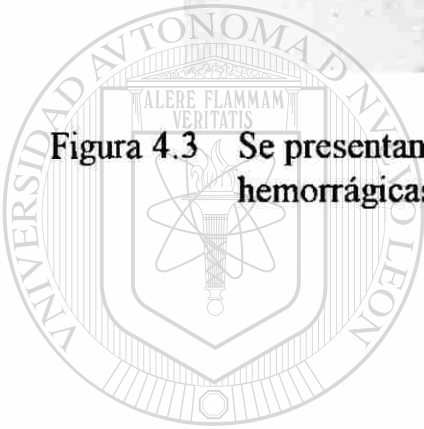


Figura 4.3 Se presentan pulmones turgentes, congestionados y con zonas hemorrágicas. Conejo perteneciente al grupo 4.



UANL

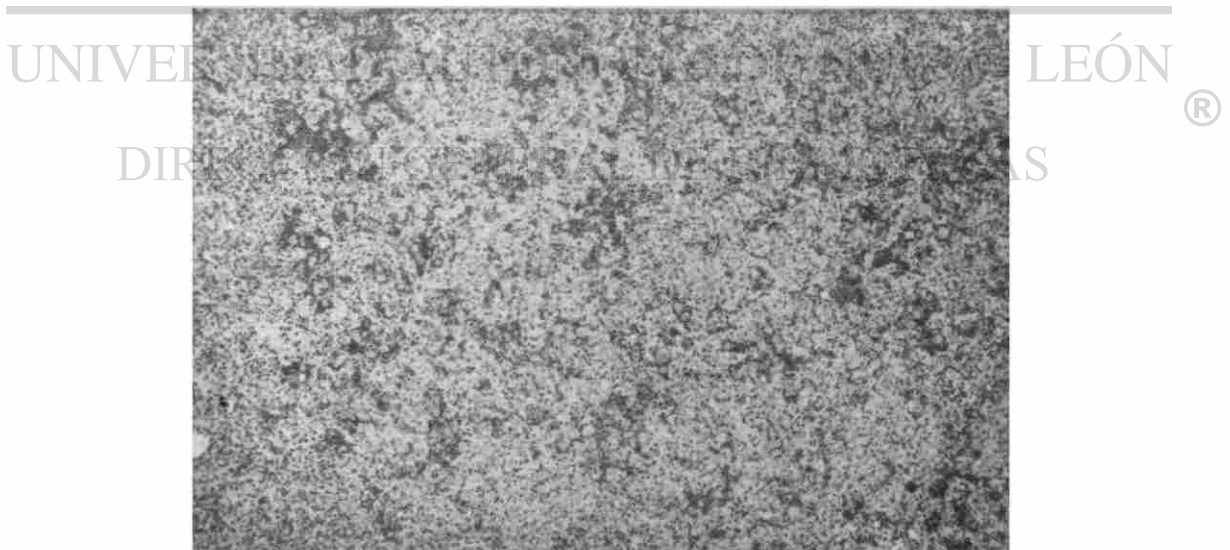


Figura 4.4 Se observan una área de intensa consolidación con zonas de necrosis y exudado serofibrinoso. Animal perteneciente al grupo 2. 60 X.

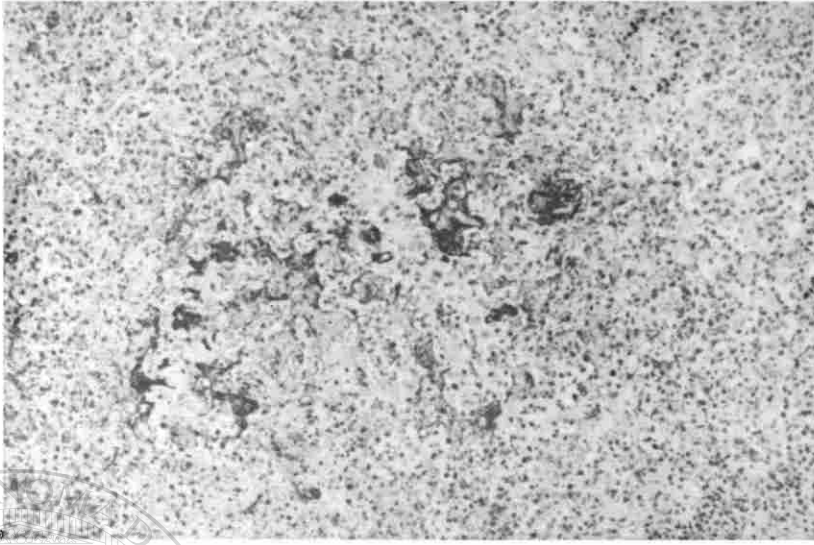


Figura 4.5 Se presenta una área de consolidación y necrosis con positividad a la presencia de fibrina. Conejo perteneciente al grupo 4. 100 X.

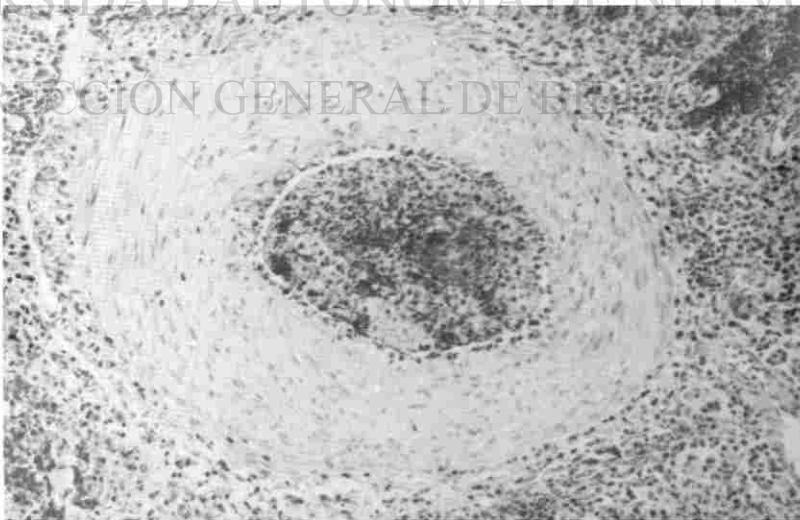


Figura 4.6 Se observa trombosis de una arteria en una área de consolidación. Animal perteneciente al grupo 4. 100 X.

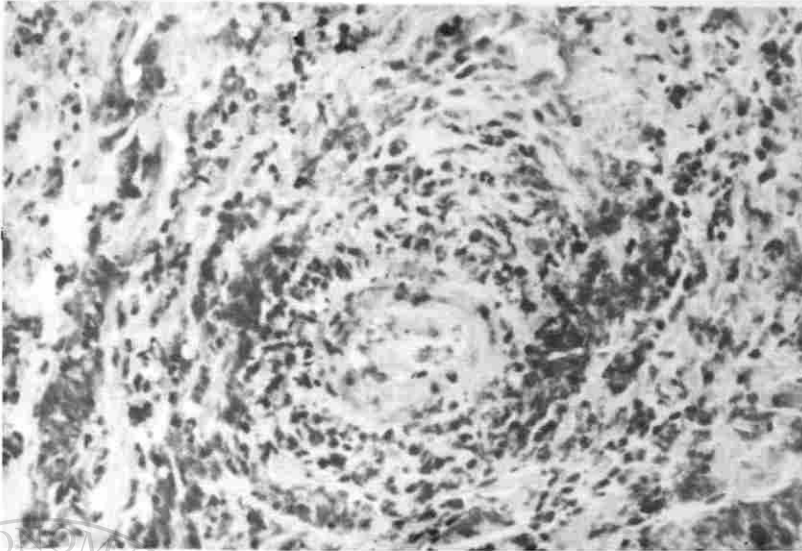
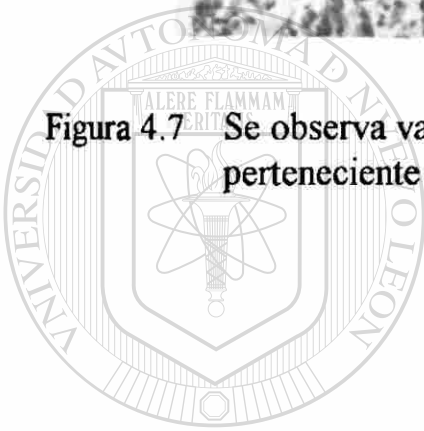


Figura 4.7 Se observa vasculitis y trombosis en dermis profunda. Conejo perteneciente al grupo 4. 160 X.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



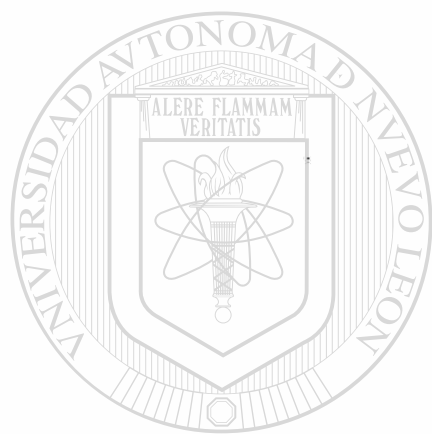
Figura 4.8 Se observa vasculitis y trombosis en pequeños vasos sanguíneos en una área de la dermis con intenso edema. Animal perteneciente al grupo 3. 160 X.

en alveolos. En el grupo 4 las lesiones fueron similares pero la exudación serofibrinosa fue más abundante; además, se apreció trombosis y/o vasculitis en algunos vasos sanguíneos. En el grupo 3 las lesiones histológicas se caracterizaron por un abundante edema alveolar y, en algunas áreas, hemorragia. La participación exudativa de los PMN fue menor; sin embargo, se reconocieron abundantes macrófagos. En algunos casos se apreció edema e infiltración perivascular de PMN. En las figuras 4.1-4.6 se muestran los cambios anteriormente reseñados.

Las lesiones en la piel de los animales de los grupos 3 y 4 se apreciaron a simple vista, siendo las del grupo 4 las más intensas. Microscópicamente, en el grupo 4 se apreció una severa reacción caracterizada por abundante infiltración de PMN asociada a necrosis, edema y hemorragia; asimismo, se identificó vasculitis y trombosis. En el grupo 3 las lesiones fueron similares a las del grupo 4, pero se pudo apreciar que el edema fue más intenso. En las figuras 4.7-4.10 se presentan los cambios anteriormente reseñados.

Lavados Bronquioalveolares. Los análisis de varianza demostraron que existían diferencias significativas entre los grupos cuando se compararon total de células ($p < 0.005$) PMN ($p < 0.005$), linfocitos ($p < 0.01$) y monocitos ($p < 0.005$); en cambio, no se apreciaron diferencias cuando se compararon macrófagos. La prueba de Scheffé para identificar la diferencia entre las medias demostró que el grupo 4, seguido por el 2, aportaban los valores más elevados en lo correspondiente a total de células y PMN; en tanto que el grupo 3 aportaba las diferencias en monocitos y linfocitos. En la tabla 4.1 se

resumen los datos anteriores, mientras que los procedimientos estadísticos se presentan en el apéndice A.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Tabla 4.1

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

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	
Total de Células	17,600	26,150	23,000	34,800	T
	1,100.00a	1,634.37b	1,437.50ab	2,175.00c	M
	294.39	601.86	492.44	556.77	DE
Macrófagos	12,101	12,962	10,689	14,141	
	756.31a	810.12a	668.06a	883.81a	
	239.15	339.78	168.97	380.90	
PMN	4,979	12,701	11,115	20,102	
	311.18a	793.81b	694.68ab	1,256.37c	
	161.44	505.93	371.08	649.00	
Linfocitos	98	136	300	136	
	6.12a	8.50ab	18.75b	8.50ab	
	4.70	6.87	14.87	12.52	
Monocitos	432	359	901	427	
	27.00a	22.43a	56.31b	26.68a	
	16.17	19.62	15.87	22.39	

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 diferencia significativa, mediante la prueba de Scheffé.

Discusión

Dada la interacción multietiológica de virus y bacterias en el desarrollo de la PN, se han desarrollado diversos biológicos para proteger al ganado contra este síndrome; entre los más comunes se incluyen vacunas de virus respiratorios, bacterinas y combinaciones de ambos (25,50,78). No obstante, habiéndose demostrado que *P. haemolytica* es la bacteria responsable de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y de la severidad de las lesiones pulmonares, los intentos por desarrollar el biológico ideal contra *P. haemolytica* aún persisten (25,50,78).

La respuesta inmune humoral generada por la inmunización con bacterinas convencionales, ha demostrado su ineficiencia para proteger consistentemente contra la PN (25,50). Inclusive, se ha observado que el uso de bacterinas aumenta la intensidad del padecimiento respiratorio y agrava las lesiones pulmonares (50). Se ha propuesto que en este caso la respuesta inmune humoral favorece una fagocitosis desproporcionada de las bacterias, las cuales permanecen viables en el interior de las células fagocitarias y son capaces de lissarlas por la producción de su leucotoxina, generándose, entonces, un mayor daño tisular (93,94).

Recientemente se ha descrito un modelo en el conejo en el que se ha demostrado que el daño pulmonar causado por *Pasteurella multocida*, ocurre más intensamente cuando los animales han sido inmunizados con una

bacterina convencional (58). Con base en estos resultados y comparándolos con la información previamente referida (93,94), se propuso que esta reacción adversa era compatible con un fenómeno de hipersensibilidad de tipo III a manera de una RA (58).

En el presente estudio se vuelve a examinar este modelo en el conejo; sin embargo, a diferencia con el modelo anterior (58), aquí se ha empleado una bacterina contra *P. haemolytica* para inmunizar a los animales, además se constató la producción de altos títulos de anticuerpos contra el LPS de la bacteria, el cual también se usó para desafiarlos.

