

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 DE LOS CONEJOS.¹

L. Botero* C.A. Iregui**

RESUMEN

*La neumonía enzoótica de los conejos se estudió por medio de técnicas de inmunomarcación con antisueros policlonales con las bacterias completas: *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* en fosas nasales y nasofaringe de 36 conejos sanos (cada uno con una diferencia de edad de dos días sobre el anterior, iniciando el día uno de edad y concluyendo el día 69) y 12 conejos enfermos (seis con signos de rinitis y seis con septicemia).*

*La inmunomarcación positiva anti-*P. multocida* y anti-*B. bronchiseptica* pudo verse en ambos epitelios de conejos desde el primer día de edad, tanto en sanos como en enfermos. En general la inmunomarcación siguió dos patrones diferentes: en la mayoría de los animales se vio como una coloración marrón difusa en la superficie de algunos epitelios, en el citoplasma de las células del epitelio respiratorio (ciliadas y caliciformes), en el citoplasma de las células glandulares y en el ápice de estas últimas, y en algunos pocos casos se vio como acúmulos densos de reacción de poca extensión. Los epitelios respiratorio, de transición y plano siempre fueron positivos a la inmunomarcación mientras que el epitelio olfatorio siempre fue negativo lo que hace suponer que existen diferencias de receptores para determinados antígenos en los distintos tipos epiteliales. Se propone que los antisueros policlonales que se utilizaron además de reconocer los microorganismos completos están reconociendo antígenos que pudieran estar siendo liberados al medio y tendrían la aparente propiedad de mezclarse y diluirse en los distintos componentes de la superficie de algunos epitelios; uno de estos antígenos pudiera ser el LPS o endotoxina.*

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 B et al., 1990). Tradicionalmente se considera a estos dos microorganismos como habitantes normales del tracto respiratorio; no obstante, la dinámica de su ubicación y densidad poblacional de acuerdo con diferentes etapas de desarrollo biológico de los animales, así como durante la enfermedad, no ha sido aclarada. Todas las consecuencias del proceso patológico inducido por los dos anteriores microorganismos en el pulmón, fueron documentadas en detalle por Mendoza y Murillo en 1991. Mendoza (1991) describió severos cambios en la microvasculatura pulmonar en conejos con neumonía enzoótica, que consistían en congestión, edema, microtrombos, fibrina en el espacio alveolar, secuestro intravascular y migración extravascular de heterófilos y hemorragia. Además reportó que el número de estructuras morfológicamente compatibles con bacterias era muy bajo y en general se localizaban en vías de conducción aérea. No observó morfologías que indicaran la presencia de parásitos, virus o bacterias en la luz alveolar (Mendoza, 1991).

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.

De otro lado, Murillo e Iregui (1993) observaron la presencia escasa de estructuras bacterianas en tres de doce conejos con la enfermedad natural. Las bacterias se encontraban asociadas al moco, a los cilios y fagocitadas por macrófagos, los cuales presentaban mayor grado de daño frente a aquellos que no las contenían. Ultraestructuralmente se observaron dos formas bacterianas que diferían en cuanto a morfología y localización; una de ellas libre en la luz bronquial y la otra asociada a los cilios. Además relacionaron estas dos bacterias con los agentes causales de la enfermedad *P. multocida* y *B. bronchiseptica*. Para concluir con la fase de caracterización de la enfermedad que abarca todo el tracto respiratorio, se programaron estas investigaciones en las fosas nasales y la nasofaringe con el objeto de intentar ver los primeros estadios de desarrollo de la enfermedad. Uno de los propósitos de esta investigación en particular fue determinar la variación de las poblaciones bacterianas en vías aéreas superiores (fosa nasal y nasofaringe), en distintas etapas del desarrollo biológico de los conejos. Fueron ellas: previa al período de mayor susceptibilidad a desencadenar la enfermedad (1-49 días de edad), en etapas posteriores a este período (51-69 días de edad) y en animales que sufrían la patología; las observaciones incluyeron análisis de las ubicaciones más frecuentes, modificaciones en sus densidades e interrelaciones patológicas de los microorganismos con el hospedero.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 48 conejos que procedían de una explotación comercial ubicada en el municipio de Funza en el departamento de Cundinamarca a una distancia de 22 Km al oeste de Santa Fe de Bogotá, 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. Se agruparon 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); y Grupo 4 conejos enfermos (12 gazapos). 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 Paraformaldehido 4%, Glutaraldehido 1% en buffer S colidina (Parafor G) aplicado en forma de aerosol. Despues del sacrificio de los animales con sobredosis de anestesia, la nasofaringe, en la cual se encuentra embebida la tonsila, se separó cuidadosamente de las coanas posteriores y de la tráquea. Se eliminó piel, mandíbula y músculos del cráneo y con la ayuda de una sierra caladora de pelo, se practicaron dos cortes transversales de fosas nasales (a nivel del primer molar) lo más delgados posible, aproximadamente de 0.5 cm que se postfijaron en el mismo fijador. Los cortes transversales de fosas nasales se colocaron en una solución decalcificadora de EDTA al 7% por un período de 20-30 días. Las muestras obtenidas se incluyeron en parafina y se efectuaron pruebas de inmunomarcación bacteriana utilizando la técnica de inmunoperoxidasa indirecta descrita por Mayer (Mayer and Walker, 1987), en donde los antisueros primarios polyclonales, anti *P. multocida* y anti *B. bronchiseptica* producidos en ovino (Bohórquez y Botero, 1993), se utilizaron en dilución 1:25 y 1:100 respectivamente y el antisero secundario (proteína G-peroxidasa) se utilizó en dilución 1:250. Para esta prueba la

inmunomarcación positiva para cada uno de los antisueros se definió como una coloración marrón de diferente intensidad y extensión en cada una de las regiones anatómicas y estratos histológicos analizados. La intensidad de la marcación se consideró como el grado de variación del tono marrón (leve, moderado o severo) en las células que la tomaban y la extensión de la marcación como el grado de expansión que abarcaba la coloración en los epitelios de cada una de las regiones que componen las estructuras en estudio (fosas nasales y nasofaringe). Las fosas nasales se dividieron en dos diferentes zonas para su análisis: la zona del septo, subdividida a su vez por la porción dorsal, central y ventral, y la zona de los cornetes.

