

Caracterización de la interrelación entre la *Pasteurella multocida* y la *Bordetella bronchiseptica* con células epiteliales de cavidad nasal y nasofaringe durante el síndrome neumonía enzoótica de los conejos.¹

Botero E. L.,* Iregui C. A.**

Resumen

La neumonía enzoótica de los conejos se estudió por microscopía óptica tradicional y microscopía óptica de alta resolución (MOAR) en fosas nasales y nasofaringe de 36 conejos sanos en comparación con 12 conejos enfermos (seis con signos de rinitis y seis con septicemia).

Los hallazgos morfológicos revelaron cambios como la vacuolización del epitelio que estuvo presente en todos los grupos de animales tanto en sanos como en enfermos en las dos regiones estudiadas; la descamación de células epiteliales, la displasia del epitelio, la infiltración de PMN al epitelio, la hiperplasia de células caliciformes y la degeneración de éstas últimas estuvieron presentes en grado leve en los grupos uno, dos y tres y en grado severo en el grupo cuatro. La adherencia de bacterias a los cilios no fue sobresaliente en la mayoría de los grupos incluyendo al grupo cuatro. No pudo detectarse adherencia en el 91 % de los animales del grupo uno, en el 42,9% en los del grupo dos, en el 60 % en los del grupo tres y en el 33.33% de los del grupo cuatro. Se concluyó que las células caliciformes y los PMN por su especial aumento y alteraciones serían células claves en la fisiopatología de la enfermedad.

Introducción

La neumonía enzoótica de los conejos es una de las enfermedades que más alta mortalidad y morbilidad induce en explotaciones comerciales con grandes pérdidas económicas hasta ahora no bien cuantificadas. En apariencia el agente infeccioso determinante y más severo de esta entidad es la *Pasteurella multocida*; aún así, algunos autores sostienen que la *Bordetella bronchiseptica* sería la encargada de abrir la puerta para el ingreso de la más patógena *P. multocida* (Deeb et al., 1990). Tradicionalmente se consideran estos dos microorganismos como habitantes normales del tracto respiratorio; no obstante, la dinámica de su ubicación y densidad poblacional de acuerdo a diferentes etapas de desarrollo biológico de los animales, así como durante la enfermedad, no han sido aclaradas. Todas las consecuencias del proceso patológico inducido por los dos anteriores microorganismos en el pulmón, fueron documentadas en detalle por Mendoza (1991) y Murillo e Iregui (1993) quienes describieron severos cambios en la microvasculatura pulmonar en conejos con neumonía enzoótica y reportaron que el número de estructuras morfológicamente compatibles con bacterias era muy bajo y en general se localizaban en vías de conducción aérea. El objetivo de esta investigación fue intentar una caracterización morfológica de las lesiones de las dos regiones anatómicas (fosas nasales y nasofaringe) en conejos sanos en las distintas etapas de su desarrollo biológico, así como en animales enfermos con el síndrome.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 48 conejos que procedían de una explotación comercial ubicada en el municipio de Funza con una altitud de 2.550 mts y temperatura promedio de 13.1 °C. Se tomaron 36 conejos sanos cada uno con una diferencia de edad de 2 días sobre el anterior, iniciando el día 1 de edad

y concluyendo el día 69 y adicionalmente 6 conejos que sufrían la forma septicémica de la enfermedad y 6 con la forma de rinitis. Los animales se agruparon por edad en cuatro grupos así: Grupo 1, conejos de 1-21 días de edad (11 gazapos); Grupo 2, conejos de 23-49 días de edad (14 gazapos); Grupo 3, conejos de 51-69 días (10 gazapos). Un cuarto grupo de animales enfermos con dos subgrupos: uno

¹ Proyecto financiado por el centro de investigaciones y desarrollo científico, CINDEC, UN, Colombia.

* MV. MSc. Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia.

** MV. DMV. Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia.

Tabla 1. Parámetros de evaluación para hallazgos morfológicos en epitelio de fosa nasal y nasofaringe.

Variable	X	Grado de la lesión		
		Leve	Moderado	Severo
Vacuolización	40X	En menos de 5 células	Entre 5-20 células	En mas de 20 células
Espacios interepiteliales	40X	En menos de 5 células	Entre 5-20 células	En mas de 20 células
Descamación del epitelio	20X	En una o dos zonas	En 2-5 zonas	En más de 5 zonas
Displasia del epitelio	40X	En una o dos zonas	En 2-5 zonas	En más de 5 zonas
Adherencia de bacterias	40X	Algunas bacterias adheridas a los cilios	Grupos de bacterias adheridas a los cilios en menos de cinco zonas	Grupos de bacterias adheridas a los cilios en mas de cinco zonas
Hiperplasia de células caliciformes	40X	Menos de cinco células de diez epiteliales eran caliciformes	Entre cinco y ocho células epiteliales de diez eran caliciformes	Más de ocho de diez células epiteliales eran caliciformes
Degeneración de células caliciformes	40X	Contenido difuso en pocas células	Contenido difuso en aprox 40% de ellas	Contenido difuso en más del 50%.
Infiltración de células al epitelio	40X	Entre dos y cinco células por campo	Entre cinco y diez células por campo	Más de diez células por campo
Moco en la luz	20X	Moco en dos o tres áreas	Moco en mas de tres áreas	Moco en forma casi generalizada.
Bacterias en la luz	40X	Algunas bacterias en la luz	Grupos de bacterias en la luz en menos de cinco zonas	Grupos grandes de bacterias en la luz en mas de cinco zonas