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a las observaciones en becerros (21,22,31,93,94) y conejos (58), en el sentido de que la inmunización con bacterinas convencionales genera una respuesta inmune que no contribuye a disminuir el daño pulmonar, sino por el contrario, participa agravando las lesiones de la PN. Sin embargo, en este estudio, a diferencia de todos los demás, el desafío se llevó a cabo únicamente con el LPS de la bacteria, lo que confirma la importancia de este factor de virulencia en la generación del daño tisular (29,88,89,90,91), sobre todo si se toma en cuenta que *P. haemolytica* no posee capacidad de virulencia significativa para el conejo (68).

Asimismo, estos resultados también son compatibles con lo referido en otros estudios en los que se ha provocado daño pulmonar empleando complejos inmunes (28,54,84,85), o la fracción C5 del complemento activada (28,77,84), si bien, las lesiones que aquí se provocaron aparecen

más intensas. De hecho, la respuesta inflamatoria de los pulmones de los animales del grupo 3 en los que se empleó albúmina, fue menor que los grupos en los que se empleó LPS (grupos 2 y 4). Finalmente, los resultados son también compatibles con los datos que se obtuvieron en los tres experimentos anteriores; la explicación puede estar dada por la administración endotraqueal del LPS, que de por sí constituye un fuerte estímulo flogístico.

La infección natural con *P. haemolytica* produce usualmente una inmunidad de buena calidad y larga duración en comparación a la inducida por vacunas (50). Esta inmunidad presente en animales naturalmente expuestos a la bacteria les permite, inclusive, resistir un desafío experimental (21). Las diferencias entre esta inmunidad natural y la adquirida por vacunación puede deberse a las distintas rutas de exposición (intranasal en la exposición natural y parenteral en la vacunación) o a la producción de ciertos antígenos *in vivo* que no se producen durante la preparación *in vitro* de los biológicos (50).

CAPITULO V

DISCUSION

Con anterioridad se ha mencionado que los animales de laboratorio no son adecuados como modelos de la PN; este punto de vista se fundamenta en la falta de patogenicidad de *P. haemolytica* para estos animales (16,48,94). No obstante, debido a que los trabajos con rumiantes son costosos, los intentos para desarrollar un modelo de la enfermedad en animales de laboratorio aún persisten. Este fue el objetivo fundamental de este trabajo.

Por principio, se escogió al conejo porque es el animal de elección para inducir tanto la RS (49,75) como la RA (19,79); además, ya se tenían experiencias previas sobre la inducción de ambos fenómenos en el pulmón de este animal (57,58,59).

En segundo lugar, se trabajó con el LPS de *P. haemolytica* porque, entre sus factores de virulencia, el LPS parece ser el responsable de la mayor parte de las lesiones pulmonares (90,91). Además, sus actividades biológicas, incluyendo la RS, han sido reconocidas plenamente (41,63). La leucotoxina, el otro factor de virulencia importante de la bacteria, ejerce su patogenicidad específicamente contra leucocitos de rumiantes (68), por lo cual no cabría

esperar efecto en el pulmón del conejo; de hecho, se ha señalado una falta de actividad patológica de la leucotoxina en el pulmón de la rata (45).

En los cuatro trabajos que se incluyen en esta disertación, se ha demostrado que el conejo es un excelente modelo para el estudio de la PN; esta afirmación se basa en los resultados obtenidos. Por ejemplo, en el experimento 1 se establece la similitud de las lesiones provocadas por la inoculación ET y ET/EV (Shwartzman) con las lesiones reconocidas en casos naturales de PN en el ganado. Al respecto, la observación de una alveolitis serofibrinosa con intensa infiltración de PMN, necrosis y hemorragia, además de trombosis y daño vascular, concuerda con las descripciones que se han hecho para este padecimiento (3,4,40,60,83).

En el experimento 2 se constató lo que se había apreciado en el primer experimento: la inoculación endotraqueal contribuye más que la subsecuente inoculación endovenosa en la generación de la RS en el pulmón; es decir, la respuesta inflamatoria generada por la inoculación endotraqueal del LPS es similar en intensidad a la que se observa cuando se induce una RS (ET/EV) y superior a la que se produce por la inoculación endovenosa. Esta apreciación es compatible con lo que se ha observado en ovinos cuando se compara la intensidad de su respuesta inflamatoria pulmonar ante un desafío endotraqueal o endovenoso con LPS de *E. coli* (92). En estos animales también se demostró que la vía aerógena responde inflamatoriamente con mayor intensidad que la ruta endovenosa (92). Igualmente, en becerros, la inoculación endotraqueal de endotoxina de *P. haemolytica* causa una

exudación alveolar de PMN, mayor que cuando el LPS se administra por vía endovenosa (70).

Los resultados del experimento 3, en el que se demostró que la respuesta inflamatoria pulmonar resulta más intensa cuando los animales han recibido previamente suero hiperinmune, a manera de inmunización pasiva, también concuerda con observaciones hechas en experimentos con ovinos (71,86). Finalmente, las observaciones sobre los efectos desfavorables de la inmunización del ganado con bacterinas convencionales contra la PN (25,50), son compatibles con los resultados del experimento 4, en el que se demostró que la hiperinmunización con una bacterina convencional de *P. haemolytica*, agrava la respuesta inflamatoria del pulmón ante un desafío con el LPS de la bacteria por vía endotraqueal. Asimismo, apoyan la propuesta de que una reacción de tipo Arthus activa pueda provocar estas lesiones en el pulmón (57,58).

Las compatibilidades señaladas anteriormente, reiteran la utilidad del conejo como modelo animal para el estudio de la PN, pero además, confirman la importancia del LPS de la bacteria en la patogenia del padecimiento.

En los cuatro experimentos que aquí se realizaron, se utilizó el LPS de la bacteria; es por esto que las lesiones histológicas comparten semejanzas notables, a pesar de que los mecanismos para generar el daño sean diferentes. Por otra parte, se ha referido con anterioridad que la RA y la RS poseen similitud patológica a pesar de ser completamente diferentes en los

mecanismos que intervienen en ellas (74). Probablemente las similitudes se deban a que tanto en una como en otra, se producen citocinas, particularmente IL-1 y TNF que pueden participar como un común denominador en la generación del daño tisular (7,8,53,84,85). Otra situación que no debe ignorarse es la activación del complemento y la participación de los PMN en ambos fenómenos (49,52,53,75,79,85,86). Finalmente, se ha señalado que la respuesta inflamatoria aguda es una respuesta estereotipada, por lo que no pueden asignársele características distintivas (59), sobre todo, en el pulmón, que es un órgano que responde intensamente a los estímulos flogísticos (69).

Por último, algunas de las perspectivas inmediatas que pudieran resultar interesantes de ensayar en este modelo son: el estudio ultraestructural de las lesiones, el ensayo con anticuerpos monoclonales contra la fracción R del LPS o contra las citocinas mediadoras, la administración de polimixina B y el ensayo con el lípido X; las últimas tres con la intención de bloquear o disminuir los efectos adversos del LPS.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Tanto la reacción de Shwartzman como la reacción de Arthus pueden inducirse en el pulmón del conejo empleando el LPS de *P. haemolytica*, y sus características patológicas reflejan en gran parte las lesiones que se presentan en casos naturales de pasteurelosis neumónica en el ganado; en ambas, el papel protagónico dominante en la respuesta flogística pulmonar, le corresponde a la administración endotraqueal del LPS.

El conejo es un modelo animal adecuado para el estudio de los mecanismos que operan en la generación del daño pulmonar, mediado por el LPS de *P. haemolytica*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LITERATURA CITADA

1. Adlam, C.: The structure, function and properties of cellular and extracellular components of *Pasteurella haemolytica*, In: *Pasteurella and Pasteurellosis*. Edited by: Adlam, C., Rutter, J.M: 75-92. *Academic Press*, London, 1989.
2. Al - Aubaidi, J. and Fabricant, J. : Characterization and classification of bovine *Mycoplasma*. *Cornell Vet.*, 61: 490-518 (1971).
3. Allan, E.M., Gibbs, H.A., Wiseman, A. and Selman, I.E.: Sequential lesions of experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet. Rec.*, 117: 438-442 (1985).
4. Ames, T.R., Markham, R.J.F., Opuda-Asibo, J., Leininger, J.R. and Maheswaran, S.K. : Pulmonary response to intratracheal challenge with *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Can. J. comp. Med.*, 49: 395-400 (1985).
5. Arend, W.P.: Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J. Clin. Invest.*, 88: 1445-1451 (1991).
6. Baggiolini, M., Walz, A and Kunkel, S.L.: Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 84: 1045-1049 (1989).
7. Beck, G. , Habicht, G.S., Benach, J.L. and Miller, F. : Interleukin 1: a common endogenous mediator of inflammation and the local Shwartzman reaction. *J. Immunol.*, 136: 3025-3031 (1986).
8. Billiau, A. : Gamma-interferon: the match that lights the fire. *Immunology Today.*, 9: 37-40 (1988).

9. Bowersock, T.L. Shalaby, W.S.W., Levy, M., Samuels, M.L., Lallone, R., White, R., Borie, D.L., Lehmyer, J. and Park, K.: Evaluation of an orally administered vaccine using hydrogels containing bacterial exotoxins of *Pasteurella haemolytica* in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 55: 502-509 (1994).
10. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254 (1976).
11. Braude, A.I.: Endotoxin Immunity. In: *Advances in Internal Medicine*, Vol. 26. Edited by: Stollerman, G.H. 427-445. *Year Book Medical Publishers*, Chicago, Ill., 1980.
12. Breider, M.A., Kumar, S. and Corstvet, R.E.: Bovine pulmonary endothelial cell damage mediated by *Pasteurella haemolytica* pathogenic factors. *Infect. Immun.*, 58: 1671-1677 (1990).
13. Breider, M.A., Kumar, S. and Corstvet, R.E.: Interaction of bovine neutrophils in *Pasteurella haemolytica* mediated damage to pulmonary endothelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 27: 337-350 (1991).
14. Brogden, K.A.: Changes in pulmonary surfactant during bacterial pneumonia. *Antonie van Leeuwenhoek*, 59: 215-223 (1991).
15. Brogden, K.A. and Packer, R.A.: Comparison of *Pasteurella multocida* serotyping systems. *Am. J. Vet. Res.*, 40: 1332-1335 (1979).
16. Campbell, S.G., Mtero, S.S., Niderbuhl, C.J. and Collins, F.M.: Fate of *Pasteurella haemolytica* in conventionally raised and germfree mice. *Infect. Immun.*, 39: 202-207 (1983).
17. Car, B.D., Suyemoto, M.M., Neilsen, N.R. and Slauson, D.O.: The role of leukocytes in the pathogenesis of fibrin deposition in bovine acute lung injury. *Am. J. Pathol.*, 138: 1191-1198 (1991).

18. Clinkenbeard, K.D., Clarke, C.R., Morton, R.J., Panciera, R.J., Confer, A.W. and Mosier, D.A.: Role of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in virulence and immunity in shipping fever pneumonia. *The Compendium*, 14: 1249-1260 (1992).
19. Cochrane, C.G. : The Arthus and related reactions. In: *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Vol. V. Edited by: Williams, C.A., Chase, M.W. 159-175, *Academic Press*, New York, 1976.
20. Cohn, L.A. and Adler, K.B.: Interactions between airway epithelium and mediators of inflammation. *Exp. Lung Res.*, 18: 299-322 (1992).
21. Confer, A.W., Panciera, R.J. and Fulton, R.W.: Effect of prior natural exposure to *Pasteurella haemolytica* on resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 2622-2624 (1984).
22. Confer, A.W., Panciera, R.J. Fulton, R.W., Gentry, M. J., and Rummage, J.A.: Effect of vaccination with live or killed *Pasteurella haemolytica* on resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 342-347 (1985).
23. Cullor, J.S.: Shock attributable to bacteremia and endotoxemia in cattle: clinical and experimental findings. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 200: 1894-1902 (1992).
24. Danner, R.L.: Mediators and endotoxin inhibitors. In: *Septic Shock in Humans*. Moderated by: Parrillo, J. E. *Ann. Intern. Med.*, 113: 235-237 (1990).
25. De Alwis, M.C.L. : Pasteurellosis in production animals: A review. In: *Pasteurellosis in production Animals*. Edited by: Patten, B.E., Spencer, T.L., Johnson, R.B. Hoffman, D. Lehane, L. 11-22. *The Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR)*, Proceedings No. 43, Canberra, Australia, 1993.

26. Dinarello, C.A. and Thompson, R.C.: Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist *in vivo* and *in vitro*. *Immunology Today*, 12: 404-410 (1991).
27. Dungworth, D.L.: The respiratory system. In: Pathology of Domestic Animals. 3rd. ed. Vol. 2. Edited by: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. 632-638. *Academic Press*, San Diego, California, 1985.
28. Emancipator, S. N. and Lamm, M.E. : Pathways of tissue injury initiated by humoral immune mechanisms. *Lab. Invest.*, 54: 475- 478 (1986).
29. Espinasse, J., Peel, J.E., Viroil, M.J., Schelcher, F. and Valarcher, J.F.: Absence of circulating TNF in experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet. Rec.*, 132: 303-304 (1993).
30. Frank, G.H.: Pasteurellosis of cattle. In: *Pasteurella* and Pasteurellosis. Edited by: Adlam, C., Rutter, J.M., 197-221. *Academic Press*, London, 1989.
31. Friend, S.C.E., Wilkie, B.N., Thomson, R.G. and Barnum, D.A. : Bovine pneumonic pasteurellosis: experimental induction in vaccinated and nonvaccinated calves. *Can. J. Comp. Med.*, 41: 77-83 (1977).
32. Galanos, C., Luderitz, O. and Westphal, O.: A new method for extraction of R-lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 9: 245-249 (1969).
33. Gonzalez, C. T. and Maheswaran, S.K. : The role of induced virulence factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis: review and hypotheses. *Br. Vet. J.*, 149: 183-194 (1993).