RESULTADOS

Inmunomarcación en fosa nasal

Con la técnica de inmunomarcación con los antisueros anti *P. multocida* y anti *B. bronchiseptica* la marcación positiva para cada uno se vio como una coloración marrón de diferente intensidad y extensión en cada una de las células y regiones analizadas. La intensidad de la marcación se consideró como el grado de variación del tono de coloración marrón desde muy claro hasta muy oscuro el cual fue dividido en tres grados (leve, moderado o severo) en células en particular y la extensión de la marcación como el área de epitelio cubierta por la coloración en cada una de las zonas anatómicas examinadas (fosas nasales y nasofaringe), y sus subdivisiones correspondientes (septo ventral, medio y dorsal), cornetes, glándulas, tonsila, tipos de epitelio, etc. En general se observaron dos patrones diferentes de inmunomarcación: en el primero se vio como una coloración marrón difusa y extensa en la superficie del epitelio y dentro del citoplasma de algunas células epiteliales (Figura 1 A) y en el otro se observaba como acumulaciones granulados densos de reacción de poca extensión (Figura 1 B) principalmente en la superficie epitelial. Ambos



patrones estaban presentes de manera indistinta en todos y cada uno de los animales que fueron positivos, siendo más frecuente la forma difusa.

Se encontró marcación positiva anti *B. bronchiseptica* y anti *P. multocida* en todos los grupos experimentales. En el grupo uno el 54,4% de los conejos (seis de once) mostraron inmunomarcación positiva para los dos antisueros, en el grupo dos el 57,2% (ocho de catorce), en el grupo tres el 90% (nueve

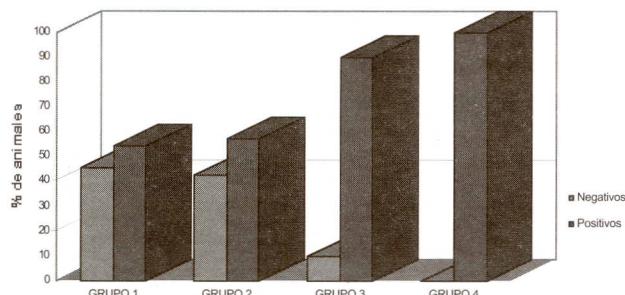


Figura 2. Porcentaje de animales positivos a la prueba de inmunoperoxidasa. Antisueros anti-*P. multocida* y anti-*B. bronchiseptica*.

de diez) y en el grupo cuatro el 100% de los conejos revelaron inmunomarcación positiva (Fig. 2) en los dos patrones antes mencionados. Los dos antisueros produjeron marcación positiva en los mismos animales aunque el antisuero anti *B. bronchiseptica* siempre presentó mayor extensión e intensidad con respecto al antisuero anti- *P. multocida*.

Pudo evidenciarse marcación positiva entre los cilios (Fig. 3) con una intensidad que se comportó en forma similar en todos los grupos aunque fue más severa en el grupo cuatro con respecto a los otros grupos (Fig. 4). La marcación positiva se pudo ver también en el citoplasma de las células caliciformes

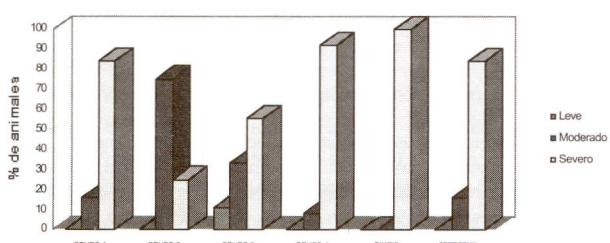


Figura 4. Inmunoperoxidasa indirecta anti *B. bronchiseptica*. Intensidad de la marcación entre los cilios Comparación entre los cuatro grupos.

y fue totalmente negativa en la lámina propia de cualquiera de los epitelios (Fig. 5). La intensidad de la marcación en las células caliciformes mostró un comportamiento similar en los grupos uno y dos en los cuales estuvo entre los grados leve y moderado, fue más severa en el grupo tres variando entre moderado y severo (20 y 40% respectivamente) y en el grupo

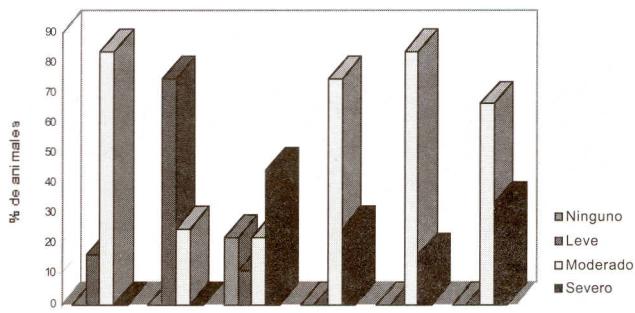


Figura 6 Inmunoperoxidasa indirecta anti *B. bronchiseptica*. Intensidad de la marcación en el citoplasma de las células caliciformes. Comparación entre los cuatro grupos.

cuatro en donde se encontró en grado moderado en un 75% y en grado severo en un 25% (Fig. 6). No se encontraron diferencias evidentes entre los grupos de rinitis y septicemia. En el citoplasma de las células ciliadas (Fig. 5) la intensidad de la marcación se vio de manera similar en los grupos uno al tres en los que estuvo principalmente en el grado leve, mientras que en el grupo cuatro más del 50% de las células mostró marcación en grado moderado (Fig. 7). Las glándulas de la lámina propia del epitelio respiratorio mostraron marcación

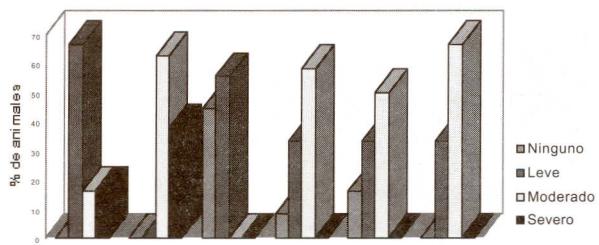


Figura 7. Inmunoperoxidasa indirecta anti *B. bronchiseptica*. Intensidad de la marcación en el citoplasma de las células ciliadas Comparación entre los cuatro grupos.

positiva en el citoplasma, en el ápice y también pudo verse en la luz de los conductos (Fig. 8). La intensidad de la marcación se comportó de manera similar en todos los grupos en estas estructuras.