X= Aumento del objetivo

de rinitis (6 animales) y otro de septicemia (6 animales). Se anestesiaron con Ketalar (Lab Parke-Davis, 35 mg/kg.) y xylazine (Rompún, Lab. Bayer, 5 mg/kg.) administrados por vía intramuscular, sus fosas nasales y nasofaringe se fijaron vía intranasal con una solución de paraformaldehído 4%, glutaraldehído 1% en buffer S colidina (Parafor G) aplicado en forma de aerosol. Además se separó la nasofaringe. Se practicaron cortes transversales de fosas nasales (0,5 cm. de grosor aprox.) y se colocaron en una solución decalcificadora de EDTA al 7% por un período de 20-30 días. De los tejidos fijados se tomaron dos porciones (tanto de fosas nasales como de nasofaringe) una de las cuales se incluyó en parafina para ser procesada por la técnica tradicional de hematoxilina-eosina (H.E). (Luna, 1968) y la otra se incluyó en resinas epóxicas (mezcla epon-araldita) en placas de inclusión orientadas (planas, a fin de exponer la mucosa), los bloques se polimerizaron en estufa a 60°C durante 48 horas, se hicieron cortes de 1 μ m colorearon con azul de toluidina. La tinción de H.E. se utilizó para la determinación de sitios preferenciales, grados y extensión de las manifestaciones patológicas. Estos parámetros se usaron como referencia global de interpretación de cambios morfológicos. En las porciones incluidas en resinas epóxicas se determinó la intensidad de lesiones puntuales,

tipos celulares y localizaciones de eventual adhesión bacteriana. Estos parámetros se analizaron en cada una de las regiones (fosas nasales y nasofaringe) y en cada una de ellas en dos regiones histológicas: epitelio y lámina propia. Los parámetros utilizados para la evaluación de los cambios morfológicos se describen en la Tabla 1. La numeración de los animales se hizo de manera ciega para evitar riesgos.

Resultados

Hallazgos morfológicos en epitelio de fosas nasales

- Vacuolización del epitelio.

La vacuolización del epitelio se describió como la presencia de vacuolas intracelulares de diferentes tamaños (Fig. 1). Estuvo presente en todos los grupos tanto en sanos como en enfermos y en todos los grados. Como lo muestra la figura 2 en el grupo uno el porcentaje más elevado de vacuolización fue del grado moderado con un 66,6% de los animales con el cambio, en el grupo dos fue de un 57%, en el grupo tres y cuatro fue del mismo grado en un 60% y 50% respectivamente. Al hacer una comparación entre los

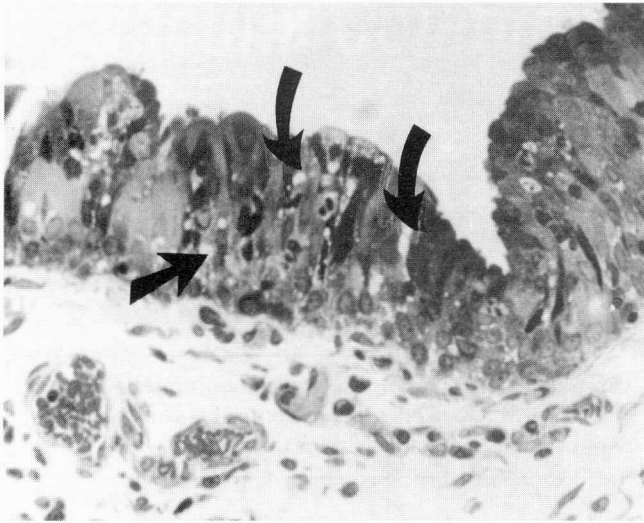


Figura 1. Epitelio respiratorio de fosa nasal de un conejo del grupo uno. Obsérvese la presencia de vacuolas intracelulares de diferente tamaño (Flechas). MOAR 400X aprox.

animales de rinitis y los de septicemia, los dos subgrupos presentaron esta lesión en un 50% en grado moderado; adicionalmente, los de septicemia la tuvieron en un 50% en grado severo.

- Descamación de células epiteliales.

Esta lesión estuvo casi ausente en los grupos uno y dos. En el grupo tres se presentó en grado leve en un 10%, moderado en un 20% y en grado severo en un 20% de los animales. En el grupo cuatro el 25% no mostró el cambio, el 33,3% lo mostró en grado leve y el mismo porcentaje en grado moderado y el 8,3% en grado severo. La lesión estuvo presente en un mayor porcentaje en los animales del

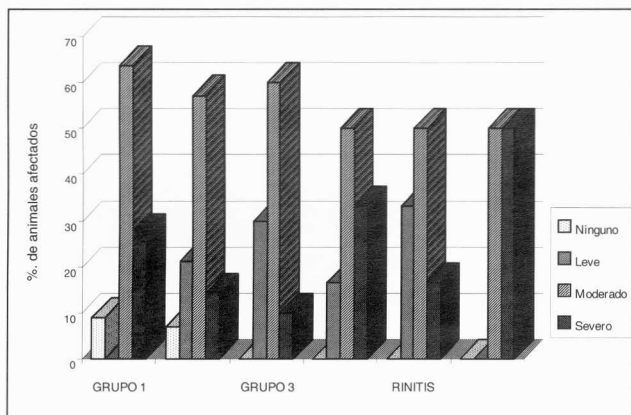


Figura 2. Hallazgos morfológicos en epitelio de fosa nasal de conejo. Comparación entre los cuatro grupos. Vacuolización del epitelio.

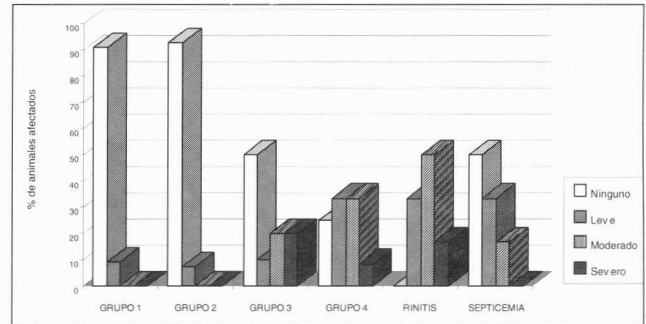


Figura 3. Hallazgos morfológicos en epitelio defosa nasal de conejo. Comparación entre los cuatro grupos. Descamación de células epiteliales.

grupo de rinitis en donde el 50% la presentó en forma moderada mientras que en los animales del grupo de septicemia únicamente el 16,2% de los animales la presentó en este grado (Fig. 3).