34. Grau, G.E., Vesin, C., De Groote, D., Delacroix, D., Gysler, C., Piguet, P.F. and Lambert, P.H.: Prevention of human TNF-induced cutaneous Shwartzman reaction and acute mortality in mice treated with anti-human TNF monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.*, 84: 411-414 (1991).
35. Henricson, B.E., Benjamin, W.R. and Vogel, S.N.: Differential cytokine induction by doses of lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A that result in equivalent early endotoxin tolerance. *Infect. Immun.*, 59: 2429-2437 (1990).
36. Henricson, B.E., Neta, R. and Vogel, S.N.: An interleukin-1 receptor antagonist blocks lipopolysaccharide-induced colony stimulating factor production and early endotoxin tolerance. *Infect. Immun.*, 59: 1188-1191 (1991).
37. Heremans, H., Van Damme, J., Dillen, C., Dijkmans, R. and Billiau, A.: Interferon δ , a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.*, 171: 1853-1869 (1990).
38. Humason, G.L.: Animal Tissue Techniques. 4th ed. *W.H. Freeman and Company*, San Francisco, 1979.
39. Jarstrand, C., Wiernik, A., Curstedt, T., Sunsvist, K.G.: Lung surfactant inhibits the lipopolysaccharide induced release of oxygen radicals, enzymes and interleukin-1 from phagocytes. *Immunology & Infectious Disease*, 1: 179-182 (1991).
40. Jericho, K.W.F.: Histological changes in lungs of calves exposed to an aerosol of *Pasteurella haemolytica*. *J. Comp. Path.*, 101: 87-99 (1989).
41. Keiss, R.E., Will, D.H. and Collier, J. R. : Skin toxicity and hemodynamic properties of endotoxin derived from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.*, 25: 935-942 (1964).

42. Kim, J.C.S.: Immunological injury in "shipping fever" pneumonia of cattle. *Vet. Rec.*, 100: 109-111 (1977).
43. Lopez, A., Albassam, M., Yong, S., Sharma, A., Lillie, L. E. and Prior, M.G.: Profiles of type-II pneumocytes in rats inoculated intratracheally with bacterial lipopolysaccharide. *Am. J. Vet. Res.*, 48: 1534-1539 (1987).
44. Lopez, A. and Yong, S.: Injury versus inflammatory response in the lungs of rats intratracheally inoculated with bacterial lipopolysaccharide. *Am. J. Vet. Res.*, 47: 1287-1292 (1986).
45. Lopez, A., Yong, S. and Shewen, P.: Effect of intratracheal inoculation of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin on the integrity of rat lung. *Can. J. Vet. Res.*, 51: 533-535 (1987).
46. Lynn, W.A. and Golenbock, D.T. : Lipopolysaccharide antagonists. *Immunology Today*, 13: 271-276 (1992).
47. Mashimo, J., Mizutani, T., Mita, A. and Kasai, N.: Neutralization of Shwartzman-inducing activity by antibodies recognizing the Re core or lipid A structures of lipopolysaccharidae from *Salmonella minnesota* R595 and *Pseudomonas vesicularis* JCM1477. *Microbiol. Immunol.*, 35: 423-434 (1991).
48. McVey, D.S. and Loan, R.W.: Antibody complement-dependent bacteriolysis in experimentally induced pasteurellosis in mice. *Am. J. Vet. Res.*, 50: 762-768 (1989).
49. Mori, W.: The Shwartzman reaction: a review including clinical manifestations and proposal for a univisceral or single organ third type. *Histopathology*, 5: 113-126 (1981).
50. Mosier, D.: Prevention and control of pasteurellosis. in: Pasteurellosis in Production Animals. Edited by: Patten, B.E., Spencer, T.L., Johnson, R.B., Hoffmann, D. and Lehane, L. 121-134. *The Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Proceedings No. 43, Canberra, Australia, 1993.*

51. Mosier, D.A., Simons, K.R., Chengappa, M.M. and Confer, A.W.: Antigenic composition of *Pasteurella haemolytica* serotype-1 supernatants from supplemented and nonsupplemented media. *Am. J. Vet. Res.*, 55: 348-352 (1994).
52. Movat, H.Z. and Burrowes, C.E.: The local Shwartzman reaction: endotoxin-mediated inflammatory and thrombo-hemorrhagic lesions. In: Handbook of Endotoxin. Vol. 3. Cellular Biology of Endotoxin. Edited by: Proctor, R.A. (Series editor), Berry, L.J. (Editor). Ch. 13. 260-302. *Elsevier*, Amsterdam, 1985.
53. Movat, H.Z., Burrowes, C.E., Cybulsky, M.I. and Dinarello, C.A.: Acute inflammation and a Shwartzman reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. Synergistic action of the cytokines in the induction of inflammation and microvascular injury. *Am. J. Path.*, 129: 463-476 (1987).
54. Olenchock, S.A. : Animal models of hypersensitivity pneumonitis: a review. *Annals of Allergy*, 38: 119-126 (1977).
55. Olson, N.C., Salzer, W.L. and McCall, C.E.: Biochemical, physiological and clinical aspects of endotoxemia. *Molec. Aspects Med.*, 10: 511-629 (1988).
56. Phillips, M., Rimler, R.B. and Rebers, P.A.: Failure of ribosomes from nonencapsulated *Pasteurella multocida* to protect CF-1 mice. *Am. J. Vet. Res.*, 42: 1769-1774 (1981).
57. Ramírez-Romero, R., Rodríguez-Tovar, y Rivas Farías, M. : Cronología del daño tisular mediado por un fenómeno semejante a la reacción de Arthus activa en el pulmón del conejo. *Vet. Méx.*, 20: 169-178 (1989).
58. Ramírez-Romero, R., Rosales-García, F., Rodríguez-Tovar, L. E. y Rodríguez-Garza, A.P. : Daño neumónico provocado por *Pasteurella multocida* en conejos previamente sensibilizados con una bacterina homóloga y su relación con la reacción de Arthus. *Vet. Méx.*, 21: 149-157 (1990).

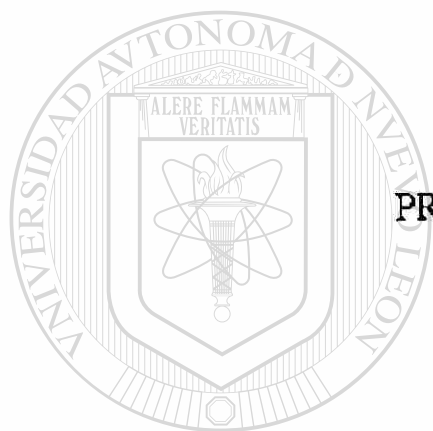
59. Ramírez-Romero, R., Sandoval-Tassinari, D. y Suárez-Semour, A. :
Inducción de la reacción de Shwartzman en el pulmón del
conejo empleando lipopolisacárido de *Pasteurella multocida*.
Vet. Méx., 22: 415-424 (1991).
60. Rehtulla, A. J. and Thomson, R.G.: A review of lesions in shipping
fever of cattle. *Can. Vet. J.*, 22: 1-8 (1981).
61. Reynolds, H.Y. : Integrated host defense against infections. In: *The
Lung*. Vol. 2. Edited by: Crystal, R.G., West, J.B. (Editors-in-
chief), Barnes, P.J. Cherniack, N.S., Weibel, E. R. (Associate
editors). Ch. 7.4.1. 1899-1911. *Raven Press, New York, N.Y.*
1991.
62. Rietschel, E.T. and Brade, H. Bacterial endotoxins. *Scientific
American*, 267: 26-33 (1992).
63. Rimsay, R.L., Coyle-Dennis, J.E., Lauerman, L. H. and Squire, P.G.:
Purification and biological characterization of endotoxin
fractions from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.*,
42: 2134-2138 (1981).
64. Risco, C., Carrascosa, J. L. and Bosch, M.A.: Uptake and subcellular
distribution of *Escherichia coli* lipopolysaccharide by isolated
rat type II pneumocytes. *J. Histochem. Cytochem.*, 39 :
607-615 (1991).
65. Said, S. I.: Principles and strategies in the pharmacological modulation
of lung injury. In: *The Pulmonary Circulation and Acute Lung
Injury*. 2nd. ed. Edited by: Said, S.I. Ch. 19. 457-472. *Futura
Publishing Company, Mount Kisco, N.Y.*, 1991.
66. Sharma, S.A., Olchowy, T.W.J., Yang, Z. and Breider, M.A.: Tumor
necrosis factor and interleukin 1 enhance lipopolysaccharide-
mediated bovine endothelial cell injury. *J. Leukoc. Biol.*, 51:
579-585 (1992).

67. Shiga, J. and Mori, W.: A study on pulmonary hemorrhage experimentally produced by the Shwartzman mechanism in rabbits. *Acta Pathol. Jpn.*, 35: 849-861 (1985).
68. Shewen, P.E. and Conlon, J.A.: *Pasteurella*. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 2nd ed. Edited by: Gyles, C.L., Thoen, C.O. 216-225. *Iowa State University Press*, Ames, Iowa, 1993.
69. Slauson, D.O. : The mediation of pulmonary inflammatory injury. *Adv. Vet. Sci. comp. Med.*, 26: 99-153 (1982).
70. Slocombe, R.F., Mulks, M., Killingsworth, C.R. , Derksen, F.J. and Robinson, N.E. : Effect of *Pasteurella haemolytica*-derived endotoxin on pulmonary structure and function in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 51: 433-438 (1990).
71. Smith, G.R. : Difficulty in protecting lambs against *Pasteurella haemolytica* biotype A with antiserum, *Vet. Rec.*, 112: 128-129 (1983).
72. Steel, R.G.D. and Torrie, J.H.: Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. 2nd ed. *Mc Graw-Hill International Book Company*, Singapore, 1981.
73. Steinbeck, M. J. and Roth, J.A. Neutrophil activation by recombinant cytokines. *Rev. Infect. Dis.*, 11: 549-568 (1989).
74. Stetson, C.A. : Similarities in the mechanisms determining the Arthus and Shwartzman phenomena. *J. Exp. Med.*, 94: 347-357 (1951).
75. Taichman, N.S. : The local Shwartzman reaction. In: Inflammation, Immunity and Hypersensitivity. Edited by: Movat, H.Z. 480-525. *Harper & Row*, New York, N.Y. 1976.

76. Thomas, L. H., Gourlay, R.N., Wyld, S.G., Parsons, K. R. and Chanter, N.: Evidence that blood-borne infection is involved in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet. Pathol.*, 26: 253-259 (1989).
77. Till, G.O. and Ward, P.A.: Complement-induced lung injury, In: *The Pulmonary Circulation and Acute Lung Injury*. 2nd. ed. Edited by: Said, S.I. Ch. 16. 381-401. *Futura Publishing Company*, Mount Kisco, N. Y. 1991.
78. Trigo, F. J.: Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurellosis pulmonar bovina. *Vet. Méx.*, 22: 131-134 (1991).
79. Udaka, K. : The Arthus reaction. In: *Inflammation, Immunity and Hypersensitivity*. Edited by: Movat, H. Z. 389-423. *Harper & Row Publishers*, New York, 1971.
80. Ulich, T.R., Guo, K., Yin, S., del Castillo, J., Yi, E.S., Thompson, R.C. and Eisenberg, S.P.: Endotoxin- induced cytokine gene expression *in vivo* IV. Expression of interleukin-1 / and interleukin-1 receptor antagonist mRNA during endotoxemia and during endotoxin-initiated local acute inflammation. *Am. J. Path.*, 141 : 61- 68 (1992).
81. Ulich, T.R., Watson, L.R., Yin, S., Guo, K., Wang, P., Thang, H. and del Castillo, J.: The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am. J. Path.*, 138: 1485-1496 (1991).
82. Ulich, T.R., Yin, S., Guo, K., Yi, E.S., Remick, D. and del Castillo, J.: Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. *Am. J. Path.*, 138: 1097-1101 (1991).
83. Vestweber, J. G., Klemm, R.D., Leipold, H.W., Johnson, D.E. and Bailie, W.E. : Clinical and pathologic studies of experimentally induced *Pasteurella haemolytica* pneumonia in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 51: 1792-1798 (1990).

84. Warren, J.S., Barton, P.A. and Jones, M.L. : Contrasting roles for tumor necrosis factor in the pathogenesis of IgA and IgG immune complex injury. *Am. J. Pathol.*, 138: 581-590 (1991).
85. Warren, J.S., Yabroff, K.R., Remick, D.G., Kunkel, S.L., Chensue, S.W., Kunkel, R.G., Johnson, K.J. and Ward, P.A. : Tumor necrosis factor participates in the pathogenesis of acute immune complex alveolitis in the rat. *J. Clin. Invest.*, 84: 1873-1882 (1989).
86. Wells, P.W., Evans, H.B., Burrells, C., Sharp, J.M., Gilmour, N.J.L., Thompson, D.A. and Rushton, B. : Inability of passively acquired antibody to protect lambs against experimental pasteurellosis. *Infect. Immun.*, 26: 25-29 (1979).
87. Wewers, M. D. and Gadek, J.E. : Proinflammatory polypeptides, In: *The Lung*. Vol. I. Edited by: Crystal, R.G., West, J.B., (Editors-in chief), Barnes, P.J. Cherniack, N.S., Weibel, E.R. (Associate editors). Ch. 2.8. 91-103. *Raven Press*, New York, N.Y., 1991.
88. Whiteley, L.O., Maheswaran, S.K., Weiss, D.J. and Ames, T.R. : Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* A1-derived endotoxin, leukotoxin, and capsular polysaccharide in experimental bovine *Pasteurella pneumonia*. *Vet. Pathol.*, 27: 150-161 (1990).
89. Whiteley, L.O., Maheswaran, S.K., Weiss, D.J. and Ames, T.R. : Alterations in pulmonary morphology and peripheral coagulation profiles caused by intratracheal inoculation of live and ultraviolet light-killed *Pasteurella haemolytica* A1 in calves. *Vet. Pathol.*, 28: 275-285 (1991).
90. Whiteley, L.O., Maheswaran, S.K., Weiss, D.J. and Ames, T.R. : Morphological and morphometrical analysis of the acute response of bovine alveolar wall to *Pasteurella haemolytica* A1-derived endotoxin and leucotoxin. *J. Comp. Pathol.*, 104: 23-32 (1991).