La marcación positiva se extendió en las distintas subregiones anatómicas que conforman los órganos examinados y pudo verse en los diferentes tipos de epitelios: respiratorio (Fig. 9), de transición y plano (Figs. 10 A y B) pero nunca se observó en el epitelio olfatorio (Fig. 9). En el epitelio respiratorio y en el de transición la extensión de la marcación varió entre los grados moderado y severo para el antisuero anti *B. bronchiseptica* y de leve a moderado para el antisuero anti *P. multocida* y en el epitelio estratificado plano se vio en grado severo con el antisuero anti *B. bronchiseptica*

Pasa a la página 7

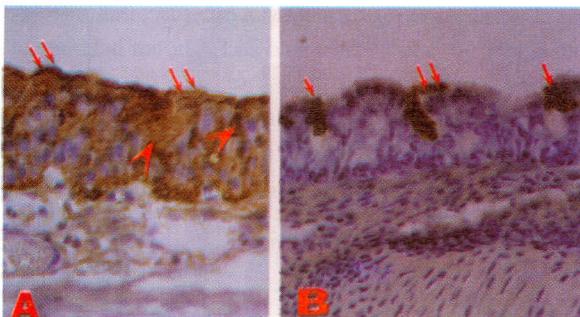


Figura 1

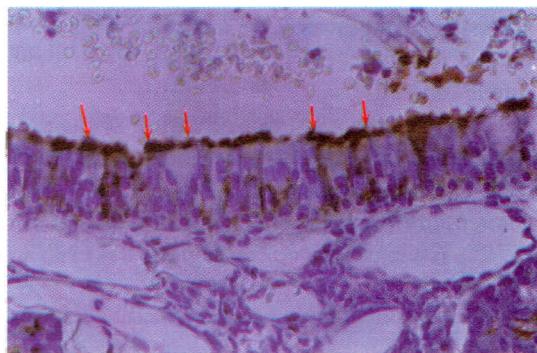


Figura 3

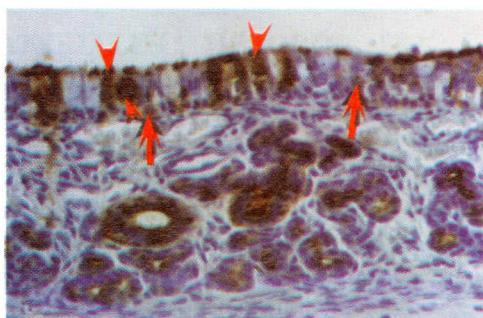


Figura 5

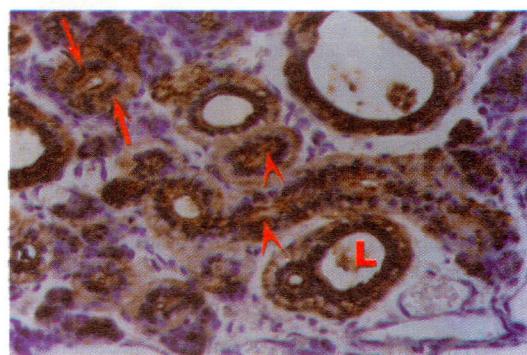


Figura 8

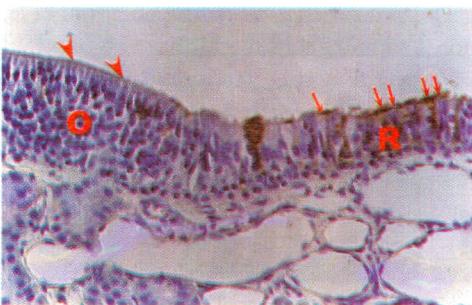


Figura 9

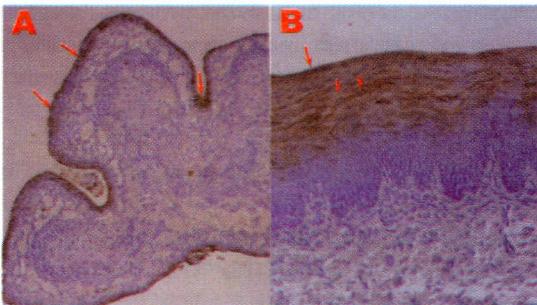


Figura 10

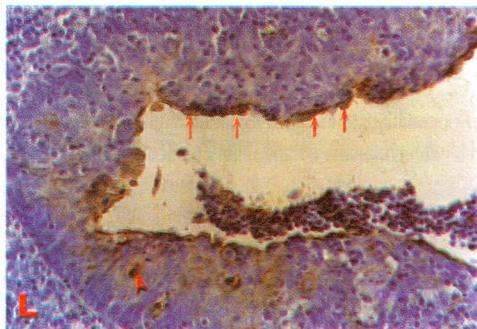


Figura 11

Figura 1. Inmunoperoxidasa indirecta anti *B. bronchiseptica* en fosa nasal de un conejo del grupo uno. A) Obsérvese el patrón de immunomarcación difuso en la superficie del epitelio (flechas) y en el citoplasma de algunas células epiteliales (cabezas de flecha). B) Obsérvese el patrón de marcación de acumulos densos en la superficie del epitelio (flechas).

Figura 3. Inmunoperoxidasa indirecta anti *B. bronchiseptica* en fosa nasal de un conejo del grupo uno. Obsérvese la inmunomarcación positiva entre los cílios (flechas) 400X aprox.

Figura 5. Inmunoperoxidasa indirecta anti *B. bronchiseptica* en fosa nasal de un conejo del grupo uno. Obsérvese la inmunomarcación positiva en el citoplasma de las células ciliadas (flechas) y en el citoplasma de las células caliciformes (cabezas de flecha). Nótese la ausencia de cualquier tipo de reacción en la lámina propia. 200X aprox.

Figura 8. Inmunoperoxidasa indirecta anti *B. bronchiseptica* en fosa nasal de un conejo del grupo uno. Obsérvese la inmunomarcación positiva en el citoplasma de células glandulares (flechas), ápice de las mismas (cabezas de flecha) y luz de conductos L. Nótese la ausencia de cualquier tipo de reacción en la lámina propia. 400X aprox.

Figura 9. Inmunoperoxidasa indirecta anti *B. bronchiseptica* en fosa nasal de un conejo sano del grupo uno. Obsérvese la inmunomarcación positiva en epitelio respiratorio (flechas) y negativa en el epitelio olfatorio (cabezas de flecha). Se aprecia la tajante división de marcación entre el epitelio olfatorio (O) y el respiratorio (R). 400X aprox.

Figura 10. Inmunoperoxidasa indirecta anti *B. bronchiseptica* en la tonsila en un animal del grupo uno. Obsérvese la inmunomarcación positiva A) en el epitelio de transición y B) en el epitelio plano.