- Displasia del epitelio

La displasia del epitelio (Fig. 4) no se presentó en los grupos uno y dos en casi ninguno de los animales (Fig. 5). En el grupo tres el 70% no presentó la lesión, el 10% la presentó de grado moderado y el 20% la tuvo en grado severo. En el grupo cuatro el 25% no presentó la lesión, el 33,3% la tuvo en grado leve el 8,3% en grado moderado y el 33,3% en grado severo. En los animales del grupo de rinitis el mayor porcentaje presentó la lesión de manera leve (50%) mientras que en los conejos del grupo de septicemia el mayor porcentaje (50%) la mostró en grado severo.

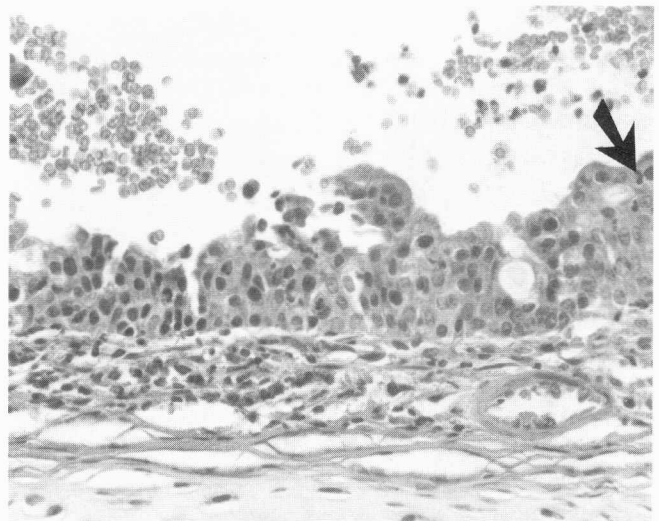


Figura 4. Epitelio respiratorio de fosa nasal de un conejo del grupo cuatro (rinitis). Obsérvese la displasia del epitelio, el desorden del mismo y la infiltración de PMN (Flechas). H.E. 400X aprox.

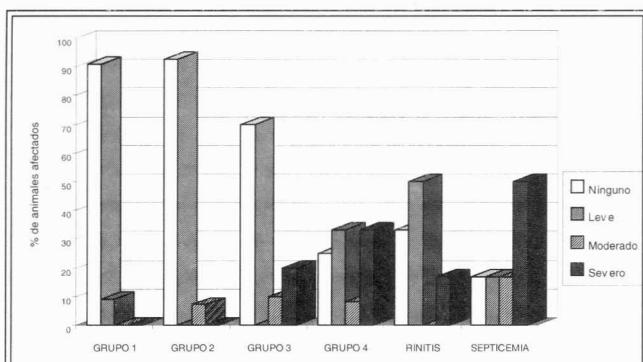


Figura 5. Hallazgos morfológicos en epitelio de fosa nasal de conejo. Comparación entre los cuatro grupos. Displasia del epitelio.

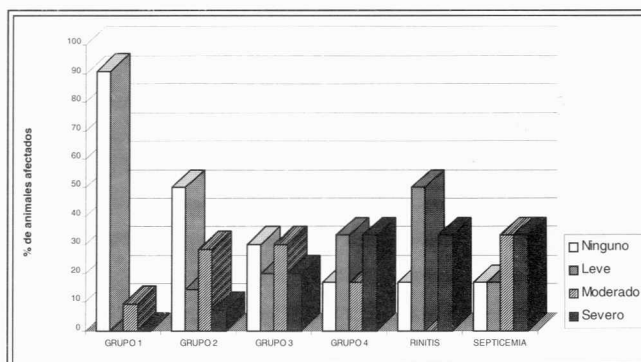


Figura 7. Hallazgos morfológicos en epitelio de fosa nasal de conejo. Comparación entre los cuatro grupos. Adherencia de bacterias a los cilios.

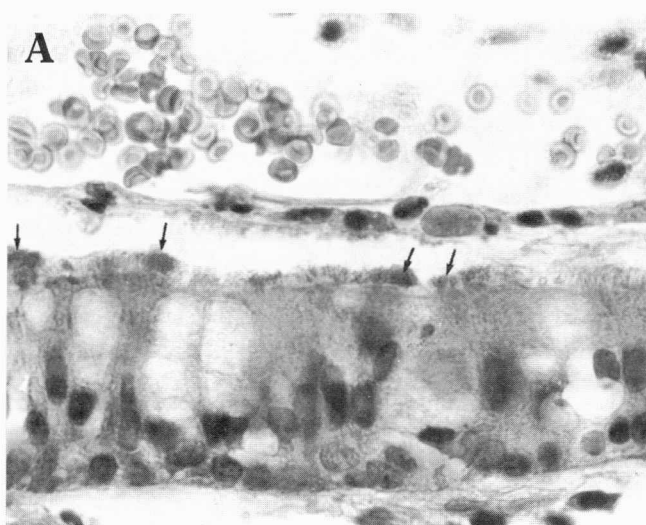
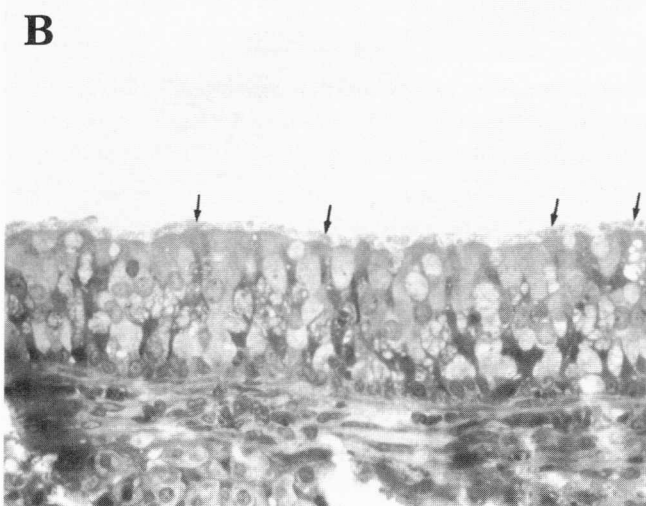


Figura 6. Epitelio respiratorio de fosa nasal de un conejo del grupo cuatro (rinitis). Obsérvense las bacterias adheridas a los cilios (flechas). A) H.E. 1000X aprox. B) moar 1000X aprox.