91. Whiteley, L.O., Maheswaran, S.K., Weiss, D.J. Ames, T.R., and Kannan, M.S.: *Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: Pathogenesis. *J. Vet. Int. Med.*, 6: 11-22 (1992).
92. Wiener-Kronish, J.P., Albertine, K.H. and Matthay, M.A.: Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. *J. Clin. Invest.*, 88: 864-875 (1991).
93. Wilkie, B.N.: Respiratory tract immune response to microbial pathogens. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 181: 1074-1079 (1982).
94. Wilkie, B.N., Markham, R.J.F. and Shewen, P.E.: Response of calves to lung challenge exposure with *Pasteurella haemolytica* after parenteral or pulmonary immunization. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 1773-1778 (1980).
95. Wolff, S.M. : Monoclonal antibodies and the treatment of gram-negative bacteremia and shock. *New Engl. J. Med.*, 324: 486-487 (1991).
-
96. Woolcock, J.B.: The biology of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. In: *Pasteurellosis in Production Animals*. Edited by: Patten, B.E., Spencer, T.L., Johnson, R.B., Hoffmann, D., Lehane, L. 25-34. *The Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Proceedings No. 43, Canberra, Australia, 1993.*
97. Yoshizawa, Y., Tanoue, M., Yano, H., Sato, T., Ohtsuka, M., Hasegawa, S. and Kimura, Y. : Sequential changes in lung injury induced by preformed immune complexes. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 61: 376-386 (1991).



APENDICE A

PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EXPERIMENTO 1

Total de Células

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
ΣY	11,300	13,400	15,500	10,500	10,900
ΣY^2	706.25	957.14	968.75	656.25	778.57
ΣX^2	288.60	224.34	532.56	189.62	361.99
ΣX^2	9'230,000	13'480,000	19'270,000	7'430,000	10'190,000
n	16	14	16	16	14

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	4	1'270,596.81	317,649.20	2.68*	$\alpha 0.05$ > 2.53
Error	71	8'400,982.14	118,323.69		
Total	75	9'671,578.95			

Comparación de las Medias por el Procedimiento de Scheffé

Modelo $Ss\bar{y}_i - \bar{y}_i = \sqrt{f_{ft} F_{\alpha}(0.05, 4/60 \text{ gl}) s^2 \bar{y}_i - \bar{y}_i}$

Grupo 3	-	Grupo 4
968.75		656.25 = 312.5 < 386.88

 Grupo 4 Grupo 1 Grupo 5 Grupo 2 Grupo 3

No se reconocen diferencias entre las medias; la diferencia detectada en el análisis de varianza, resulta débil cuando se comparan las medias mediante el procedimiento de Scheffé.

Macrófagos Alveolares

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
ΣY	9,305	8,362	8,208	7,019	7,727
ΣY^2	581.56	597.28	513	438.68	551.92
ΣX^2	212.20	249.64	257.71	139.76	230.93
ΣX^2	6'086,903	5'804,670	5'206,982	3'372,181	4'958,035
n	16	14	16	16	14

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	4	249,155.82	62,288.95	1.27	α 0.05 < 2.04
Error	71	3'468,225.17	48,848.24		
Total	75	3'717,380.99			

Polimorfonucleares

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Σ	1,779	4,957	6,665	3,013	2,701
\bar{y}	111.18	354.07	416.56	188.31	192.92
s	96.20	211.64	290.24	178.01	146.46
Σx^2	336,639	2'337,473	4'039,981	1'042,725	799,957
n	16	14	16	16	14

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	4	1'010,135.31	252,533.82	6.5**	α 0.005 > 4.14
Error	71	2'738,965.68	38,576.98		
Total	75	3'749,100.99			

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Comparación de las Medias por el Procedimiento de Scheffé [®]

Modelo $Ss\bar{y}_i - \bar{y}_i = \sqrt{ft F_{\alpha} (0.05, 4/60 \text{ gl}) s^2 \bar{y}_i - \bar{y}_i}$

Grupo 3	-	Grupo 1	
416.56	-	111.18	= 305.38 > 220.90
Grupo 3	-	Grupo 4	
416.56	-	188.31	= 228.25 > 220.90
Grupo 3	-	Grupo 5	
416.56	-	192.92	= 223.64 < 228.66
Grupo 2	-	Grupo 1	
354.07	-	111.18	= 235.89 > 228.66
Grupo 2	-	Grupo 4	
354.07	-	188.31	= 165.76 < 228.66

Grupo 1 Grupo 4 Grupo 5 Grupo 2 Grupo 3

El grupo 3 es realmente diferente de los grupos 4 y 1, pero no lo es de los grupos 2 y 5; a su vez el grupo 2 es semejante a los grupos 4 y 5, los cuales no son diferentes del 1.

Linfocitos

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Σ	68	20	216	178	155
\bar{y}	4.25	1.42	13.50	11.12	11.07
s	5.73	3.63	13.21	6.33	7.64
Σx^2	782	200	5536	2582	2475
n	16	14	16	16	14

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	4	953.83	238.45	3.64*	α 0.025
Error	71	4,645.11	65.42		> 3.01
Total	75	5,598.94			

Comparación de las Medias por el Procedimiento de Scheffé

Modelo $Ss\bar{y}_i - \bar{y}_i = \sqrt{ft F_{\alpha} (0.05, 4/60 \text{ gl}) s^2 \bar{y}_i - \bar{y}_i}$

Grupo 3	-	Grupo 2	13.50 - 1.42 = 12.08 > 9.41
Grupo 3	-	Grupo 1	13.50 - 4.25 = 9.25 > 9.09
Grupo 3	-	Grupo 5	13.50 - 11.07 = 2.43 < 9.41
Grupo 4	-	Grupo 2	11.12 - 1.42 = 9.70 > 9.41
Grupo 4	-	Grupo 1	11.12 - 4.25 = 6.87 < 9.09

Grupo 2 Grupo 1 Grupo 5 Grupo 4 Grupo 3

El Grupo 3 es diferente de los grupos 1 y 2, pero no de los grupos 5 y 4. A su vez los grupos 4 y 5 comparten similitud con el grupo 1. Finalmente, el grupo 2 es semejante a los grupos 1 y 5.

Monocitos

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Σ	210	135	528	347	410
\bar{y}	13.12	9.64	33	21.68	29.28
s	10.65	5.98	22.12	11.62	16.45
Σx^2	4,458	1,767	24,766	9,553	15,528
n	16	14	16	16	14

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	4	6,055.52	1,513.88	7.13**	α 0.005 > 4.14
Error	71	15,057.27	212.07		
Total	75	21,112.79			

Comparación de las medias por el Procedimiento de Scheffé

Modelo $Ss\bar{y}_i - \bar{y}_i = \sqrt{ft F_{\alpha} (0.05, 4/60 \text{ gl}) s^2 \bar{y}_i - \bar{y}_i}$

Grupo 3	Grupo 2	
33	9.64	= 23.36 > 16.95
Grupo 3	Grupo 1	
33	13.12	= 19.88 > 16.37
Grupo 3	Grupo 4	
33	21.68	= 11.32 < 16.37
Grupo 5	Grupo 2	
29.28	9.64	= 19.64 > 17.50
Grupo 5	Grupo 1	
29.28	13.12	= 16.16 < 16.95

Grupo 2 Grupo 1 Grupo 4 Grupo 5 Grupo 3

El grupo 3 es diferente de los grupos 2 y 1, pero no lo es de los grupos 4 y 5; a su vez estos grupos no son diferentes del grupo 1 y el grupo 2 es similar a los grupos 1 y 4.

Proteína

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Σ	4.17	6.77	6.69	4.88	3.67
\bar{y}	0.52	0.84	0.83	0.61	0.45
s	0.27	0.77	0.59	0.65	0.29
Σx^2	2.70	9.94	8.05	5.93	2.28
n	8	8	8	8	8

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	4	1.02	0.25	0.83	α 0.1
Error	35	10.75	0.30		2.09
Total	39	11.77			

Deshidrogenasa Láctica

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Σ	0	86	221	197	128
\bar{y}	0	10.75	27.62	24.62	16
s	0	20.61	42.08	38.57	21.81
Σx^2	0	3,898	18,501	15,267	5,380
n	8	8	8	8	8

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	4	3,943.14	985.78	1.18	α 0.1
Error	35	29,117.26	831.92		2.09
Total	39	33,060.40			

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EXPERIMENTO 2

Total de Células

	Grupo 1	Grupo 2
Σ	5,900	6,400
\bar{y}	983.33	1,066.66
s	98.31	103.27
Σx^2	5'850,000	6'880,000
n	6	6

Se procedió a mancomunar las varianzas mediante el procedimiento siguiente:

$$Sp^2 = (n1-1) S1^2 + (n2-1) S2^2 / n1 + n2 - 2$$

$$Sp^2 = 10,164.77$$

El estadístico de prueba fue:

$$t = (\bar{x}1 - \bar{x}2) - (\mu1 - \mu2) / \sqrt{Sp^2 / n1 + Sp^2 / n2}$$

$$t = -1.43$$

La regla de decisión fue:

$$t \alpha 0.05, 6 + 6 - 2 \text{ gl} = 2.22$$

$$-2.22 < -1.43 < 2.22$$

Se acepta la hipótesis nula; no hay diferencia en lo concerniente a células totales entre los dos grupos.

Macrófagos Alveolares

	Grupo 1	Grupo 2
Σ	1,609	3,344
\bar{y}	268.16	557.33
s	72.15	123.74
Σx^2	457,511	1'940,288
n	6	6

Se procedió a mancomunar las varianzas mediante el procedimiento siguiente:

$$Sp^2 = (n1-1) S1^2 + (n2-1) S2^2 / n1 + n2 - 2$$

$$Sp^2 = 10,258.60$$

El estadístico de prueba fue:

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2) / \sqrt{Sp^2 / n_1 + Sp^2 / n_2}$$

$$t = - 4.94$$

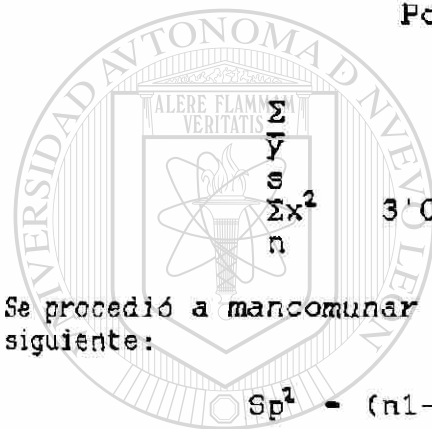
La regla de decisión fue:

$$t \alpha 0.05, 6 + 6 - 2 \text{ gl} = 2.22$$

$$- 4.94 > - 2.22$$

Se rechaza la hipótesis nula; existe diferencia significativa en lo concerniente a macrófagos alveolares entre los dos grupos. En este caso el grupo 2 es mayor que el grupo 1.

Polimorfonucleares



	Grupo 1	Grupo 2
Σ	4,195	2,956
\bar{y}	699.16	492.66
s	168.42	126.62
Σx^2	3'074.841	1'536.488
n	6	6

Se procedió a mancomunar las varianzas mediante el procedimiento siguiente:

$$Sp^2 = (n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2 / n_1 + n_2 - 2$$

$$Sp^2 = 22,198.95$$

El estadístico de prueba fue:

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2) / \sqrt{Sp^2 / n_1 + Sp^2 / n_2}$$

$$t = 2.40$$

La regla de decisión fue:

$$t \alpha 0.05, 6 + 6 - 2 \text{ gl} = 2.22$$

$$2.40 > 2.22$$

Se rechaza la hipótesis nula; existe diferencia significativa en lo concerniente a polimorfonucleares entre los dos grupos. En este caso el grupo 1 es mayor que el grupo 2.