Figura 11. Inmunoperoxidasa indirecta anti *B. bronchiseptica* en la tonsila en un animal del grupo uno. Obsérvese la marcación leve en el epitelio reticulado (flechas) y negativa en tejido linfoidal (L). Algunos leucocitos libres en la cripta y posiblemente intraepiteliales, presentan reacción igualmente positiva (cabezas de flecha). 200X aprox.

y moderado con el antisuero anti *P. multocida*. La porción ventral del septo mostró la mayor intensidad de marcación en comparación con las porciones central y dorsal del mismo y los cornetes. En el aparato vomeronasal la marcación siempre fue negativa. En todos los grupos la marcación positiva mostró la tendencia a extenderse de forma más marcada en las porciones ventral y central del septo y en los cornetes.

Inmunomarcación en nasofaringe

La inmunomarcación en nasofaringe se comportó en forma similar a la vista en fosa nasal aunque en algunas células como en las caliciformes y en las glandulares la marcación se vio en grado más leve y en las células ciliadas estuvo casi ausente en todos los grupos. La marcación se extendió en el epitelio respiratorio de manera severa en todos los animales positivos con el antisuero anti *B. bronchiseptica* y de manera moderada con el antisuero anti *P. multocida*. El epitelio estratificado plano igualmente mostró marcación positiva en grado severo con el antisuero anti *B. bronchiseptica* y en grado leve a moderado con el antisuero anti *P. multocida*.

En la tonsila se encontró marcación positiva en el epitelio estratificado plano en grados de moderado a severo para el antisuero anti *B. bronchiseptica* y en grados más leves y en menor número de animales para el antisuero anti *P. multocida*. En el epitelio reticulado hubo marcación positiva en grado leve con el antisuero anti *B. bronchiseptica* en el 50% de los conejos (Fig. 11) y no se encontró ninguna marcación con el antisuero anti *P. multocida*. En el tejido linfoideo no se vio marcación para ninguno de los dos antisueros (Fig. 11).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las pruebas de inmunomarcación con los antisueros anti *B. bronchiseptica* y anti- *P. multocida* demuestran que la técnica empleada aquí tiene un alto grado de confiabilidad. En primer lugar se utilizaron dos tipos de controles negativos; en el primero se reemplazó el primer antisuero (anti *B. bronchiseptica* o anti *P. multocida*) por buffer fosfato salino (PBS) y en el segundo se remplazó el segundo antisuero (proteína G peroxidasa) igualmente por buffer. Los controles negativos nunca mostraron inmunomarcación alguna. Además, los tejidos de los animales experimentales y principalmente en fosa nasal fueron ellos mismos controles positivos y negativos de la marcación, ya que la inmunomarcación positiva se distribuyó sobre los epitelios respiratorio, de transición y plano pero nunca en el epitelio olfatorio; finalmente, el tejido conectivo de lámina propia, el hueso, el cartílago, y las otras estructuras histológicas, de la misma manera nunca dejaron ver marcación positiva alguna, confiriéndole gran certeza a la técnica.

La inmunomarcación positiva con los antisueros policlonales anti *B. bronchiseptica* y anti *P. multocida* se observó tanto en animales sanos desde el primer día de edad así como en los enfermos por rinitis y septicemia, aunque el porcentaje de positividad aumentó proporcionalmente con la edad desde un 54,4% en los animales del grupo uno (1-21 días), pasando por el 90% en los del grupo tres (51-69 días), hasta un 100% en el grupo cuatro (enfermos) (Fig. 2). La marcación se vio en la mayoría de los animales como una coloración marrón difusa en la superficie de algunos epitelios en las dos regiones analizadas, en el citoplasma de las células del epitelio respiratorio (caliciformes y ciliadas), en el citoplasma de las células glandulares y en el ápice de estas últimas (Figs. 5 y 8). Menos frecuente se encontró un patrón de acúmulos granulados densos de reacción de poca extensión (Fig. 1). Aparentemente los dos patrones responden a dos distribuciones diferentes de uno o varios antígenos (Ags); en el primer caso (difusa) se presume la marcación para uno o más Ags libres, mientras que en el segundo se supone la detección del o de los mismos Ags, asociado(s) a un microorganismo completo.

Es claro que hay una tendencia al incremento del número de animales positivos a medida que se avanza en la edad para involucrar definitivamente al 100% en el caso de los enfermos; aparte de esta diferencia numérica, tanto en la intensidad como en la extensión de la marcación en particular de cada conejo no pueden apreciarse variaciones contundentes entre los distintos grupos; así los seis animales positivos del grupo uno mostraron similares grados de intensidad y extensión frente a los del grupo cuatro. Lo que se puede deducir de este hallazgo es que la sola presencia de uno o varios microorganismos y/o sus Ags con las deseadas intensidad y extensión no es suficiente argumento para causar enfermedad.

Respecto a la localización anatómica de la marcación dentro de las distintas estructuras que conforman la fosa nasal, se encontró un claro privilegio de la distribución de la reacción positiva por las regiones ventrales del septo y en menor medida por los cornetes. Tal preferencia se podría relacionar en primer término con la distribución de algunos de los epitelios, en concreto del respiratorio y en los cornetes el de transición. Lo anterior corroboraría no sólo lo expresado arriba en el sentido de que hay una predilección no suficientemente explicada por ciertos tipos de epitelios, sino que obedecería a los patrones reconocidos de deposición de Ags en fosas nasales, a saber: la sedimentación por gravedad en la parte ventral del septo y la impactación inercial en los cornetes (Brain and Valberg, 1979).

La distribución de la marcación en muchos casos siguió los cánones esperados, esto es, su ubicación preferencial en la



superficie apical de células epiteliales del epitelio respiratorio; no obstante, resultó sorprendente la presencia de Ag. tanto en el interior de algunos tipos celulares (caliciformes y ciliadas), como también dentro del citoplasma y sobre la superficie de las células glandulares (Fig. 8).