- Adherencia de bacterias a los cilios

La adherencia de bacterias a los cilios (Fig. 6a y b) pudo detectarse en todos los grupos aunque en diferentes grados (Fig. 7). En el grupo uno el 91% no presentó adherencia de bacterias y el 9% lo tuvo en grado moderado. En el grupo dos el 50% no presentó adherencia de bacterias, el 14,3% en grado leve, el 28,6% en grado moderado y el 7% en grado severo. En el grupo tres el 30% no presentó adherencia, el 20% en grado leve, el 30% en moderado e igualmente el 20% en grado severo. En el grupo cuatro la adherencia fue del 33,3% en grado leve, el 16% en grado moderado y el 16% en grado severo, el 33,33% restante no presentó adherencia. Puede observarse que en el grupo de rinitis el 50% mostró adherencia de grado leve en comparación con un 16% en los del grupo de septicemia. El 33,3%

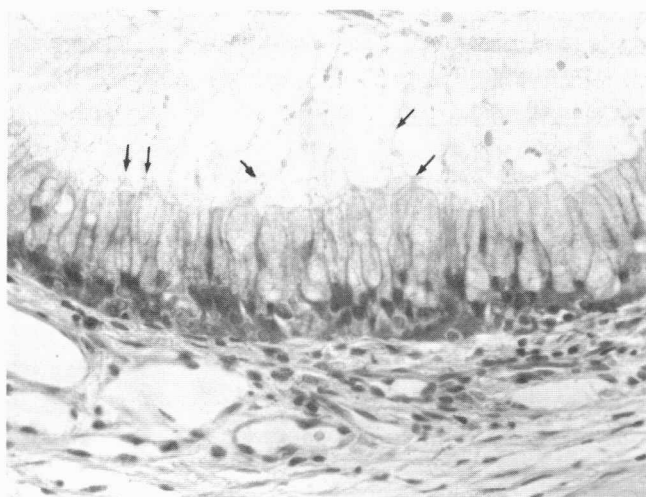


Figura 8. Epitelio respiratorio de fosa nasal de un conejo del grupo cuatro (septicemia). Hiperplasia de células caliciformes y liberación de moco en la luz (flechas). H.E. 400X aprox.

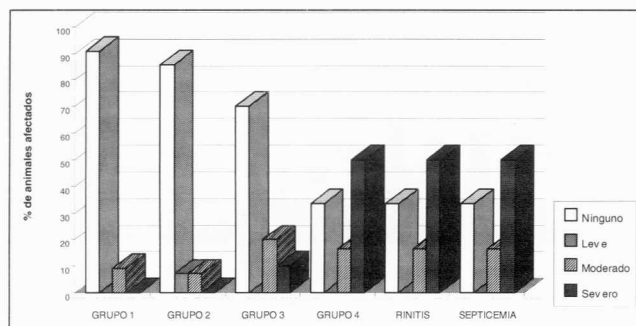


Figura 9. Hallazgos morfológicos en epitelio de fosa nasal de conejo. Comparación entre los cuatro grupos. Hiperplasia de células caliciformes.

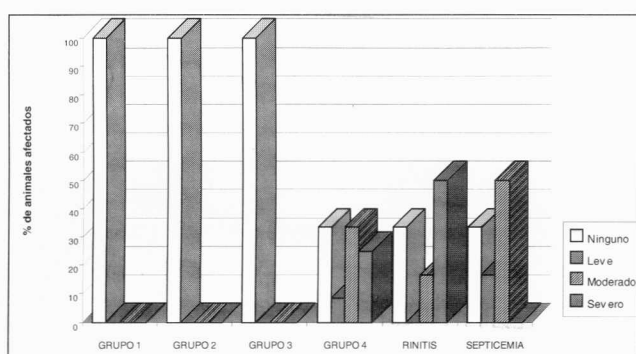


Figura 10. Hallazgos morfológicos en epitelio de fosa nasal de conejo. Comparación entre los cuatro grupos. Degeneración de células caliciformes.

de los del grupo de septicemia la presentó en grado moderado. El 33,3% de los de rinitis y el mismo porcentaje de los animales con septicemia mostraron adherencia de bacterias a los cilios en grado severo.

- Hiperplasia de células caliciformes

La hiperplasia de células caliciformes (Fig. 8) fue muy escasa en los grupos uno y dos. En el grupo tres apareció de una manera moderada en el 20% y de forma severa en el 10% (Fig. 9). En el grupo cuatro estuvo presente en un grado moderado en el 16,7% y en grado severo en el 50% de los animales. No hubo diferencia entre los grupos de rinitis y septicemia. Además de este cambio las células caliciformes, únicamente en el grupo de los enfermos, mostraron degeneración en diferentes grados (Fig. 10). Se presentó de manera leve en un 8,3%, moderada en el 33,3 y de manera severa 25% de los animales. Los animales de rinitis mostraron grados más graves de la lesión, un 50% en grado severo en comparación con el mismo porcentaje en grado moderado en los del grupo de septicemia.

- Infiltración de células inflamatorias en epitelio respiratorio.

En general la célula inflamatoria que se encontró infiltrando de manera especial el epitelio fueron los PMN (Fig. 11) en comparación con células mononucleares (linfocitos, macrófagos y células plasmáticas). La infiltración de células pudo verse en los grupos uno al tres de manera leve y únicamente en el grupo cuatro se encontró una infiltración importante de células. Como puede apreciarse en la figura 12, en el grupo cuatro la infiltración de linfocitos y células plasmáticas estuvo presente en grado leve en un 16,6% de los conejos y en grado moderado en un 8,3% y un 16,6% respectivamente. La infiltración de PMN fue en cambio sobresaliente ya que el 50 % de los animales la mostraron en grado moderado y el otro cincuenta por ciento en grado severo.