Proteína

	Grupo 1	Grupo 2
Σ	4.60	2.19
\bar{y}	1.53	0.73
s	0.95	0.41
Σx^2	8.85	1.94
n	3	3

Se procedió a mancomunar las varianzas mediante el procedimiento siguiente:

$$Sp^2 = (n1-1) S1^2 + (n2-1) S2^2 / n1 + n2 - 2$$

$$Sp^2 = 0.53$$

El estadístico de prueba fue:

$$t = (\bar{x}1 - \bar{x}2) - (\mu1 - \mu2) / \sqrt{Sp^2 / n1 + Sp^2 / n2}$$

$$t = 1.35$$

La regla de decisión fue:

$$t \alpha 0.05, 3 + 3 - 2 \text{ gl} = 2.77$$

$$- 2.77 < 1.35 < 2.77$$

Se acepta la hipótesis nula; no hay diferencia en lo concerniente a proteína entre los dos grupos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Deshidrogenasa Láctica

	Grupo 1	Grupo 2
Σ	104	27
\bar{y}	34.66	9
s	33.56	10.14
Σx^2	5,858	449
n	3	3

Se procedió a mancomunar las varianzas mediante el procedimiento siguiente:

$$Sp^2 = (n1-1) S1^2 + (n2-1) S2^2 / n1 + n2 - 2$$

$$Sp^2 = 614.54$$

El estadístico de prueba fue:

$$t = (\bar{x}1 - \bar{x}2) - (\mu1 - \mu2) / \sqrt{Sp^2 / n1 + Sp^2 / n2}$$

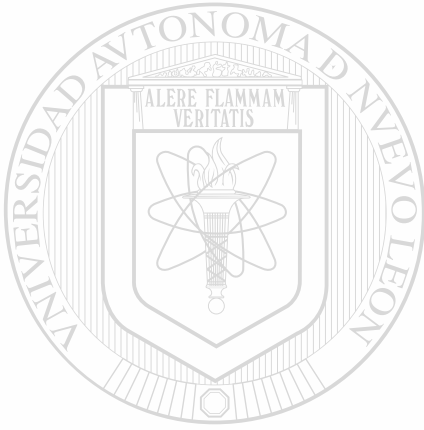
$$t = 1.26$$

La regla de decisión fue:

$$t \alpha 0.05, 3 + 3 - 2 \text{ gl} = 2.77$$

$$- 2.77 < 1.26 < 2.77$$

Se acepta la hipótesis nula; no hay diferencia en lo concerniente a deshidrogenasa láctica entre los grupos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EXPERIMENTO 3

Total de Células

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1a	Grupo 2a	Grupo 3a
Σ	9,700	5,600	7,000	15,300	7,600	7,500
\bar{y}	970	560	700	1,530	760	750
s	533.43	96.60	402.76	794.49	271.62	84.98
Σx^2	11'970,000	3'220,000	6'360,000	29'090,000	6'440,000	5'590,000
n	10	10	10	10	10	10

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	5	5'966,833.33	1'193,366.66	6.12**	α 0.005 > 3.76
Error	54	10'515,000.00	194,722.22		
Total	59	16'481,833.33			

C	Contrastes					
	Grupo 1 9,700	Grupo 2 5,600	Grupo 3 7,000	Grupo 1a 15,300	Grupo 2a 7,600	Grupo 3a 7,500
1	1	1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	0	1	-1	0
3	1	0	-1	1	0	-1
4	0	1	-1	0	1	-1
5	1	0	0	-1	0	0

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

C	Contrastes (continuación)					
	$\Sigma c_i y_i$	$Q = r \Sigma c_i^2$	$SS(Q) = Q / r \Sigma c_i^2$	$SS(Q) / s^2$	F	Ft
1	-8100	10(6)	1'093,500	1'093,500/CME	5.61* >	1/10 gl α 0.05 4.96
2	11,800	10(4)	3'481,000	3'481,000/CME	17.87** >	α 0.005 12.83
3	10,500	10(4)	2'756,250	2'756,250/CME	14.15** >	α 0.005 12.83
4	-1,300	10(4)	42,250	42,250/CME	0.21 <	α 0.1 3.29
5	-5,600	10(2)	1'568,000	1'568,000/CME	8.05** >	α 0.025 6.94

El contraste 1 para comparar el efecto de la inmunización pasiva en los tres grupos contra los otros tres que no fueron inmunizados, demostró que los primeros tuvieron valores mayores;

sin embargo, las diferencias más significativas se reconocieron en los contrastes 2 y 3 en donde se demuestra que la inoculación endotraqueal (sin importar que los animales fueran o no inmunizados) es más flogística. En cambio, en el contraste 4 no se demuestra diferencia entre la inoculación endovenosa y la endotraqueal, seguida de la endovenosa (reacción de Shwartzman). Finalmente, el contraste 5 demuestra que la inoculación endotraqueal, puede exacerbarse significativamente cuando los animales han recibido la inmunización pasiva.

Macrófagos Alveolares

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1a	Grupo 2a	Grupo 3a
Σ	5,136	4,072	4,730	7,054	6,538	5,936
\bar{y}	513.60	407.20	473.00	705.40	653.80	593.60
s	256.96	163.17	218.82	220.30	229.56	74.60
Σx^2	3'232,112	1'897,752	2'668,246	5'412,708	4'748,838	3'573,702
n	10	10	10	10	10	10

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	5	607,618.33	121,523.66	2.94*	α 0.05
Error	54	2'226,054.40	41,223.22		> 2.37
Total	59	2'833,672.73			

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Contrastes

	Grupo 1 5,136	Grupo 2 4,072	Grupo 3 4,730	Grupo 1a 7,054	Grupo 2a 6,538	Grupo 3a 5,936
C						
1	1	1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	0	1	-1	0
3	1	0	-1	1	0	-1
4	0	1	-1	0	1	-1
5	1	0	0	-1	0	0

Contrastes (continuación)

C	Q = $\sum c_i y_i$	$r \sum c_i^2$	Q	$SS(Q) = \frac{Q^2}{r \sum c_i^2}$	$SS(Q) / s^2$	F	Ft
1	-5590	10(6)	520,801.66	520,801.66/CME	12.63**	1/10 gl α 0.01 > 10.04	
2	1580	10(4)	62,410.00	62,410.00/CME	1.50	α 0.10 < 3.29	
3	1524	10(4)	58,064.40	58,064.40/CME	1.40	α 0.10 < 3.29	
4	-56	10(4)	78.40	78.40/CME	0.00	α 0.10 < 3.29	
5	-1918	10(2)	183,936.20	183,936.20/CME	4.46	α 0.05 < 4.96	

El contraste 1 para comparar el efecto de la inmunización pasiva en los tres grupos contra los otros tres que no fueron inmunizados, fue el único que demostró diferencias. En este caso, los animales inmunizados aportaron valores mayores que los no inmunizados.

Polimorfonucleares

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1a	Grupo 2a	Grupo 3a
Σ	4,103	1,237	1,996	6,888	713	1,273
\bar{y}	410.30	123.70	199.60	688.80	71.30	127.30
s	296.17	138.80	173.49	561.92	38.78	49.72
Σx^2	2'472,961	326,413	669,296	7'586,310	64,377	184,303
n	10	10	10	10	10	10

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	5	2'796,611.94	559,322.38	7.34**	α 0.005 > 3.76
Error	54	4'111,436.39	76,137.71		
Total	59	6'908,048.33			

C	Contrastes					
	Grupo 1 4,103	Grupo 2 1,237	Grupo 3 1,996	Grupo 1a 6,888	Grupo 2a 713	Grupo 3a 1,273
1	1	1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	0	1	-1	0
3	1	0	-1	1	0	-1
4	0	1	-1	0	1	-1
5	1	0	0	-1	0	0

Contrastes (continuación)

C	Q= $\sum c_i y_i$	$r \sum c_i^2$	SS(Q)= $Q^2 / r \sum c_i^2$	SS(Q)/s ²	F	Ft 1/10 gl α 0.10 α 0.005
1	-1,538	10(6)	39,424.06	39,424.06/CME	0.51	< 3.29 α 0.005
2	9,041	10(4)	2'043,492.02	2'043,492.02/CME	26.83**	> 12.83 α 0.005
3	7,722	10(4)	1'490,732.10	1'490,732.10/CME	19.57**	> 12.83 α 0.10
4	-1319	10(4)	43,494.02	43,494.02/CME	0.57	< 3.29 α 0.05
5	-2,785	10(2)	387,811.25	387,811.25/CME	5.09*	> 4.96

En este caso no existe diferencia entre los grupos inmunizados y los no inmunizados (contraste 1); las diferencias se presentan cuando se compara la ruta de inoculación endotraqueal contra la endovenosa y contra la endotraqueal seguida de la endovenosa (reacción de Shwartzman) en los contrastes 2 y 3, respectivamente, sin importar si los animales fueron o no inmunizados. En cambio, no hay diferencia cuando se compara la inoculación endovenosa contra la endotraqueal seguida de la endovenosa (contraste 4). Finalmente, la inoculación endotraqueal es capaz de exacerbarse cuando previamente se inmuniza a los animales (contraste 5).

Linfocitos

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1a	Grupo 2a	Grupo 3a
\sum	172	92	77	445	125	105
\bar{y}	17.20	9.20	7.70	44.50	12.50	10.50
s^2	14.71	5.45	6.23	31.02	35.61	6.41
$\sum x^2$	4,906	1,114	943	28,463	1,883	1,473
n	10	10	10	10	10	10

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	5	8,644.94	1,728.98	7.83**	α 0.005 > 3.76
Error	54	11,916.79	220.68		
Total	59	20,561.73			

C	Contrastes					
	Grupo 1 172	Grupo 2 92	Grupo 3 77	Grupo 1a 445	Grupo 2a 125	Grupo 3a 105
1	1	1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	0	1	-1	0
3	1	0	-1	1	0	-1
4	0	1	-1	0	1	-1
5	1	0	0	-1	0	0

Contrastes (continuación)

C	Q = $\sum c_i y_i$	r $\sum c_i^2$	SS(Q) = Q^2 / r	SS(Q) / s ²	F	Ft
1	-334	10(6)	1,859.26	1,859.26/CME	8.42**	1/10 gl α 0.025 > 6.94 α 0.005
2	400	10(4)	4,000.00	4,000.00/CME	18.12**	> 12.83 α 0.005
3	435	10(4)	4,730.62	4,730.62/CME	21.43**	> 12.83 α 0.10
4	35	10(4)	30.62	30.62/CME	0.13	< 3.29 α 0.005
5	-273	10(2)	3,726.45	3,726.45/CME	16.88**	> 12.83

El contraste 1 para comparar el efecto de la inmunización pasiva en los tres grupos contra los otros tres que no fueron inmunizados demostró alta significancia. Lo mismo sucedió en los contrastes 2 y 3 en donde se comparó la ruta de administración endotraqueal del LPS contra la ruta endovenosa y endotraqueal seguida de la endovenosa (reacción de Shwartzman), en donde se demostró que la ruta endotraqueal es la más intensa (sin importar que los animales fueran o no inmunizados). En cambio, el contraste 4 no demostró diferencias entre la ruta endovenosa y la endotraqueal seguida de la endovenosa. Finalmente, en el contraste 5 se confirma que la ruta endotraqueal puede generar una respuesta mayor cuando los animales han sido previamente inmunizados.

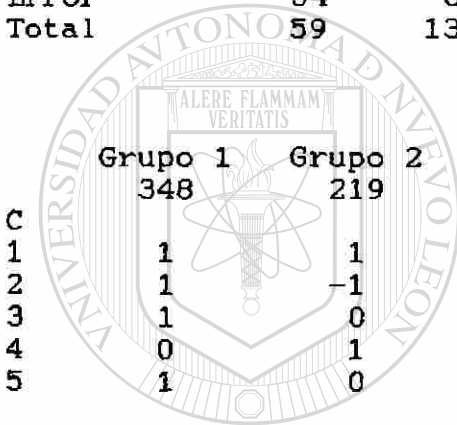
Monocitos

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1a	Grupo 2a	Grupo 3a
Σ	348	219	233	1,068	311	223
\bar{y}	34.80	21.90	23.30	106.80	31.10	22.30
s	17.71	8.41	14.84	86.98	26.54	12.22
Σx^2	14,936	5,433	7,411	182,160	16,013	6,317
n	10	10	10	10	10	10

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	5	54,882.74	10,976.54	7.29**	α 0.005 > 3.76
Error	54	81,227.20	1,504.20		
Total	59	136,109.94			



Contrastes

	Grupo 1 348	Grupo 2 219	Grupo 3 233	Grupo 1a 1068	Grupo 2a 311	Grupo 3a 223
C						
1	1	1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	0	1	-1	0
3	1	0	-1	1	0	-1
4	0	1	-1	0	1	-1
5	1	0	0	-1	0	0

Contrastes (continuación)

	Q = $\Sigma c_i y_i$	r Σc_i^2	SS(Q) = Q^2 / r	SS(Q) / s ²	F	Ft
C						1/10 gl α 0.025
1	-802	10(6)	10,720.06	10,720.06/CME	7.12**	> 6.94 α 0.005
2	886	10(4)	19,624.90	10,624.90/CME	13.04**	> 12.83 α 0.005
3	960	10(4)	23,040.00	23,040.00/CME	15.31**	> 12.83 α 0.10
4	74	10(4)	136.90	136.90/CME	0.09	< 3.29 α 0.005
5	-720	10(2)	25,920.00	25,920.00/CME	17.23**	> 12.83

En este caso los valores de significancia encontrados en los contrastes fueron similares a la comparación anterior.

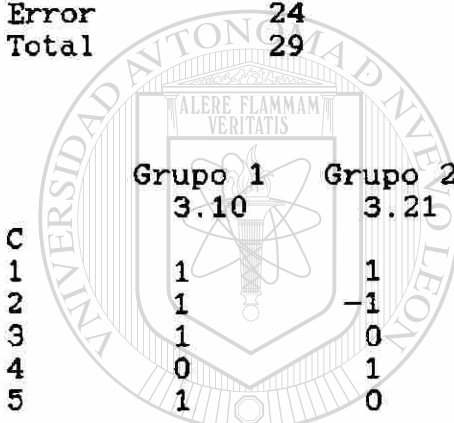
Proteína

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1a	Grupo 2a	Grupo 3a
Σ	3.10	3.21	2.16	9.40	5.20	1.97
\bar{Y}	0.62	0.64	0.43	1.88	1.04	0.39
s	0.42	0.84	0.26	0.88	0.79	0.41
Σx^2	2.64	4.92	1.20	20.77	7.91	1.45
n	5	5	5	5	5	5

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	5	7.87	1.57	3.73**	α 0.025 > 3.15
Error	24	10.12	0.42		
Total	29	17.99			



Contrastes

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1a	Grupo 2a	Grupo 3a
	3.10	3.21	2.16	9.40	5.20	1.97
C						
1	1	1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	0	1	-1	0
3	1	0	-1	1	0	-1
4	0	1	-1	0	1	-1
5	1	0	0	-1	0	0

Contrastes (continuación)

	$Q = \Sigma c_i y_i$	$r \Sigma c_i^2$	$SS(Q) = Q^2 / r \Sigma c_i^2$	$SS(Q) / s^2$	F	Ft
						1/5 gl α 0.05
C						α 0.10
1	-8.10	5(6)	2.18	2.18/CME	5.20	< 6.61
2	4.09	5(4)	0.83	0.83/CME	1.99	< 4.06
3	8.37	5(4)	3.50	3.50/CME	8.34*	> 6.61
4	4.28	5(4)	0.91	0.91/CME	2.18	< 4.06
5	6.30	5(2)	3.96	3.96/CME	9.45*	> 6.61

En este caso, sólo los contrastes 3 y 5 demostraron significancia; en el primero se demostró una respuesta mayor de la inoculación endotraqueal en comparación de la endotraqueal seguida de la endovenosa (reacción de Shwartzman), sin importar que los animales fueran o no inmunizados y en el segundo se constató que la inoculación endotraqueal puede exacerbarse cuando los animales han sido previamente inmunizados.