Es evidente además una preferencia por cierta clase de epitelios como el respiratorio, el de transición, el plano y el de las glándulas anexas al epitelio respiratorio (Figs. 9 y 10 A y B). En ningún caso reaccionaron los antisueros con células del epitelio olfatorio, ni con las glándulas anexas a éste (glándulas de Bowman) (Fig. 9). Se puede argumentar como lo señalan distintos autores (Aly et al., 1977; Beachey, 1981; Hoepelman and Tuomanen, 1992; Bonilla and García, 1993) que existen diferencias de receptores para determinados Ags en los distintos tipos epiteliales. Sin embargo, con todo lo válidas que pudieran ser las anteriores hipótesis, no deja de ser preocupante que el microorganismo completo nunca se vio adherido al epitelio olfatorio por ninguna de las técnicas aquí empleadas. Si un microorganismo es oportunista, como en repetidas ocasiones se ha invocado para las bacterias aquí involucradas (*B. bronchiseptica* y *P. multocida*) (Watson et al., 1975; Lu et al., 1978; Bonilla and García, 1993), la duda que asalta es por qué no avanza a epitelios de bajo recambio metabólico que favorecerían su más fácil expansión?; en últimas, por que las bacterias evolutivamente no privilegiaron su acceso a estructuras metabólicamente más lentas y con aparentes menores posibilidades de defensa que en teoría le facilitarían una más tranquila colonización y estancia. Por qué preferirían entonces epitelios tan dispuestos para la defensa como el respiratorio con una tasa de batimiento ciliar de 15 hertz (Lund, 1994) en esta región, con su correspondiente capa de moco y todas las sustancias de defensa que hoy en día se sabe están contenidas en él, entre ellas las muy específicas IgA? Se podría contraargumentar que precisamente las bacterias necesitarían epitelios de alto recambio para sus necesidades de multiplicación y crecimiento. Aún así, esta reflexión parece más propicia para estados de enfermedad que de salud de los animales; epitelios de tan baja tasa metabólica como el olfatorio, en condiciones de no proliferación exponencial de las bacterias, probablemente serían capaces de suministrar los nutrientes requeridos a una muy baja población microbiana como la que aquí se observó en los animales sanos. Finalmente, se podría decir lo mismo del o de los antígenos encontrados?, necesitarían ellos de dicha actividad celular acelerada?

Dentro de los grupos epiteliales que mostraron reacción positiva, a su vez, hubo predilección por algunos tipos celulares, a saber: en el respiratorio fue notoria la predominancia de marcación en las células caliciformes, seguidas por las ciliadas; en el de transición como en el plano,

la preferencia de la reacción dependió de la ubicación de las células dentro de las distintas capas del epitelio, así, la tinción fue más fuerte en las de las capas superficiales. Finalmente la marcación se localizó en distintas regiones de cada célula en particular, mientras que en las células caliciformes la más fuerte intensidad de marcación fue dentro del citoplasma, en las ciliadas ésta se ubicó preferencialmente entre los cilios, con menor frecuencia dentro del citoplasma. En algunos casos la distribución del o de los Ags pareció penetrar a los espacios interepiteliales. Este cambio pudo también ser constatado en el epitelio glandular, en especial en el epitelio de los conductos de las glándulas y en el epitelio de transición, no así en el plano.

De lo anterior pareciera deducirse que los antisueros, en especial el de *B. bronchiseptica* y de manera particular la forma difusa de la reacción, aquella que se sospecha se trata de Ags libres, y en menor grado el de *P. multocida*, prefirieran ciertos sitios en las células con componentes específicos de las mismas, esto es, regiones celulares con alto contenido de glicoproteínas; dicha tendencia pudiera hacernos pensar por lo menos en la posibilidad de tres situaciones diferentes: 1- que los antisueros estuvieran reconociendo de manera cruzada Ags de las células del hospedero 2- que los Ags de los microorganismos efectivamente se hubieran dispersado en dichas estructuras del hospedero y 3- que ambas hipótesis anteriores fueran ciertas simultáneamente. En el primer caso, nos podría indicar posiblemente la producción de Ags similares tanto por parte de células específicas del hospedero como por parte de los patógenos. Esto es sustentado por autores como Mandrell et al., (1988) y Mandrell and Apicella, (1993), quienes reportaron que los lipooligosacáridos (LOS) de las bacterias Gram negativas *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* son antigenicamente idénticos a los glicoesfingolípidos presentes en las células humanas, demostrando la existencia de compuestos idénticos entre el hospedero y las bacterias, apoyando la primera hipótesis aquí señalada y permitiéndonos pensar en un mimetismo ganado evolutivamente por parte de las bacterias, que les permitiría permanecer dentro de los animales sin ser reconocidas como extrañas.

En la segunda posibilidad, que los Ags ciertamente fueran de origen microbiano y que se distribuyeran sobre las diferentes superficies epiteliales y además penetraran al citoplasma de las células epiteliales, habría que tener en cuenta algunas propiedades del o de los Ags para poderse mezclar y diluir en distintos componentes de la superficie de algunos epitelios con diferentes propiedades fisicoquímicas. En principio tales antígenos debieran tener propiedades anfifílicas si tenemos en cuenta que por lo menos deben diluirse en dos medios diferentes: el moco (hidrosoluble) y la membrana apical (li-

posoluble) de las células epiteliales, la cual en muchas ocasiones tendrían que atravesar. Sobre la base de estas propiedades químicas podrían avanzar hasta el espacio interepitelial y aún hasta el citoplasma. De esta forma, el o los Ags. tendrían la posibilidad de ingresar a las células por tres distintas vías: 1- si en verdad se trata de un Ag. con propiedades anfífilicas que pudiera ingresar por la vía de la liposolubilidad (Robertson, 1981; Avers, 1992). 2- en el caso de que no lo fuera se podría pensar que el ingreso fuera vía fagocitosis lo que nos haría suponer que las células epiteliales del tracto respiratorio no solo pudieran ingerir, sino además, y por qué no, procesar Ag. al igual que las células epiteliales en tracto gastro intestinal (Bland and Warren, 1986 a y b). Algunos trabajos han reportado que las células epiteliales intestinales son capaces de presentar antígeno directamente a los linfocitos (Bland and Warren, 1986 a y b). Estos reportes han identificado Ags. de la clase II del CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) en enterocitos. Se ha propuesto que los Ags. absorbidos por este epitelio forman complejos con Ags. de la clase II del CMH que son exocitados en la membrana basolateral (Bland and Warren, 1986a, Bland and Warren 1986 b). 3- finalmente, como se sabe (Jacquot et al., 1992), las células epiteliales respiratorias, en especial las ciliadas, tienen la propiedad de transportar en las dos vías (hacia el interior y/o hacia el exterior) grandes cantidades de fluidos, por sistemas de vesículas que no requieren necesariamente la disposición de receptores específicos. Dentro de esas vesículas pudieran diluirse Ags hidrosolubles que serían interiorizados en el citoplasma.

En lo esencial aunque con menor intensidad, la reacción positiva con los antisueros anti *B. bronchiseptica* y anti *P. multocida* en nasofaringe se comportó de manera similar a lo observado en fosa nasal, en particular lo referente a la extensión en epitelio respiratorio y plano, con énfasis en las células caliciformes y entre los cilios, fue menos intensa en células glandulares, en el espacio interepitelial y fue completamente negativa en el citoplasma de las células ciliadas.