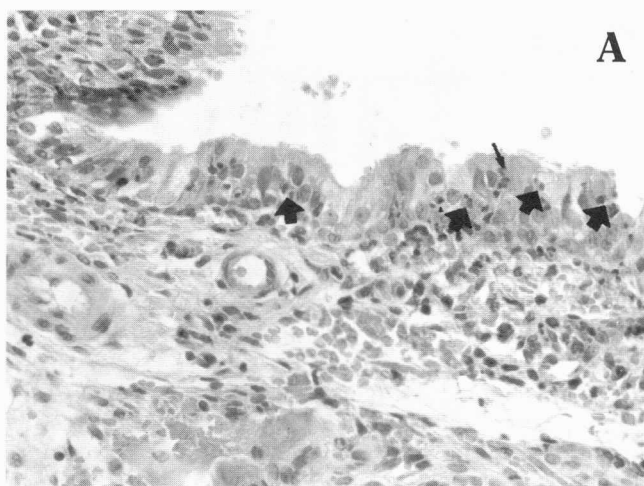
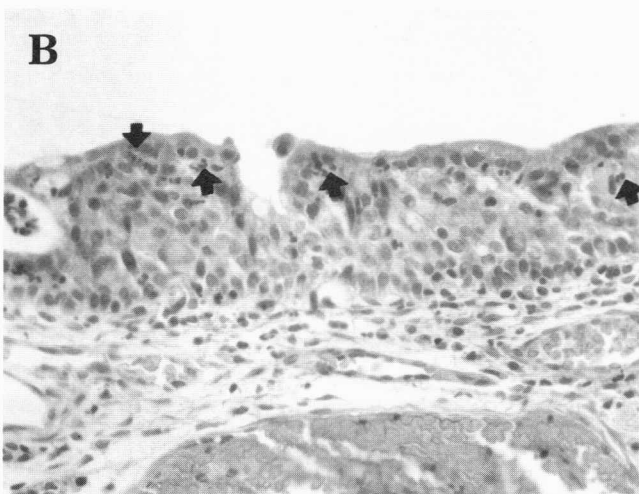


Figura 11. Epitelio respiratorio de fosa nasal de un conejo del grupo cuatro (septicemia). A) Obsérvese la severa infiltración de PMN al epitelio (flechas) y su migración a la luz. Coloración de H.E. 400X aprox. B) Es evidente además de la moderada infiltración de PMN (flechas), un severo desarreglo del epitelio. Coloración H.E. 400X aprox.



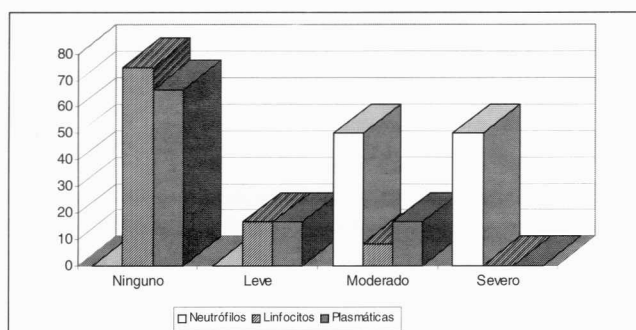


Figura 12. Hallazgos morfológicos en epitelio de fosa nasal de conejo. Infiltración de células inflamatorias en el epitelio de fosa nasal. Grupo cuatro.

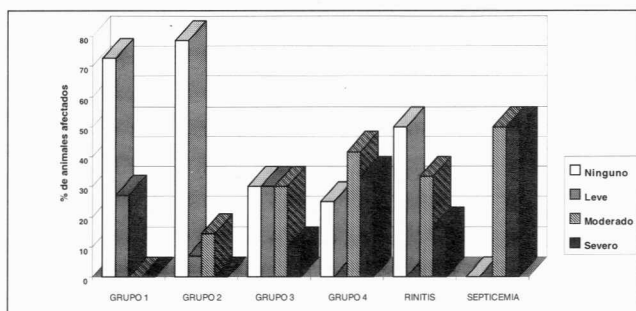


Figura 13. Hallazgos morfológicos en lámina propia de fosa nasal de conejo. Comparación entre los cuatro grupos. Edema intersticial.

Hallazgos morfológicos en lámina propia de fosas nasales

- Edema intersticial

Como lo muestra la figura 13 el edema intersticial se presentó únicamente en forma leve en un 27,3 % de los animales del grupo uno. En los animales del grupo dos se observó en grado leve en un 7% y en grado moderado en un 14,3%. En los del grupo tres se observó en grado leve en un 30%, en grado moderado en un 30% y en grado severo en un 10%. En el grupo cuatro se observó en grado moderado en un 41,7% y en grado severo en un 33,3%. En los conejos con rinitis se observó edema intersticial únicamente en grado moderado en el 33,33% y severo en el 16%, en los de septicemia se observó el 50% moderado y el mismo porcentaje severo.

- Infiltración de células en la lámina propia.

La infiltración de células inflamatorias en lámina propia se comportó en forma similar a lo descrito en epitelio (datos no mostrados) siendo también los PMNs la célula más importante.

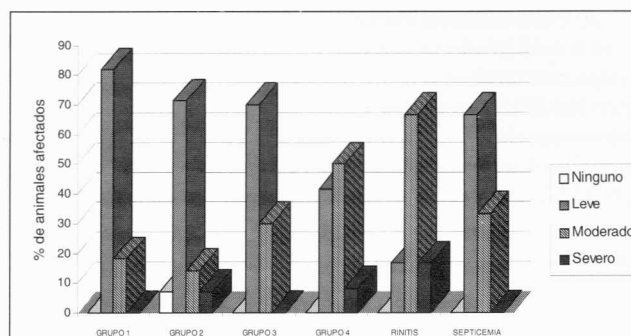


Figura 14. Hallazgos morfológicos en epitelio de nasofaringe de conejo. Comparación entre los cuatro grupos. Vacuolización del epitelio.