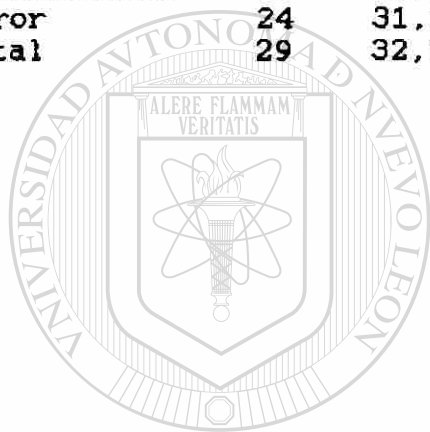
Deshidrogenasa Láctica

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1a	Grupo 2a	Grupo 3a
Σ	48	70	115	359	89	123
\bar{y}	9.60	14.00	23.00	71.80	17.80	24.60
s	13.16	24.68	25.32	43.21	17.52	37.75
Σx^2	1,154	3,418	5,211	33,247	2,813	8,729
n	5	5	5	5	5	5

Modelo $Y = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	5	1,212.10	242.42	0.18	α 0.10
Error	24	31,008.70	1,292.02		< 4.06
Total	29	32,220.80			



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EXPERIMENTO 4

Total de Células

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Σ	17,600	26,150	23,000	34,800
\bar{y}	1,100.00	1,634.37	1,437.50	2,175.00
s	294.39	601.86	492.44	556.77
Σx^2	20'660,000	48'172,500	36'700,000	80'340,000
n	16	16	16	16

Modelo $Y = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft $\alpha 0.005$
Tratamientos	3	9'720,117.20	3'240,039.06	12.94**	4.73
Error	60	15'021,093.70	250,351.56		
Total	63	24'741,210.90			

Comparación de las medias Empleando el Procedimiento de Scheffé

Modelo $Ss\bar{y}_i - \bar{y}_i.' = \sqrt{ft F_{\alpha}(0.05, 3/60) s^2 \bar{y}_i - \bar{y}_i.'}$

Grupo 4	-	Grupo 1	=	1,075.00	>	509.03
2,175.00		1,100.00				
Grupo 4	-	Grupo 3	=	737.50	>	509.03
2,175.00		1,437.50				
Grupo 4	-	Grupo 2	=	540.63	>	509.03
2,175.00		1,634.37				
Grupo 2	-	Grupo 1	=	534.37	>	509.03
1,634.37		1,100.00				
Grupo 2	-	Grupo 3	=	196.87	<	509.03
1,634.37		1,437.50				
Grupo 3	-	Grupo 1	=	337.50	<	509.03
1,437.50		1,100.00				

Grupo 1
Grupo 3
Grupo 2
Grupo 4

El grupo 4 es realmente diferente a todos los demás. El grupo 2 y el 3 no son diferentes, mientras que el 1 y el 3 tampoco lo son.

Macrófagos Alveolares

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Σ	12,101	12,962	10,689	14,141
\bar{y}	756.31	810.12	668.06	883.81
s	239.15	339.78	168.97	380.90
Σx^2	10'010,083	12'232,598	7'569,197	14'674,329
n	16	16	16	16

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft α 0.10
Tratamientos	3	346,506.05	115,502.01	1.33	< 2.18
Error	60	5'194,316.56	86,571.94		
Total	63	5'540,822.61			

Polimorfonucleares

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Σ	4,979	12,701	11,115	20,102
\bar{y}	311.18	793.81	694.68	1,256.37
s	161.44	505.93	371.08	649.00
Σx^2	1'940,357	13'921,833	9'786,973	31'573,680
n	16	16	16	16

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de variación	gl	SC	CM	F	Ft α 0.005
Tratamientos	3	7'250,644.92	2'416,881.64	11.49**	> 4.73
Error	60	12'614,126.06	210,235.43		
Totales	63	19'864,770.98			

Comparación de las medias Empleando el Procedimiento de Scheffé

Modelo $Ss\bar{y}_i - \bar{y}_i = \sqrt{ft F\alpha (0.05, 3/60 \text{ gl}) s^2 \bar{y}_i - \bar{y}_i}$

Grupo 4	-	Grupo 1	
1,256.37	-	311.18	= 945.19 > 466.46
Grupo 4	-	Grupo 3	
1,256.37	-	694.68	= 561.69 > 466.46
Grupo 4	-	Grupo 2	
1,256.37	-	793.81	= 462.56 < 466.46

Grupo 2	-	Grupo 1	
793.81	-	311.18	= 482.63 > 466.46
Grupo 2	-	Grupo 3	
793.81	-	694.68	= 99.13 < 466.46
Grupo 3	-	Grupo 1	
694.68	-	311.18	= 383.50 < 466.46

Grupo 1	Grupo 3	Grupo 2	Grupo 4

El grupo 4 es diferente de los grupos 3 y 1, pero no lo es del grupo 2; a su vez el grupo 2 es diferente del grupo 1 pero no del 3; los grupos 3 y 1 no son diferentes.

Linfocitos

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Σ	98	136	300	136
\bar{y}	6.12	8.50	18.75	8.50
s	4.70	6.87	14.87	12.52
Σx^2	932	1,864	8,942	3,508
n	16	16	16	16

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F	Ft
					$\alpha 0.01$
Tratamientos	3	1,523.19	507.73	4.54**	> 4.13
Error	60	6,708.75	111.81		
Total	63	8,231.94			

Comparación de las Medias Empleando el Procedimiento de Scheffé

Modelo $Ss\bar{y}_i - \bar{y}_i \cdot \sqrt{ft F_{\alpha} (0.05, 3/60 \text{ gl}) s^2 \bar{y}_i - \bar{y}_i \cdot}$

Grupo 3	-	Grupo 1	
18.75	-	6.12	= 12.63 > 10.75
Grupo 3	-	Grupo 2	
18.75	-	8.50	= 10.25 < 10.75
Grupo 3	-	Grupo 4	
18.75	-	8.50	= 10.25 < 10.75
Grupo 4	-	Grupo 1	
8.50	-	6.12	= 2.38 < 10.75

Grupo 1 Grupo 2 Grupo 4 Grupo 3

El grupo 3 es diferente del grupo 1, pero no lo es de los grupos 2 y 4; a su vez el grupo 1 es similar a los grupos 2 y 4.

Monocitos

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Σ	432	359	901	427
\bar{y}	27.00	22.43	56.31	26.68
s	16.17	19.62	15.87	22.39
Σx^2	15,588	13,831	54,517	18,919
n	16	16	16	16

Modelo $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

ANDEVA

Fuente de Variación

	gl	SC	CM	F	Ft
Tratamientos	3	11,693.42	3,897.80	11.13**	$\alpha 0.005 > 4.73$
Error	60	21,002.82	350.04		
Total	63	32,696.24			

Comparación de las Medias Empleando el Procedimiento de Scheffé

Modelo $S_s \bar{y}_i - \bar{y}_i = \sqrt{f_t F_\alpha (0.05, 3/60, gl)} s^2 \bar{y}_i - \bar{y}_i$

Grupo 3	-	Grupo 2	56.31 - 22.43 = 33.88 > 19.03
Grupo 3	-	Grupo 4	56.31 - 26.68 = 29.63 > 19.03
Grupo 3	-	Grupo 1	56.31 - 27.00 = 29.31 > 19.03
Grupo 1	-	Grupo 2	27.00 - 22.43 = 4.57 < 19.03

Grupo 2 Grupo 4 Grupo 1 Grupo 3

En este caso el único grupo diferente es el 3



APENDICE B

EL COMPLEJO RESPIRATORIO DE LOS BOVINOS

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EL COMPLEJO RESPIRATORIO DE LOS BOVINOS

Introducción

Las neumonías constituyen uno de los principales problemas de salud en los bovinos. Entre las pérdidas que ocasionan se incluyen la muerte de los animales enfermos, los elevados costos de los tratamientos, el bajo rendimiento de los animales con secuelas, decomisos en el rastro, y, además, el costo derivado de la aplicación de biológicos y otros fármacos para controlar estas enfermedades.

En los Estados Unidos de Norteamérica se estima que la Pasteurelisis Neumónica (PN) o más propiamente dicho, el Complejo Respiratorio Bovino (CRB), ocasiona pérdidas anuales por 800 millones de dls.; en otros países como Canadá y España, las pérdidas atribuidas al CRB se incluyen también entre las más relevantes. En México, a pesar de que no existen aún evaluaciones al respecto, las pérdidas se estiman igualmente considerables.

El presente escrito tiene como objetivo la presentación de los puntos más relevantes de la patogenia, diagnóstico y control del CRB.

Antecedentes

El CRB es un padecimiento neumónico en el que intervienen varios agentes infecciosos (multi-etiológico), favorecido por diversos factores (multifactorial) que provocan estrés en el animal. Es pertinente mencionar que los términos Fiebre de Embarque y Pasteurelisis Neumónica ya no son tan apropiados, puesto que el transporte no constituye el único factor predisponente ni las bacterias del género *Pasteurella* son los únicos microorganismos involucrados. Por otra parte, el concepto Síndrome Respiratorio Bovino resulta adecuado para referirse al conjunto de manifestaciones clínicas derivadas del CRB. En cambio, se excluyen del CRB a todos aquellos padecimientos confinados al tracto respiratorio superior, tales como el Granuloma Nasal y la Laringotraqueitis Necrótica del Ternero. Asimismo, otros padecimientos neumónicos del ganado que ocurren esporádicamente, como la Neumonía Embólica por Trombosis de la Vena Cava, las Neumonías Granulomatosas por *Mycobacterium sp.* o por *Coccidioides immitis* y la Neumonía Verminosa por *Dictyocaulus sp.*, no se consideran dentro del CRB. De igual manera, tampoco se incluyen aquí a los numerosos padecimientos neumónicos agrupados dentro de las Neumonías Intersticiales Atípicas. Por lo tanto, a pesar de que el concepto CRB es amplio, éste se limita a los padecimientos neumónicos exudativos de índole bacteriano, luego que se han alterado los mecanismos de defensa del pulmón, por condiciones estresantes y/o infecciones virales.

El Concepto Multifactorial

Con relación al concepto multifactorial del CRB, se ha mencionado que los factores propios de la alta tecnificación en la producción intensiva de bovinos de carne, constituyen de por sí condiciones favorables para la presentación del CRB. En efecto, el transporte prolongado, el hacinamiento, la mezcla en el corral de animales de diferentes edades y, en general, cualquier otra condición que impida drásticamente el patrón de comportamiento normal en los animales, propiciará las condiciones de estrés; inclusive, procedimientos de manejo convencionales en el corral de engorda, como la castración y el descornado, han demostrado ser suficientemente estresantes. El estado de estrés implica la instauración de una reacción neuroendócrina que conlleva la liberación de esteroides de la corteza adrenal. Cuando el estímulo que provoca esta reacción se prolonga, la liberación de esteroides endógenos, principalmente cortisol, disminuirá la capacidad del animal para establecer una respuesta inmune adecuada. Si a estas condiciones estresantes se le añade una higiene deficiente y una elevada humedad relativa (>80%), existe una mayor posibilidad de que se presenten enfermedades respiratorias, debido al alto grado de contaminación y a la mayor supervivencia de los microorganismos en el medio.

Otra situación de gran relevancia es la nutrición de los animales. Recientemente, se ha demostrado que las deficiencias de vitaminas y minerales traza, influyen desfavorablemente en la capacidad de respuesta

immune; si bien, no se ha determinado con exactitud la manera en que esto ocurre. Por último, cuando los animales ingieren alimentos contaminados con micotoxinas, particularmente aflatoxinas y toxina T₂, puede deprimirse también su capacidad inmunitaria; de esta forma, estas micotoxicosis no acontecerían de manera clínica evidente, sino favoreciendo la presentación de otros padecimientos relacionados con la inmunodepresión (micotoxicosis secundaria), entre los que se incluiría a las neumonías.

El Concepto Multi-etiológico

Como ya se ha mencionado, para la presentación del CRB se amerita de factores predisponentes y de una interacción de los agentes infecciosos. Estos agentes infecciosos pueden ser diferenciados en primarios y secundarios; es decir, en aquellos que intervienen originalmente y en los que ocurren luego como oportunistas, después de que se ha desarrollado la infección inicial. Las investigaciones al respecto, han demostrado que los virus pueden ser considerados como agentes primarios, mientras que las bacterias como secundarios. En el cuadro 1 se presenta una relación de los agentes infecciosos considerados de mayor relevancia en el CRB.

Cuadro 1

 PRINCIPALES AGENTES INFECCIOSOS ASOCIADOS CON EL CRB

Virus	Bacterias
Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)*	<i>Pasteurella haemolytica</i> (A1)*
Parainfluenza 3 (PI3)*	<i>Pasteurella multocida</i> A*
Diarrea Viral Bovina (BVD)*	<i>Haemophilus somnus</i> *
Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV) ^	
Adenovirus Bovino ^	

* Aislados en México.

^ Demostrada su presencia mediante estudios serológicos.