La situación en tonsila merece comentario aparte. La marcación positiva se limitó prácticamente al epitelio plano de la estructura, sin intervención importante del epitelio reticulado y nula presencia en el interior de los agregados linfoideos. Algunos autores han propuesto que por su morfología el epitelio reticulado de la tonsila puede poseer funciones importantes como favorecer un íntimo contacto entre las células efectoras de respuesta inmune y el medio ambiente, facilitar el transporte de antígenos, sintetizar continuamente el componente secretorio de la IgA secretoria y contener un pool de inmunoglobulinas que lo harían un compartimiento especializado, importante en las funciones inmunológicas de

la tonsila (Kataura et al., 1992; Perry, 1994). Estudios con *P. haemolytica* proponen que los serotipos ST1 y ST2 de la bacteria pueden sobrevivir allí por largos períodos en animales sanos. Reportan además estos estudios que el microorganismo es fácilmente recuperable por aislamientos microbiológicos de las tonsillas de animales sanos no vacunados y que por su proximidad con la nasofaringe sería el sitio ideal de permanencia de las Pasteurellas en animales sanos (Frank et al., 1994; Frank et al., 1996). En verdad la función de las tonsillas es un hecho no suficientemente dilucidado. Nosotros no pudimos comprobar la presencia de microorganismos en el interior de estas estructuras por ninguna de las técnicas empleadas y la marcación con IPO reveló un patrón más bien difuso y muy limitado a las capas más superficiales del epitelio plano mas no del reticular, por lo tanto no podemos corroborar lo encontrado por los autores antes citados.

No podemos a partir de nuestros hallazgos intentar una explicación más confiable de la que existe de la función de las tonsillas. En todo caso, su patrón de marcación de los Ags. no difiere del encontrado en los otros epitelios, esto es, se limita solamente a las capas superiores sin que haya una evidencia de penetración más allá de éstas. Disconfirman las anteriores observaciones una de nuestras hipótesis de trabajo en la que sosteníamos que las tonsillas muy probablemente serían el sitio privilegiado por las bacterias para su ubicación antes de diseminarse a otras partes del organismo, dada la aparente tranquilidad de su luz alejadas de la actividad mucociliar. Podemos sostener con estos hallazgos, unidos a las alteraciones encontradas por la técnica de H.E. (que se describen en otro artículo), y que revelaban la ausencia importante de células mononucleares libres, en particular en el grupo de conejos enfermos, así como la escasa activación de los agregados linfoideos, que las tonsillas y en general el sistema linfoide de mucosas en conejos no jugaría un papel determinante en esta enfermedad.

En el caso de los conejos la más importante y hasta ahora la única toxina identificada en *P. multocida* tipo A y en la *B. bronchiseptica* es la endotoxina o lipopolisacárido (LPS) específico de cada una. Otras exotoxinas como las RTX o toxinas protéicas como la toxina lábil al calor de la *P. multocida* tipo D no se han descrito para aquellas bacterias (DiGiacomo et al., 1989; Woolcock, 1992). El LPS es un constituyente de la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram negativas y ejerce una amplia variedad de efectos biológicos que se manifiestan en graves alteraciones patofisiológicas como fiebre, leucopenia, CID (coagulopatía intravascular diseminada), y falla multiorgánica. Debido al carácter anfífilico del LPS se había postulado anteriormente que podía él interactuar de una manera no específica con células del

hospedero por inserción hidrofóbica dentro de la membrana celular (Schletter et al., 1995). Se sabe hoy que existen receptores específicos para la unión de LPS como la proteína de membrana CD18/CD11 la cual media su fagocitosis llevando a la degradación del LPS pero no necesariamente a activación de la célula. El único receptor específico para LPS capaz de mediar activación celular es una glicoproteína de 55 k-DA llamada CD14 que existe en dos formas, una unida a la membrana (mCD14) y otra soluble presente en el suero (sCD14) (Pugin et al., 1993; Schletter et al., 1995). Cuando la endotoxina es liberada en el plasma se une a la proteína unidora de lipopolisacárido (LBP) y este complejo es reconocido por el receptor CD14 en las células presentadoras de Ag. (Bélanger et al., 1994, Schumann et al., 1994, Su et al., 1995). La unión del LPS con células epiteliales también podría ser mediada por mCD14 ya que éste también se ha detectado en células epiteliales (Pugin et al., 1993); además su contraparte soluble en el plasma (sCD14) puede mediar esta unión con células no sólo epiteliales sino endoteliales y musculares (Pugin et al., 1993; Landmann et al., 1996). Tomando en cuenta todo lo inmediatamente discutido y con base en los resultados anteriormente analizados se podría postular que el LPS sería el Ag. o uno de los Ags que estarían siendo reconocidos en la inmunomarcación bacteriana de nuestro estudio.

Si en efecto este Ag. se trata de endotoxina o ésta es parte constituyente de un agregado mayor de Ags se podrían proponer tres hipótesis explicativas de la presencia de ella allí: 1- que la endotoxina esté siendo liberada por las bacterias durante la infección (Lee et al., 1992) y en ese caso no sería necesario un número abundante de estructuras bacterianas completas para inducir enfermedad, ya que como se dijo la sola endotoxina es suficiente para iniciar el proceso patológico. 2- que la endotoxina se originara no sólo de las bacterias en el hospedero sino que proviniera en mayor proporción de bacterias del medio ambiente, lo que también eximiría en cierta forma de concentraciones elevadas de microorganismos en el hospedero. La primera hipótesis la respaldan nuestros hallazgos morfológicos de H.E. y microscopía óptica de alta resolución (MOAR) (datos no mostrados) que revelaban la escasa presencia de bacterias en las dos regiones analizadas. Como lo decíamos anteriormente, los trabajos de Mendoza (1991) y Murillo e Iregui, (1993) no pudieron demostrar cantidades apreciables de bacterias en el tracto respiratorio bajo, ellos plantearon de manera consistente la hipótesis de que la endotoxina pudiera ser liberada durante la infección en el tracto respiratorio alto y difundirse por vía circulatoria a las partes más bajas del tracto respiratorio. Esta tesis aparentemente gana fuerza a la luz de nuestros nuevos hallazgos y se ve complementada con nuevas observaciones, como fue la marcación encontrada en las IPO de pulmones tanto de animales

sanos como enfermos (datos no presentados), en las que se evidenció un patrón de tinción a lo largo del epitelio de revestimiento de las vías aéreas mayores intermedias, bronquios principalmente y sus primeras ramificaciones, sugiriendo otra posible ruta de expansión del o de los Ags por vía aérea, induciendo actividad inflamatoria en epitelios profundos del pulmón. 3- que éstas dos hipótesis se pudieran suceder simultáneamente.