Hallazgos en epitelio respiratorio y lámina propia de nasofaringe.

- Vacuolización del epitelio.

Prácticamente todos los animales de los cuatro grupos mostraron vacuolización del epitelio en grados de leve a moderado (Fig. 14). Se presentó principalmente en grado leve en el 82% de los animales del grupo uno, en el 71,4% del grupo dos, en los del grupo tres en un 70%. Los conejos del grupo cuatro tuvieron el cambio en grado leve en un 42% y en grado moderado en un 50%, representados principalmente por los del grupo con rinitis que la presentaron en grado moderado en un 66,7%, en contraste con los del grupo con septicemia que la tuvieron en grado leve en el mismo porcentaje. Únicamente el 7% de los animales del grupo dos y el 8,3% de los grupo cuatro dejaron ver tal alteración en grado severo.

- Hiperplasia de células caliciformes.

Esta lesión no se manifestó abiertamente en esta región. En la mayoría de los grupos no estuvo presente y cuando así fue lo hizo en forma leve. En los conejos del grupo con septicemia se presentó únicamente en grado leve en el 16,7% de los animales a diferencia del grupo de rinitis en los cuales el 66,6% lo presentaron en grados moderado a severo (33,3% moderado, 33,3% severo).

- Infiltración de células inflamatorias

El epitelio respiratorio y la lámina propia de la nasofaringe mostraron infiltración de células inflamatorias especialmente PMN de forma muy similar a lo descrito en epitelio de fosas nasales.

- Edema intersticial

El edema intersticial estuvo ausente en los grupos uno y dos y se presentó con grado leve únicamente en el 20% de los animales del grupo tres (datos no mostrados). En el

grupo cuatro este hallazgo estuvo presente en grado leve en el 50% y en grado moderado en el 33.3%. Los animales del grupo con rinitis tuvieron su mayor porcentaje en el grado leve (66.7%) con respecto al grado moderado (16.7%), a diferencia de los de septicemia cuyo mayor porcentaje estuvo en el grado moderado (50%) con respecto al grado leve (33.3%).

Discusión

En esta investigación se intentó una caracterización morfológica de las lesiones en fosas nasales y nasofaringe de conejos sanos en diferentes etapas de su desarrollo biológico así como de conejos con el síndrome de neumonía enzoótica en sus formas de rinitis o septicemia. Uno de los cambios más constantes en todos los animales analizados (sanos y enfermos) fue la vacuolización de las células del epitelio respiratorio que fue más marcada en fosa nasal (Fig. 2) que en nasofaringe (Fig. 14). Se pudiera pensar que estos cambios se debieran a artefactos de fijación; sin embargo, los tejidos obtenidos en este trabajo se fijaron por técnicas especializadas para microscopía electrónica que hacen muy difícil esa eventualidad toda vez que las muestras fueron tomadas in vivo, con instilación directa del fijador en las fosas nasales, con los animales sometidos a anestesia general. Refuerza esta propuesta el hecho de que en ningún otro de los tipos celulares que se encuentran en las vías respiratorias altas, fueron vistas alteraciones similares a las de las células ciliadas, o cualquier otro tipo de modificación que pudiera indicar diferente fijación. La explicación más factible es que la vacuolización de las células epiteliales respiratorias es un evento fisiológico; dada la necesidad de humidificar el aire en estas regiones se requiere un paso permanente de líquidos desde los capilares. Como se ha reportado anteriormente los capilares en las fosas nasales son fenestrados y de allí provendrían los fluidos que deben pasar el epitelio hasta llegar a la luz (Cauna and Cauna, 1975; Widdicombe, 1992).

La hiperplasia de células caliciformes se encontró principalmente en fosa nasal en grados de leve a moderado en algunos animales en los grupos uno y dos; sin embargo, en el grupo tres (51-69 días) un 30% de los animales mostró esta alteración en forma severa y en el grupo cuatro un 50% la tuvo con esta misma intensidad. Aunque este cambio se ha reportado principalmente en enfermedades de curso crónico como fibrosis quística, bronquitis crónica, bronquiectasia, etc (Donham et al., 1989), algunos autores han reportado hipertrofia e hiperplasia de células caliciformes en fosa nasal de ratas después de la instilación intranasal de LPS (Harkema et al., 1988; Harkema and Hotchkiss, 1991; Steiger et al., 1995). Shimizu y cols. (1996) encontraron que después de la infusión intranasal de endotoxina había aumento en el número de células caliciformes en el epitelio respiratorio de la rata, pero no había aumento en el número total de células. Ellos describen éste como un cambio metaplásico en lugar de hiper-

plásico producido por la conversión de células secretorias no granuladas en células caliciformes (Shimizu et al, 1996). No era objetivo de este trabajo hacer un estudio morfo-métrico de las células caliciformes y demás lesiones, por lo tanto no podemos estar ciertos si el cambio aquí referido fue hiperplasia o metaplasia. Steiger y col (1995) mostraron que la exposición a endotoxina incrementaba el almacenamiento y la liberación de moléculas similares a mucinas en el epitelio de las vías aéreas inferiores y propusieron diversos mecanismos que podían contribuir a la hipersecreción. En primer lugar la endotoxina podría actuar directamente sobre las células epiteliales y aumentar su secreción. En segundo lugar la presencia de células inflamatorias en las vías aéreas tratadas con endotoxina permitiría sugerir que los mediadores inflamatorios liberados por éstas pudieran estimular también la secreción de moco (Steiger et al., 1995). La hiperplasia de células caliciformes no fue importante en nasofaringe en ninguno de los grupos.