Otros virus tales como Rhinovirus, Enterovirus y Reovirus, se estiman de menor importancia en el CRB; por otra parte, aunque el virus de la Fiebre Catarral Maligna también afecta el tracto respiratorio de los bovinos, provoca una patología tan particular y severa, que su inclusión en el CRB, quizá no se justifique.

En lo que concierne a las bacterias que participan en el CRB, es menester señalar que otras, como *Corynebacterium pyogenes*, *Streptococcus sp.*, pueden también intervenir, pero su participación es eventual. Otra situación

deriva de las infecciones por *Mycoplasma* (*M. bovis*, *M. dispar*) y *Chlamydia psittaci*, puesto que las neumonías que provocan son de tipo proliferativo (linfoproliferativo) y no exudativo (exudativo intersticial y bronconeumonía), como ocurre en las lesiones neumónicas que caracterizan al CRB, a menos que luego se compliquen estos procesos neumónicos iniciales con las bacterias de mayor importancia en el Complejo. El término Neumonía Euzoótica se emplea para referirse a estas neumonías, las cuales ocurren mayormente en becerros mantenidos en hacinamiento en lugares encerrados y con mala ventilación.

Interacción Virus-Bacteria

Las bacterias involucradas en el CRB, pueden ser recuperadas de la mucosa nasal y faríngea de bovinos sanos; sin embargo, estas mismas bacterias pueden colonizar el tracto respiratorio inferior, particularmente bronquiolos y alvéolos, bajo ciertas condiciones que disminuyen la capacidad de defensa. Estas condiciones adversas pueden ser algún factor estresante, una ligera infección respiratoria viral o ambos.

En los bovinos normales, lo mismo que en otros animales domésticos y de laboratorio, la remoción bacteriana pulmonar es prácticamente total a las 8 horas posteriores a un desafío masivo por aerosol. Por ejemplo, becerros desafiados con aerosol de *P. haemolytica*, eliminan el 75% de las bacterias a las 2 horas, el 90% a las 4 y 92% a las 8 horas. No obstante, cuando previo al desafío bacteriano se infecta a los animales con algún virus (4 o 6 días antes con los virus IBR o Pi3, respectivamente), los mecanismos de

depuración pulmonar son incapaces de eliminar las bacterias, generándose entonces una neumonía. Los mecanismos mediante los cuales se desarrolla este sinergismo virus-bacteria, no se han dilucidado totalmente; sin embargo, se asume que el mayor efecto detrimental sobre los mecanismos de defensa en el pulmón, ocurre sobre el macrófago alveolar. Al respecto, se ha demostrado un fenómeno de hipersensibilidad, denominado citotoxicidad, sobre los macrófagos que expresan antígenos virales sobre su superficie. En este caso, resulta paradójico que al momento en que la respuesta inmune humoral comienza a presentarse significativamente (6 a 8 días posteriores al inicio de la infección viral), los anticuerpos dirigidos contra los virus, destruyen a los macrófagos que se han convertido en el blanco de la respuesta inmune, al exponer en su superficie los antígenos virales.

Además de lo anterior, los virus pueden ocasionar otras alteraciones en los mecanismos de defensa del pulmón, tales como la destrucción de la carpeta mucociliar, la producción de edema, daño sobre neumocitos I y II, esto último con la consecuente alteración del surfactante e, inclusive, la generación de eventos inflamatorios, dependientes de un fenómeno hipersensible en el que participan IgE, células cebadas y sustancias vasoactivas liberadas por éstas; es decir, el virus, en este caso el BRSV, actúa como alérgeno. En el cuadro 2 se presenta un resumen de los efectos más significativos de la infección viral sobre los mecanismos de defensa en el pulmón.

Cuadro 2

EFFECTOS DE LA INFECCION VIRAL SOBRE LOS MECANISMOS DE DEFENSA EN EL PULMON

Aumento en la susceptibilidad a la adhesión y colonización bacteriana.
 Disminución de la eliminación bacteriana por la carpeta mucociliar.
 Disminución de los niveles del surfactante.
 Disminución de la actividad fagocítica de los macrófagos por alteraciones en:
 Quimiotaxis, Adhesión de partículas, Ingestión, Fusión fagosoma-lisosoma,
 Acción lítica y degradación intracelular y Niveles de enzimas lisosomales.

Factores de virulencia de la bacteria

En lo que concierne a las bacterias, se ha demostrado que éstas son las verdaderas responsables de la severidad del cuadro neumónico en el CRB; de hecho, una infección respiratoria viral sin complicaciones, transcurre por lo general inaparente o discreta. Las bacterias más importantes son las del género *Pasteurella*, aunque recientemente también ha tomado relevancia *Haemophilus somnus*, microorganismo causante de la Meningoencefalitis Tromboembólica. Otras bacterias que pueden intervenir eventualmente en el CRB, se estiman de menor relevancia.

Pasteurella haemolytica se considera de mayor importancia que *P. multocida* en el CRB. En el primer caso se trata del tipo A1, mientras que para *P. multocida* se hace referencia al tipo A. Vale mencionar aquí que los tipos B y E de *P. multocida*, causante de la Septicemia hemorrágica, no han sido demostrados en los bovinos en América, por lo tanto, esta enfermedad debe ser considerada exótica.

Con relación a *P. haemolytica*, se ha propuesto que previo a la colonización bacteriana del tracto respiratorio inferior, se requiere de una abrupta conversión en el tracto respiratorio superior, de la forma comensal de la bacteria (serotipo 2 u otros, albergadas naturalmente en fosas nasales y tonsilas) a la forma patógena (serotipo 1). Esta conversión se presentaría durante condiciones de estrés y/o infecciones virales en el animal, porque *P. haemolytica* A1, a diferencia de los serotipos comensales, expresaría en su superficie factores que le permitirían la adhesión y colonización en el tracto respiratorio superior después que ha sido alterado, para luego, a partir de este foco primario de infección, diseminarse hacia el pulmón. Vale señalar también que la expresión de estos factores de adhesión y colonización de *P. haemolytica* A1, podría estar asociada a la regulación conjunta de otros factores de virulencia de la bacteria.

Los factores de virulencia de *P. haemolytica* considerados de mayor importancia son su leucotoxina y el lipopolisacárido. La leucotoxina (LT) es un exotoxina citotóxica para los leucocitos de los rumiantes y también para los macrófagos alveolares. Este efecto selectivo de la citotoxina, quizá explique la virulencia de *P. haemolytica* para los rumiantes y su ausencia de

patogenicidad para el cerdo y otros animales domésticos. La LT de *P. haemolytica*, pertenece a un grupo de toxinas bacterianas denominadas: "citolisinas formadoras de poros", por sus típicos efectos sobre las membranas celulares.

Por otra parte, se ha demostrado que los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), componentes primordiales de la pared de las bacterias Gram negativas, pueden ejercer un efecto inflamatorio considerable cuando se instilan en el pulmón. Este efecto inflamatorio también ocurre cuando se emplean los LPS de *P. haemolytica* y *P. multocida*, que además alteran las propiedades del surfactante alveolar, favoreciendo el desarrollo de la lesión neumónica. Más recientemente, ha sido demostrado que a partir de la inoculación por vía aérea de *P. haemolytica*, su LPS puede atravesar la barrera epitelial e interactuar con las células endoteliales y los macrófagos intravasculares del pulmón, generando una significativa respuesta inflamatoria en la que se comprometen otros mecanismos de homeostasis que también intervienen en la respuesta inflamatoria, tales como los de la coagulación y fibrinólisis, lo mismo que el sistema del complemento. Inclusive, se ha demostrado que *P. haemolytica* puede inducir la producción del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) cuando se incuba con macrófagos alveolares. Como se sabe, el TNF es una citocina que tiene múltiples propiedades entre las que destaca su enorme capacidad flogística.

La importancia de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) en el desarrollo del daño pulmonar es tan relevante que cuando se priva experimentalmente a los bovinos de estas células, la lesión que corresponde

a un desafío masivo con *P. haemolytica* se ve notablemente disminuida. De lo anterior, se desprende la apreciación de que el macrófago alveolar, participa mayormente en la depuración bacteriana e interactúa con las células responsables de la respuesta inmune, en tanto que el PMN es un importante ejecutor de la respuesta inflamatoria, luego de que resulta activado por diversos mediadores; sin embargo, cuando esta respuesta ocurre de manera exacerbada, el daño tisular en el pulmón sobrepasa los beneficios originales de la inflamación.

Lesiones

La lesión más representativa del CRB es la neumonía; esta neumonía resulta ser la mayoría de los casos, de tipo agudo, intersticial y exudativa, conforme al criterio histopatológico actual para la clasificación de las neumonías. Eventualmente, la neumonía es de tipo bronconeumonía aguda o una mezcla con la anterior. Se ha estimado que cuando interviene en la lesión neumónica *P. haemolytica*, se presenta el primer tipo de neumonía, mientras que el segundo ocurre cuando interviene *P. multocida* o *H. somnus*. En algunas ocasiones los microorganismos pueden encontrarse asociados. Por otra parte, se ha referido que la participación de *Mycoplasma bovis*, *M. dispar* y *Chlamydia psittaci*, pueden dar lugar a una neumonía de tipo agudo linfoproliferativa, la cual eventualmente evolucionará hacia neumonía exudativa, mayormente bronconeumonía, cuando también intervienen *Pasteurella sp.* o *H. somnus*.

Particularizando sobre la neumonía aguda intersticial y exudativa, considerada la más representativa del CRB, cabe mencionar que también se hace referencia a ella como neumonía fibrinosa, en la clasificación anatomopatológica. Lo anterior se debe a que su respuesta inflamatoria exudativa es predominantemente de tipo fibrinoso. Este exudado cubre la pleura de las regiones craneoventrales del pulmón; además, también existe una patente consolidación en estas zonas. La lesión es por lo general asimétrica y se presenta un daño más considerable en el pulmón derecho. Comúnmente se involucran los lóbulos apicales y cardíacos de ambos pulmones y el lóbulo accesorio y la parte adyacente del diafragmático del pulmón derecho. Eventualmente, cuando la lesión ha evolucionado por algún tiempo, se aprecian patentes adherencias de fibrina entre la pleura parietal y la visceral. Las secuelas más comunes son secuestros abscedados de las zonas más dañadas.

Microscópicamente se observa una severa pleuritis fibrinosa o fibrinopurulenta. Los vasos linfáticos de los septos interlobulillares muestran notorios trombos de fibrina. Los bronquios y bronquiolos mayores lucen necrosis y descamación del epitelio y, eventualmente, un exudado fibrinopurulento. Los alvéolos aparecen engrosados en sus septos y hemorrágicos; asimismo, se aprecia una severa infiltración por PMN, tanto en septos como participando en la exudación alveolar. En zonas de severo daño la consolidación y necrosis no permiten distinguir la arquitectura alveolar. Estas zonas de intenso daños se encuentran parcialmente demarcadas por células necróticas arremolinadas. En estas zonas puede también apreciarse vasculitis y trombosis de algunas pequeñas venas. En

otras áreas, con menos daño, se pueden reconocer edema, fibrina, macrófagos activos y PMN en la luz de los alvéolos; además, pueden identificarse colonias bacterianas.

Cuando la participación bacteriana corresponde a *P. multocida* o a *H. somnus*, las características de la lesión neumónica cambian considerablemente, al grado de manifestarse como bronconeumonía franca; es decir, la exudación bronquial y bronquiolar es más copiosa y el exudado es mayormente mucopurulento. La bronquiectasia es la secuela más importante en esta neumonía.

Como se ha visto, las bacterias son en sí las responsables mayores de la morfología del daño pulmonar; sin embargo, eventualmente pueden identificarse algunas evidencias indicativas de la participación viral en la lesión. Estas evidencias corresponden a la formación de cuerpos de inclusión que se presentan en el citoplasma de las células del epitelio bronquial y bronquiolar, así como en macrófagos, lo que resulta compatible con infecciones por Paramyxoviridae, sean debidas a PI3 (Paramyxovirus) o BRSV (Pneumovirus). Además, en estos casos también se aprecia a nivel alveolar la coalescencia de células del epitelio o de macrófagos, a las que se les denomina sincitios. Por otra parte, pueden observarse cuerpos de inclusión intranucleares en células del epitelio de bronquios, tráquea y mucosa nasal, en casos de IBR.

Otras de las lesiones que pueden reconocerse en el CRB, además de la neumonía, son traqueítis y rinitis fibrinonecrótica que por lo general

corresponden a IBR. Por otra parte, cuando las lesiones respiratorias se acompañan de estomatitis ulcerativa y de otras lesiones semejantes en el tracto digestivo, pudiera tratarse de BVD, debiendo ser considerada también Fiebre Catarral Maligna.

Signos Clínicos

Las manifestaciones clínicas del CRB no ocurren sino hasta 6 o 10 días posteriores al arribo de un lote nuevo o la presentación de la condición estresante. Por lo general, la morbilidad oscila entre 5 y 40 %, mientras que la mortalidad fluctúa entre 5 y 30 %; aunque en algunos brotes puede elevarse considerablemente.

Los animales muestran al principio letargia y anorexia, se apartan del resto de los animales y se mantienen con la cabeza baja, las orejas caídas y los ojos entreabiertos. También puede apreciarse que los animales muestran cierta apatía cuando se les observa dentro del corral e incluso no miran de frente al observador, quizá por la molestia que les causa el mover el cuello. Algunos animales pueden presentar salivación, debido también a la molestia que les causa el deglutir. Por lo general, el morro está congestionado, reseco y costroso; asimismo, hay fiebre, conjuntivitis y lagrimeo. La frecuencia respiratoria está aumentada, aunque por lo general aún sin disnea. A continuación, puede presentarse descarga nasal, si bien esto no es constante, resulta indicativo de la severidad del compromiso en tracto respiratorio superior. Tampoco la tos es un signo prominente y cuando se presenta es suave, húmeda y en accesos. Conforme la lesión neumónica

progresar en gravedad, la disnea se hace patente, el animal respira por la boca teniendo la cabeza extendida y abduciendo los miembros anteriores. Eventualmente se presenta diarrea. En la auscultación pueden reconocerse ruidos bronquiales y roces pleurales en la región craneoventral, sobre todo del pulmón derecho; no obstante, cuando la lesión de consolidación es total, los sonidos respiratorios pueden estar ausentes. Los animales afectados severamente, mueren por lo general entre los primeros 25 días de arribo al engordadero, luego de un curso de 3 a 8 días. Usualmente el problema en el lote transcurre de 3 a 4 semanas.