La escasa presencia de estructuras bacterianas, sólo de manera moderada en un animal del grupo 1 (1-21 días), en contraste con la extensa reacción a los antisueros desde los primeros días de vida de los animales sanos, podrían respaldar la hipótesis de que el o los Ags identificados por la técnica de IPO, provenga(n) de manera más importante del ambiente de los galpones antes que de bacterias adheridas a los epitelios del hospedero. Esta suposición tiene un buen respaldo en el trabajo adelantado por Moreno (1995), quien en aislamientos microbiológicos en animales de la misma granja de donde provenían los gazapos del experimento aquí adelantado no pudo identificar ninguna de las dos bacterias en conejos de 1 a 21 días. Diversos autores han implicado a la endotoxina presente en el aire de los galpones como una de las desencadenantes de problemas respiratorios junto con otros contaminantes del aire como polvo y amoniaco, tanto en porcinos como en trabajadores de porquerizas (Donhan, 1991; Gustin et al., 1994; Gordon and Harkema, 1995; Urbain et al., 1996 a y b). Se necesita establecer la presencia de LPS en el ambiente de los galpones de conejos.

Otro argumento a favor de que el Ag o Ags en cuestión se trata de LPS, es el estado y actividad de las células caliciformes encontradas en este estudio (datos no mostrados) que mostraron un grado severo de hiperplasia y degeneración principalmente en los conejos del grupo de los enfermos. Aunque se trate de esta posibilidad, hay un elemento en la distribución de la inmunomarcación bastante llamativo y que merece algún tipo de explicación. De manera bien clara por cierto, la tinción se limitó a los epitelios, a lo sumo ingresó al citoplasma de algunas células, las caliciformes principalmente, pero nunca descendió hasta elemento alguno de la lámina propia (Fig. 5); pudiéramos adelantar tres posibilidades de la interrelación resultante entre el o los Ags y las células epiteliales 1- que sea(n) metabolizado(s) en la superficie o en el citoplasma de las células epiteliales en partículas menores dejando o expulsando la porción marcada de la molécula con IPO en la superficie epitelial para luego ser transportada por el sistema mucociliar. Esto parece factible a la luz de lo encontrado en el lumen de las fosas nasales de algunos animales aquí examinados; y finalmente, la porción de la(s) molécula(s) activa patógenamente podría pasar a capas

inferiores, sin que ya pueda ser detectada por la técnica de IPO. 2- que el o los Ags pudiera(n) activar a las células epiteliales e inducirlas a la producción de mediadores inmunoinflamatorios, sin que el o los Ags penetraran al torrente circulatorio del hospedero, en consecuencia, todos los cambios que se derivarían del proceso infeccioso o de la presencia de la toxina, serían iniciados en el epitelio. Se sabe hoy en día de todas las moléculas inmunomediadoras de comunicación entre células de distinto tipo y que han sido involucradas en sepsis. Se ha demostrado la liberación de citokinas como la IL1, IL6, IL8, FNT e INF γ por

células epiteliales que han sido involucradas de manera constante en septicemia (Issekutz et al., 1990; Billiau and Wandekerckhove, 1991; de Boer et al.; 1992; Stadnyk, 1994). De tal suerte que para el desencadenamiento de todo el proceso fisiopatológico de sepsis bastaría la activación de las células epiteliales, las cuales a través de la producción de mensajeros intercelulares inducirían bien sea de forma local o sistémica las respuestas del hospedero y 3- las hipótesis anteriores no son excluyentes y más bien pudieran ser complementarias.

Bibliografía

- Al-Lebban Zs, Corbeil LB, and Coles EH. Rabbit pasteurellosis: induced disease and vaccination. Am J Vet Res 49: 312-316, 1988.
- Aly R, Shinefield HI, Strauss WG, and Maibach HI. Bacterial adherence to nasal mucosal cells. Infect and Immun. 17: 546-549, 1977.-
- Avers ChJ. Biología celular. Grupo Editorial Iberoamericana. pp 135-143, 1992.-
- Beachey EH. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. Rev J Infect Dis. 143:325-345, 1981.
- Bélanger M, Dubreuil D, and Jacques M. Identification of porcine respiratory tract mucus proteins bindig lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Mic Pathog Immun Res. 730: 249-251, 1994.
- Billiau A and Vanderkerckhove F. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediator in the pathogenesis of sepsis and septic shock. Europ Jour Clin Invest . 21 : 559- 573, 1991.
- Bland PW and Warren LG. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. I- Kinetic antigen specificity and blocking by anti-Ia antisera. Immunology. 58:1-7, 1986 (a).
- Bland PW and Warren LG. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. II- Selective induction of suppressor T cell. Immunology. 58:9-14, 1986 (b).
- Bohórquez IA y Botero L. Elaboración de sueros policlonales hiperinmunes contra *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* y producción de un segundo antisuero conjugado con peroxidasa para su utilización en una técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 1993.
- Brain JD and Valberg PA. Deposition of aerosol in the respiratory tract. Am Rev Respir Dis 120: 1325-1373, 1979. In: Jubbb KVE, Kennedy PC and Palmer N. Pathology of Domestic Animals. Third Edition Vol 2. Academic Press, 1985.
- Bonilla FL and García GA. Adherence of *Pasteurella multocida* to rabbit respiratory epithelial cells in vitro. Rev Lat Amer Microbiol. 35: 361-369, 1993.
- de Boer JP, Wolbink GJ, Thijs LG, Baars JW, Wagstaff J, and Hack CE. Interplay of complement and cytokines in the pathogenesis of septic shock. Immunopharmacol. 24:135-148, 1992.
- 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.
- DiGiacomo RF, Deeb BJ, Giddels WE, Bernard BL, and Chengappa MM. Atrophic rhinitis in New Zealand white rabbit infected with *Pasteurella multocida*. Am J Vet Res. 50:1460-1465, 1989.
- 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. Serotype-specific inhibition of colonization of the tonsils and nasopharynx of calves after *Pasteurella haemolytica* serotype A1 after vaccination with the organism. Am J Vet Res. 55:1107-1110, 1994.
- 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 and Harkema JR. Cotton dust produces an increase in intraepithelial mucosubstances in rat airways. Am J Respir Crit Care Med 151:1981-1988, 1995.
- Gustin P, Urbain B, and Prouvost J and Ansay M. Effects of atmospheric ammonia on pulmonary hemodynamics and vascular permeability in pigs: Interaction with endotoxins. Toxicol Appl Pharmacol. 125: 17-26, 1994.
- Hoepelman AIM and Tuomanen EI. Consequences of microbial attachment: Directing host cell functions with adhesins. Infect Immun. 60:1729-1733, 1992.
- Issekutz AC and Bhimji S. Role of endotoxin in the leukocyte infiltration accompanying *Escherichia coli* inflammation. Infect Immun. 36: 558-566, 1982.
- Jacques M and Foiry b. Electron microscopic visualiation of capsular material of *Pasteurella multocida* types a an D labeled with polyclonnic ferretin. J Bacteriol. 169: 3470-3472, 1987.
- Jacquot J, Hayem A, and Galabert C. Functions of proteins and lipids in airway secretions. Eur Respir J. 5:343-358, 1992.
- Kataura A, Harabuchi Y, Matsuyama H, and Yamanaka N. Immunohistological studies on immunocompetent cells in palatine tonsil. In Advances in Oto-Rhino-Laryngology, vol 47, A Clinically Orientated Update (de GB Gallo), pp 97-100. Basel:Karger. In: Perry ME. The specialised structure of crypt epithelium in the human palatine tonsil and its functional significance. J Anat. 185:11-127.
- Landmann R, Reber AM, Sansano S, and Zimmerli W. Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. J-Infect-Dis. 173: 661-8, 1996
- Lee MD, Glisson JR and Wooley RE. Factors affecting endotoxin release from the cell surface of avian strains of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 31: 369-378, 1992.
- Lu YS, Ringler DH, and Park JS. Characterization of *Pasteurella multocida* isolates from the nares of healthy rabbits with pneumonia. Lab Anim Sci. 28: 691-697, 1978.
- Lund VJ. Toxicity of nasal respiratory mucosa in humans. Inhalation Toxicol, 6(suppl): 277-287, 1994.
- Mandrell RE, Griffiss JM, and Macher BA. Lipooligosaccharides (LOS) of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* have components that are immunochemically similar to precursors of human blood group antigens. Carbohydrate sequence specificity of the mouse monoclonal antibodies that recognize crossreacting antigens on LOS and human erythrocytes. J Exp Med. 168:107, 1988.-