Con base en nuestras observaciones se pudiera colegir que de alguna manera todavía no muy clara, las células caliciformes jugarían un papel central durante el proceso infeccioso por las dos bacterias típicas del complejo respiratorio de los conejos, *P. multocida* y *B. bronchiseptica*. Se puede deducir de estos hallazgos que el involucramiento de tales células no se restringe sólo a los procesos crónicos, sino que por el contrario, y de acuerdo con otros (Harkema and Hotchkiss, 1991; Steiger et al., 1995; Shimizu et al., 1996) están presentes de manera muy activa en eventos agudos. Llama la atención que la hiperplasia se comportó de manera similar para los dos grupos de animales enfermos: de rinitis y de septicemia. El 30% de los animales del grupo tres mostró hiperplasia de células caliciformes en forma severa, se debe recordar que este grupo de animales se encuentra en el período de edad inmediatamente posterior al de mayor susceptibilidad a la enfermedad. Es notorio que con sólo unos pocos días de diferencia frente a los animales del grupo dos, el mayor de los cuales sólo es dos días menor que el primer animal del grupo tres, y entre los cuales media el período de más alto riesgo a desarrollar la enfermedad, se dé un cambio tan importante en el número de esta población celular. Lo único que se podría adelantar es que en los animales con mayor edad una activación de estas células pudiera tener efectos defensivos, frente a la permanente irritación y estímulo provenientes del ambiente de los galpones. Que estas células se encuentran involucradas de manera importante en la patogenesis de la enfermedad se deduce del daño físico sufrido por ellas en los animales enfermos, las cuales en un porcentaje cercano al 70% mostraron grados moderados de degeneración, siendo mas marcado en los que sufrían rinitis.

Dichas alteraciones en las células caliciformes, así como los reportes de Harkema y Hotchkiss (1991), Steiger y cols (1995) y Shimizu y cols (1996), y la clara evidencia de inmunomarcación contra antígenos de la *P. multocida* y la

B. bronchiseptica en su citoplasma (Botero e Iregui, 1999), nos permiten reforzar la hipótesis de que probablemente los antígenos reconocidos por los antisueros anti-*P. multocida* y anti-*B. bronchiseptica* utilizados en la prueba inmunohistoquímica se traten de las endotoxinas de las dos bacterias. Sería pertinente la pregunta acerca del papel que pudieran estar jugando estas eventuales endotoxinas en el citoplasma de las células caliciformes; se podría especular que estas células poseen algunas sustancias con función neutralizadora, las cuales se combinarían con las endotoxinas y serían expulsadas con el moco.

En las dos regiones anatómicas examinadas (cavidad nasal y nasofaringe) la célula inflamatoria predominante casi de manera exclusiva tanto en el epitelio como en la lámina propia, fueron los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) que se vieron infiltrando con diferente intensidad en todos los grupos de animales, pero en mayor proporción y con mayor severidad en el grupo cuatro (datos no mostrados). La presencia de otro tipo de células inflamatorias (linfocitos, macrófagos, células plasmáticas) tanto en epitelio como en lámina propia fue escasa. Este último hecho es bastante significativo si se tienen en cuenta los hallazgos similares en pulmón y vías de conducción aérea inferiores reportados por Mendoza, 1991 y Murillo e Iregui, 1993. En ninguno de los dos estudios pudo revelarse presencia significativa de células mononucleares como los linfocitos, plasmáticas o monocitos; siendo casi exclusiva la presencia de PMN y sus macrófagos alveolares. En el caso de la abundancia de PMN, Harkema and Hotchkiss (1991) encontraron que después de la instilación de endotoxina los neutrófilos eran la única célula inflamatoria evidente en la superficie del epitelio nasal, documentando la injerencia que estas células tienen sobre la inducción de secreción de moco por parte de las células caliciformes. Observaron estos autores que la población de otros leucocitos (p.e. linfocitos) en estos casos experimentales de infusión de endotoxina era nula, concluyendo, que éstos parecían no tener un papel importante en la hipersecreción de moco en el epitelio nasal (Harkema and Hotchkiss, 1991). Aunque no es un factor quemoatáctico para neutrófilos la endotoxina induce migración de éstos más potentemente que otros factores quemoatácticos (Issekutz and Bhimji, 1982; Colditz and Movat, 1984).

Las observaciones obtenidas en este trabajo, las documentadas por Mendoza (1991) y Murillo e Iregui (1993) así como los reportes de algunos autores (Gordon et al., 1991; Urbain et al., 1996), parecen favorecer el hecho de que las endotoxinas (LPS) de las bacterias Gram negativas y no necesariamente sólo las de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*, serían un factor determinante, por no decir que el principal, de la neumonía enzoótica de los conejos, así como el elemento primordial de la patogenesis de la enfermedad. De otro lado, el organismo hospedero le respondería a estas sustancias de manera predominante con PMN,

células con muchas posibilidades de patogenesis (Barroso-Aranda et al., 1991; Martin et al., 1992; Williams et al., 1993). Todo lo anterior podría indicar que la interrelación PMNs-células caliciformes es un evento importante en la fisiopatología de esta enfermedad si tenemos en cuenta que en los animales del grupo cuatro (enfermos) hubo un involucramiento importante de estos dos tipos.

La ausencia importante de mononucleares en la mucosa de las dos regiones analizadas, en particular en el grupo de enfermos, así como la escasa activación de los agregados linfáticos, indicarían en primera instancia que la inmunidad específica de mucosas no se ve involucrada de manera significativa en el síndrome objeto de estudio.

Conforme a la literatura (Percy et al., 1984; Shewen, 1986; Deeb et al., 1990; Frank et al., 1996) las vías aéreas superiores tienen una abundante población bacteriana, considerada como la flora normal de estas regiones; la mayoría, por no decir que la totalidad de estos estudios, se basan primordialmente en técnicas de aislamiento microbiológico y/o detección de anticuerpos específicos pero difícilmente aportan evidencias morfológicas de la ubicación, extensión y/o densidad de la colonización bacteriana. Algunos autores proponen que dicha flora, adicional a la producción de potenciales sustancias tóxicas para otros microorganismos invasores, coparía sitios de adherencia de estos últimos. Nuestros resultados demuestran que la existencia de la denominada flora bacteriana en vías aéreas superiores no es un hecho universal para todos y cada uno de los animales, ya que en el grupo uno el 90% de los conejos no presentó adherencia bacteriana alguna, al igual que el 50% y el 30% de los de los grupos dos y tres respectivamente; aún más, partiendo de la base de que los conejos de nuestros estudios viven en espacios densamente "contaminados" bien sea con la "flora normal", *P. multocida* o *B. bronchiseptica*, o con otros microorganismos y que la transmisión se vería altamente favorecida dada la cercanía de la respiración de unos con otros, sería de esperar mayores densidades bacterianas a las aquí reportadas. Nuestra documentación no apoya estas hipótesis.