Diagnóstico

El diagnóstico clínico no resulta por lo general difícil cuando se reconocen varios animales representativos del problema; sin embargo, el diagnóstico integral resulta todo lo contrario, lo cual va en relación de la etiología múltiple del CRB.

En efecto, aunque con base en las lesiones pulmonares en los animales muertos, puede suponerse cual es la bacteria involucrada con el problema, resulta generalmente difícil establecer la identidad del agente etiológico primario que, como ya sabemos, es un virus. Para este propósito la observación histopatológica es muy necesaria, aunque no siempre pueden encontrarse evidencias que sugieran a un agente viral en particular; no obstante, la patología resulta imprescindible como parte del diagnóstico y nunca debe omitirse. En lo que concierne a los estudios virológico de aislamiento, éstos son sin duda los que determinarían al agente etiológico

primario; desafortunadamente su realización no se encuentra al alcance de la mayoría de los laboratorios en México y sus procedimientos son costosos y tardados. En este sentido, las técnicas de inmunofluorescencia para demostrar al antígeno viral en el tejido, quizá sean las más rápidas y eficientes, pero tampoco son rutinarias y sólo se realizan en laboratorios especializados del país. Los análisis bacteriológicos, en cambio, son más accesibles y confirmarían la presencia de la bacteria involucrada, además de indicar, eventualmente, la terapia antimicrobiana más adecuada con base en estudios de sensibilidad a los antibióticos. Por último, el conocimiento de la diseminación de una o varias infecciones virales en un lote de animales, ayudaría a establecer las medidas para su control, pero desafortunadamente, las técnicas serológicas mediante las cuales se consigue lo anterior, tampoco se llevan a cabo en todos los laboratorios del país. En resumen, el diagnóstico integral en los casos de CRB, no se consigue con facilidad mediante los medios de que se dispone actualmente en México; sin embargo, los estudios de patología ofrecen una valiosa ayuda.

Casos Locales

En el laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se han diagnosticado 28 casos de neumonías representativas del CRB; estos casos corresponden a brotes de la enfermedad registrados entre 1986 y 1994. Todos, con excepción de uno, ocurrieron en corrales de engorda. En varios de estos casos existen evidencias histopatológicas de infección viral por Paramyxoviridae. Algunos estudios serológicos que se han llevado a cabo en el Veterinary Diagnostic

Laboratory del College of Veterinary Medicine en College Station, Texas A&M University, han demostrado que los animales son reactores a IBR, PI3, BRSV, *P. haemolytica* y *H. somnus*. El único caso que no ha ocurrido en corral de engorda, se presentó en becerros alojados en jaulas dentro de un cobertizo, en condiciones desfavorables, tal y como se ha referido para los brotes de Neumonía Enzoótica.

Tratamiento

Se ha demostrado que cuando se logran identificar las primeras manifestaciones del CRB en los animales enfermos, la mayoría de los tratamientos antimicrobianos, insaturados durante este período, son eficaces, sobre todo, si se continúan por lo menos 48 horas después de que los signos clínicos hayan desaparecido. Es decir, la mortalidad en el CRB puede ser minimizada cuando se administra a tiempo de terapia antimicrobiana, mientras que los tratamientos aplicados luego de 48 horas de iniciado el padecimiento, por lo general, resultan infructuosos, inclusive en algunos casos sólo se prolonga el curso de la enfermedad; asimismo, cuando los tratamientos se suspenden tempranamente, pueden favorecerse las recaídas y la presentación de secuelas graves.

Entre los antimicrobianos más recomendables para el tratamiento del CRB, se encuentran: penicilina-estreptomicina, ampicilina, amoxicilina, tetraciclina y sulfonamidas; cuando la severidad del caso lo amerite pueden también emplearse neomicina y spectinomina. Cabe mencionar que deben ser consideradas pruebas de sensibilidad bacteriológica a los antibióticos, en

la instauración de la terapia antimicrobiana. Por otra parte, no se cuenta con datos suficientes que apoyen en empleo de los corticosteroides como auxiliares en el tratamiento de las neumonías en el CRB; en cambio, los antiinflamatorios no esteroideos (flunixinina, meglumina) han demostrado beneficios.

En el caso de la administración de antimicrobianos a niveles profilácticos, con la intención de disminuir la gravedad de un brote de CRB o de impedir las manifestaciones en el caso de los animales en período de incubación, las opiniones son bastante contradictorias e inclusive desfavorables. Por ejemplo, en un experimento en el que se provocaron lesiones neumónicas típicas del CRB, mediante la aplicación del virus de IBR seguido 4 días después por *P. haemolytica*, ambos en aerosol, se administró una dosis de oxitetraciclina de larga acción 24 horas antes del desafío bacteriano, demostrándose que en los animales, así tratados, la ocurrencia de la lesión neumónica se retardaba, pero acontecía tan severa como en los animales que no habían recibido el tratamiento con el antibiótico; mientras que la aplicación del mismo antibiótico en presentación convencional en dosis terapéuticas, era efectiva cuando se administraba, tanto al mismo día del desafío con la bacteria, como 24 horas antes o después del mismo.

Cuando debido al número de animales afectados en un corral (25% o más), se justifique el tratamiento masivo, se puede emplear sulfametazina, sulfamerazina o sulfatiazol en el agua de bebida; de igual forma, la clortetraciclina puede administrarse en el alimento. No obstante, estas ventajosas alternativas no reemplazan a la terapia individual de los animales

clínicamente enfermos, debido a que éstos no consumen suficientes cantidades de agua y/o alimento.

Prevención

Los procedimientos para prevenir el CRB mediante biológicos, son sin duda el área de mayor interés y debate actualmente. Por principio, existe la opinión, bastante justificada, de que las bacterinas contra *Pasteurella* para prevenir el CRB, no cumplen con este propósito y, que inclusive paradójicamente, los animales inmunizados muestran una susceptibilidad mayor a padecer las lesiones neumónicas. Se ha propuesto, en este sentido, que los animales al recibir una inmunización parenteral con estos biológicos, desarrollan una buena respuesta inmune humoral sistémica, la cual al actuar a nivel alveolar, favorece una fagocitosis desproporcionada de *Pasteurella* por los macrófagos, debido al efecto opsonizante de estos anticuerpos (IgG) sobre las bacterias; luego, las grandes cantidades de microorganismos fagocitados no pueden ser digeridas por los macrófagos, favoreciéndose la multiplicación bacteriana y la muerte celular por las toxinas que se producen. Asimismo, es probable que también se favorezca la respuesta inflamatoria por mecanismos de hipersensibilidad en donde participan complejos inmunes. Por otra parte, existe también la opinión de que las bacterinas contra *Pasteurella*, pueden ser mejoradas mediante ciertos adyuvantes y el empleo de la proporción adecuada de bacterias en la dosis. Además, se ha señalado que la aplicación de estos inmunógenos por vía respiratoria, confiere una respuesta inmune más adecuada, porque esta es la ruta natural por donde se adquiere la infección. No obstante, quizá la solución dependa

más directamente de la producción de un biológico que induzca a la formación de anticuerpos protectores y que también neutralicen la leucotoxina de *P. haemolytica*; al parecer, esto podrá conseguirse en un futuro cercano con el empleo de biológicos preparados con bacterias vivas o modificadas químicamente, o también, con el empleo de vacunas recombinantes.

Por otro lado, existe el criterio de que vacunado contra los agentes infecciosos primarios, en este caso los virus, se puede prevenir la infección bacteriana; este criterio se fundamenta en el hecho de que los virus IBR, PI3, BRSV, BVD e inclusive Adenovirus, han demostrado favorecer la infección bacteriana en el pulmón. En efecto, ha sido documentada la resistencia a un desafío con el virus de IBR seguido de *P. haemolytica*, administrados en aerosol, en animales previamente inmunizados con una vacuna de virus modificado contra IBR-PI3 o con virus inactivado contra IBR. En el caso del BRSV aún no existen evidencias substanciales que avalen el uso de estos biológicos en el campo, si bien la mayoría de los informes son favorables. Al parecer la única demostración confirmada de efecto adverso por el empleo de un inmunógeno viral, corresponde al virus de BVD; al respecto, se ha demostrado un efecto inmunosupresor del biológico contra BVD que contiene virus modificado, debido precisamente a que aún conserva virulencia residual, lo cual constituye un riesgo digno de tenerse en cuenta.

Resumiendo lo anterior, puede decirse que el empleo de bacterinas convencionales de *Pasteurella* para el control del CRB no es recomendable,

mientras que la vacunación contra los virus resulta, al parecer, más adecuada.

LITERATURA SELECTA

Confer, A.W., Panciera, R.J. and Mosier, D.A.: Bovine pneumonic pasteurellosis: immunity to *Pasteurella haemolytica*. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 193: 1308-1316 (1988).

Frank, G. H. : Pasteurellosis of cattle. In: *Pasteurella and Pasteurellosis*. Edited by: Adlam, C., Rutter, J. M. 197 -221. *Academic Press*, London, 1989.

González, C. T. and Maheswaran, S.K.: The role of induced virulence factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis: review and hypotheses. *Br. Vet. J.*, 149: 183-194 (1993).

Mosier, D : Prevention and control of pasteurellosis, In: *Pasteurellosis in Production Animals*. Edited by: Patten, B.E., Spencer, T.L., Johnson, R.B. Hoffmann, D. and Lehane, L. 121-132. *The Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR)*., Proceedings No. 43, Canberra, Australia, 1993.

Ramírez-Romero, R. : El síndrome respiratorio en los bovinos. Memorias del Primer Seminario Sobre Producción de Bovinos Para Carne. *Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y Gobierno del Estado de Nuevo León, Secretaría de Fomento Agropecuario*, Mayo, 1987, Monterrey, N.L.

Ramírez-Romero, R. : El complejo respiratorio de los bovinos, un padecimiento pulmonar. *Ganadero*, XVI, Nos. 4 y , 57-69 y 79-80 (1991).

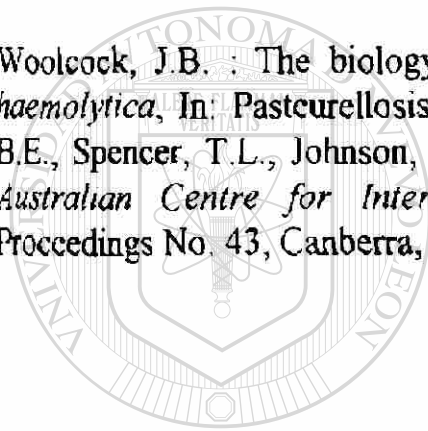
Solana, A. (editor) : Síndrome Respiratorio Bovino. Bovis 12. *Luzán* 5, Madrid, 1986.

Trigo, F.J. : El complejo respiratorio infeccioso de bovinos y ovinos. *Ciencia Veterinaria*, 4: 1-36 (1987).

Trigo, F.J. : Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. *Vet. Méx.*, 22: 131-134 (1991).

Whiteley, L.O., Maheswaran, S.K., Weissm D.J., Ames, T.R. and Kannan, M.S. : *Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: pathogenesis., *J. Vet. Int. Med.*, 6: 11-22 (1992).

Woolcock, J.B. : The biology of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*, In: *Pasteurellosis in Production Animals*. Edited by: Patten, B.E., Spencer, T.L., Johnson, R.B., Hoffmann, D., Lehane, L. 24-34. The Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Proceedings No. 43, Canberra, Australia, 1993.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Rafael Ramírez Romero

Candidato para el Grado de

Doctor en Medicina Veterinaria

Tesis: EL CONEJO COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DAÑO
PULMONAR GENERADO POR EL LIPOPOLISACARIDO DE
Pasteurella haemolytica MEDIANTE LA REACCION DE
SHWARTZMAN Y EL FENOMENO DE ARTHUS.

Campo de Estudio: Ciencias Agropecuarias

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Rama Profesional: Patología Veterinaria

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 24 de octubre de
1954, hijo de Zenaido Ramírez Muñoz y Celia Romero Rosales.

Casado con María Dolores Hernández Rodríguez y padre de Cecilia
Ramírez Hernández.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, en 1976,
con el título de Médico Veterinario Zootecnista.

En 1986 obtuvo el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias con Especialidad en Patología Animal por la Universidad Autónoma de México; en 1988 se le otorgó la Medalla Gabino Barreda por haber obtenido el más alto promedio de calificación al término de sus estudios de Maestría.

Experiencia Profesional: Laboró para la Dirección General de Sanidad Animal de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, como Jefe del Laboratorio Regional de Diagnóstico en Tizimún, Yucatán, hasta 1981. Posteriormente, se incorporó a la Dirección de Referencia en Salud Animal de la misma Secretaría, en Santa Ana Tecamac, Edo. de México, como Jefe del Departamento de Bacteriología, hasta 1984.

Ha sido Profesor de la Asignatura de Patología Especial en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma

de México. Posteriormente, en 1984, fue Profesor Asociado de Tiempo Completo y Coordinador del Programa de la Especialidad en Producción Animal: Bovinos, que se desarrolló en el Centro de Investigaciones Pecuarias del Estado de Sonora.

Desde 1986 es Maestro de Tiempo Completo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León y, a partir de diciembre de 1992, ocupa el puesto de Director de esta Dependencia por un primer período.