- Mandrell RE and Apicella MA. Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: Molecular mimicry and host-modification of LOS. *Immunobiol.* 187: 382-402, 1993.
- Marks MI, Ziegler EJ, and Douglas H. Induction of immunity against lethal *Haemophilus influenzae* Type b infection by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Clin Invest.* 69: 742-749, 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.
- Moreno EA. Aislamiento y tipificación de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* involucradas en el complejo neumónico de los conejos en una granja de la Sabana de Bogotá. Tesis, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1995.
- 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.
- Perry ME. The specialised structure of crypt epithelium in the human palatine tonsil and its functional significance. *J Anat.* 185:11-127, 1994.
- Pugin J, Schüer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevith R, and Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci.* 90:2744-2748, 1993.
- Pyliotis NA and Mukkur TKS. Ultrastructural observations on *Pasteurella multocida* type A (bovin origin). *Res Vet Scien.* 31: 87-89, 1981.
- Robertson JD. Membrane structure. *J Cell Biol.* 91: 189s, 1981.
- Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, and Rietschel ET. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol.* 164:383-389, 1995.
- Schumann RR, Rietschel ET, and Loppnow H. The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LPB) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med Microbiol Immunol.* 183:279-297, 1994.
- Stadnyk AW. Cytokine Production by epithelial cells. *Faseb J.* 8:1041-1047, 1994.
- Su GL, Simmons RL, and Wang SC. Lipopolysaccharide binding protein participation in cellular activation by LPS. *Crit-Rev-Immunol.* 15: 201-14, 1995.
- Urbain B, Gustin P, Beerens D, Ansay M. Effets pulmonaires de la nébulisation d'endotoxines chez le porc. *Journés Rech Porcine en France.* 28:349-354, 1996 (a).
- 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 (b).
- Watson WT, Goldsboro JA, Williams FP, and Suerur R. Experimental respiratory infection with *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in rabbits. *Lab Anim Sci.* 25:459-464, 1975.
- Woolcock JB. The biology of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. In: *Pasteurellosis in production animals*.
- Patteen BE, Spencer RB, Johnson D, Hoffman. Aciar Proceeding · 43 Bali, Indonesia, 1992. **RMVZ**

LIMITACIONES TECNOLÓGICAS EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE LA GANADERÍA BOVINA EN EL DEPARTAMENTO DEL ATLÁNTICO

G. Jiménez P.¹; G. Téllez I.²; M. Valverde S.³; J. C. Clavijo F.⁴.

RESUMEN

A través de una metodología basada en un diagnóstico estático se identifican los grandes obstáculos para el desarrollo de la ganadería bovina del Departamento del Atlántico a partir del análisis de datos provenientes de una encuesta realizada en sesenta y seis fincas. Luego de agrupar las fincas de acuerdo con sus características comunes, se determinan las limitantes en la salud y producción animal usando el Programa Epi-info. Considerando las características socioeconómicas, agroecológicas y tecnológicas, se discuten los problemas que enfrenta la ganadería atlanticense, sobresaliente: la administración deficiente de las fincas; la inestabilidad en la oferta de los recursos alimenticios asociada con la producción cíclica de biomasa forrajera y la utilización deficiente de las praderas; el manejo inadecuado de animales, especialmente en la crianza de terneros; la presentación de algunas enfermedades en los animales; y el bajo poder de negociación de los productores en la comercialización del ganado. Sin embargo, las potencialidades de producción se hacen evidentes porque se cuenta con un grado de escolaridad adecuado del personal que maneja la finca, que induce a esperar mejoras en la administración y manejo de los recursos, coadyuvado por la organización del mercado regional de la leche cruda, que se realiza a través de cooperativas.

¹ Zootecnista, M.Sc. Investigador de Corpoica, Docente Adscrito Universidad Nacional. A.A. 29743 Santafé de Bogotá.

² Médico Veterinario, M.Sc. Profesor Asociado Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490 Santafé de Bogotá.

³ Zootecnista, Subdirector Asociación de Ganaderos del Atlántico y Zona Norte, Asoganorte. Fax 0953406673. B/quilla.

⁴ Zootecnista, Universidad Nacional. Corporación de Impulso a la Economía Solidaria. Fax. 0982630655. Ibagué.