En conclusión, los LPS de las bacterias gram negativas y en especial los de la *P. multocida* y la *B. bronchiseptica* serían factores claves en la fisiopatología de la enfermedad. El hospedero le respondería a estos antígenos con aumento en la población de células inflamatorias principalmente PMN, que inducirían ellos mismos el daño epitelial y a su vez activarían a las células caliciformes produciendo hiperplasia y aumento del almacenamiento de mucinas. Estas dos células (PMN y células caliciformes) serían claves en la fisiopatología de la enfermedad.

Agradecimientos: Al laboratorio de histopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFIA

- Adler KB, Holde-Stauffer WJ, and Repine JE. Oxygen metabolites stimulate release of high molecular weight glycoconjugates by cell and organ cultures of rodent respiratory epithelium via an arachidonic acid dependent mechanism. *J Clin Invest.* 85: 75-85, 1990.
- Barroso-Aranda J, Schmid-Schonbein GW, Zweifach BW, and Mathison JC. Polymorphonuclear neutrophil contribution to induced tolerance to bacterial lipopolysaccharide. *Circul Res* 69: 1196-1206, 1991.
- Botero L e Iregui CA. Caracterización por inmunohistoquímica de la relación entre la *Pasteurella multocida* y la *Bordetella bronchiseptica* con el epitelio de fosas nasales y nasofaringe durante el curso de la neumonía enzoótica. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia.* XLVI:3-12, 1999.
- Cauna N and Cauna D. The fine structure and innervation of the cushion veins of the human nasal respiratory mucosa. *Anat Rec.* 181:196, 1975.
- Colditz IG and Movat HZ. Kinetics of neutrophil accumulation in acute inflammatory lesions induced by chemotaxins and chemotaxinogens. *J Immunol.* 133: 2169-2173, 1984.
- Deeb B, DiGiacomo R, Bernard B I, and Silvernagel S, *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. *J Clin Microbiol.* 28:70-75, 1990.
- Donhan D. Association of environmental air contaminants with diseases and productivity in swine. *Am J Vet Res.* 52: 1723-1729, 1991.
- Frank GH, Briggs RE, Loan RW, Purdy ChW, and Zehr ES. Respiratory tract disease and mucosal colonization by *Pasteurella haemolytica* in transported cattle. *Am J Vet Res.* 57:1317-1320, 1996.
- Gordon T, Balmes J, Fine J, and Sheppard D. Airway oedema and obstruction in guinea pigs exposed to inhaled endotoxin. *Br J Ind Med.* 48:629-635, 1991.
- Harkema JR, Hotchkiss JA, Harmsen AG, and Henderson RF. In vivo effects of transient neutrophil influx on nasal respiratory epithelial mucosubstances. *Am J Pathol.* 130:605-615, 1988.
- Harkema JR and Hotchkiss JA. In vivo effects of endotoxin on intraepithelial mucosubstances in rat pulmonary airways. *Am J Pathol* 141 : 307-317, 1993. In: Harkema JR and Hotchkiss JA. In vivo effects of endotoxin on nasal epithelial mucosubstances Quantitative histochemistry. *Exper Lung Res.* 2: 743-761, 1991.
- Issekutz AC and Bhimiji S. Role of endotoxin in the leukocyte infiltration accompanying *Escherichia coli* inflammation. *Infect Immun.* 36: 558-566, 1982.
- Luna LG. Manual of Histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Co., New York, NY, 1968.
- Martin BA, Wright JL, Thommasen H, and Hogg JC. Effect of pulmonary blood flow on the exchange between the circulating and marginating pool of polymorphonuclear leukocytes in dog lungs. *J Clin Invest.* 69 : 1277-1285, 1992.
- Mendoza JA. Hallazgos morfológicos de microscopía óptica y electrónica en alvéolos pulmonares de conejos con el síndrome de neumonía enzoótica en la Sabana de Bogotá. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 1991.
- Murillo JC e Iregui C. Descripción morfológica de la presencia de bacterias durante el curso del síndrome neumonía enzoótica en conejos. *Revista Acovez* 17: 23-26, 1993.
- Percy DH, Prescott JF, and Bhasin JL. Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits in Canadá. *Can J Comp Med.* 48: 162-165, 1984.
- Shewen PR. Pasteurella. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. Edited by Gyler CL and Thoen ChO. First Edition. Iowa State University Press / Ames. pp 147-153, 1986.
- Shimizu T, Takahashi Y, Kawaguchi S, and Skakura Y. Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med.* 153: 1412-1418, 1996.
- Sills, RC, Morgan KT, and Boorman GA. Accessory nasal structures in toxicology studies. *Inhalation Toxicology.* 6(suppl):221-248, 1994.
- Steiger D, Hotchkiss J, Bajaj L, Harkema J, and Basbaum C. Concurrent increases in the storage and release of mucin-like molecules by rat airway epithelial cells in response to bacterial endotoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 12 :307-314, 1995.
- Urbain B, Prouvost PJ, Beerens MA, and Gustin P. Acute effects of endotoxin inhalation on the respiratory tract in pigs: interaction with ammonia. *Inhalation Toxicology.* 8:947-968, 1996.
- Widdicombe J. Physiologic Control. Anatomy and physiology of the airway circulation. *Am Rev Respir. Dis* 146:S3-S7, 1992.
- Williams JH, Patel SK, Hatakeyama D, Arian R, Guo K, Hickey TJ Liao S, and Ulich TR. Activated pulmonary neutrophils as early mediators of endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 8 : 134,144, 1993.

RMVZ