

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA,
INMUNOHISTOLÓGICA Y ULTRAESTRUCTURAL DE
LAS LESIONES PULMONARES PRODUCIDAS
NATURAL Y EXPERIMENTALMENTE POR
MICOPLASMAS EN GANADO CAPRINO Y PORCINO**

JAVIER EDUARDO SARRADELL LUZARDI

Las Palmas de Gran Canaria, Junio de 2001

Título de la tesis:

***CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA,
INMUNOHISTOLÓGICA Y ULTRAESTRUCTURAL DE
LAS LESIONES PULMONARES PRODUCIDAS
NATURAL Y EXPERIMENTALMENTE POR
MICOPLASMAS EN GANADO CAPRINO Y PORCINO***

Thesis title:

***HISTOLOGICAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND
ULTRASTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF
CAPRINE AND PORCINE LUNG LESIONS NATURALLY
AND EXPERIMENTALLY INDUCED BY MYCOPLASMAS***

ABSTRACT

HISTOLOGICAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF CAPRINE AND PORCINE LUNG LESIONS NATURALLY AND EXPERIMENTALLY INDUCED BY MYCOPLASMAS

M. agalactiae represents the main causal agent of caprine contagious agalactia, one of the main disease that affect the caprine production with a world-wide distribution. In the Canary Islands it has been described important losses caused by *M. agalactiae*. *M. bovis* is closely related to *M. agalactiae* being a primary pathogen for cattle associated with pneumonia, mamitis and arthritis. The agent has also been isolated from cases of mamitis and pneumonia in goats. The porcine enzootic pneumonia, primarily caused by *M. hyopneumoniae*, has been described in all areas of pig production being characterized the process by its high morbidity and the low mortality appearing in intensive production systems.

A common finding of the infections of respiratory tract is the persistence of the organisms in the mucosal surface. This has been suggested to contribute to the formation of lymphoid accumulations observed in the lung of mice, rats, hamsters, calves and pigs infected by mycoplasma. This immune response has been demonstrated to have an important B-lymphocyte participation so the humoral response should play an important role during the infection.

In this work it has been analyzed the pathogenicity of *M. agalactiae* and *bovis* in experimentally infected goats and pigs infected naturally by *M. hyopneumoniae*. Secondly it has been carried out an immunohistochemical study to determine the cellular populations present in the airways and pulmonary parenchyma and in special in the bronchus-

associated lymphoid tissue in animals infected by these species of mycoplasmas. It was used polyclonal and monoclonal antibodies for the detection of antigens of mycoplasmas, T lymphocytes (CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺), B lymphocytes, TcR γ/δ lymphocytes, macrophages, dendritic cells, neutrophils and B lymphocytes IgG⁺ and IgA⁺. Finally, it was analyzed the ultrastructural changes of the respiratory tract.

The pulmonar findings associated to the experimental infection by *M. agalactiae* and *M. bovis* in goats were characterized by bronchointerstitial pneumonia, being the hyperplasia of the bronchus-associated lymphoid tissue the most significant histological change. The vaccination by the parenteral via with antigens of these mycoplasma species was not able to diminished the development of the respiratory lesions. The bronchus-associated lymphoid tissue showed in the goats and pigs infected by mycoplasmas, a high structural and cellular organization with macrophages and B lymphocytes present mainly in the germinal centers and T lymphocytes in perifollicular areas. The participant cellular populations in the hyperplasia of the bronchus-associated lymphoid tissue in animals infected with these mycoplasma species were represented by macrophages and antigen presenting cells, T lymphocytes and B lymphocytes constituting the CD4⁺ subset the predominant element within the cellular immunity during these infections. The humoral immunity, represented by the increase of IgG and IgA lymphocytes in the bronchus-associated lymphoid tissue, bronchiolar wall and alveolar septa also seems to play an important role in the mechanisms of activation of the phagocytosis and clearance of mycoplasmas from the respiratory tract.

**FRANCISCO RODRIGUEZ GUIADO, PROFESOR TITULAR DEL ÁREA DE
CONOCIMIENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
COMPARADAS DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA
FACULTAD DE VETERINARIA DE LA U.L.P.G.C.**

INFORMA:

Que D. **Javier Eduardo Sarradell**, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “**Caracterización Histológica, Inmunohistológica y Ultraestructural de las Lesiones Pulmonares Producidas Natural y Experimentalmente por Micoplasmas en Ganado Caprino y Porcino**”, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria, a 25 de Mayo de 2001

Fdo: Francisco Rodríguez Guisado

**ANTONIO J. FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO DEL ÁREA DE
CONOCIMIENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
COMPARADAS DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA
FACULTAD DE VETERINARIA DE LA U.L.P.G.C.**

INFORMA:

Que D. **Javier Eduardo Sarradell**, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **‘Caracterización Histológica, Inmunohistológica y Ultraestructural de las Lesiones Pulmonares Producidas Natural y Experimentalmente por Micoplasmas en Ganado Caprino y Porcino’**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria, a 25 de Mayo de 2001

Fdo: Antonio J. Fernández Rodríguez

A mi familia y amigos

A Abdulia

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
1. <i>Micoplasmas</i>	12
1.1. Características generales.....	12
1.2. Ultraestructura.....	14
1.3. Variación Genética de los micoplasmas.....	16
2. <i>Micoplasmosis</i>	18
2.1. Enfermedades del aparato respiratorio.....	19
2.2. Enfermedades de las articulaciones.....	22
2.3. Enfermedades del aparato genital y glándula mamaria.....	22
2.4. Enfermedades del globo ocular.....	23
3. <i>Mecanismos patogénicos de las micoplasmosis respiratorias</i>	24
3.1. Factores dependientes de los micoplasmas.....	25
3.1.1. Exposición o contacto con el epitelio respiratorio.....	25
3.1.2. Unión de los micoplasmas a las células epiteliales.....	26
3.1.3. Capacidad de producción de toxinas.....	27
3.1.4. Presencia de una cápsula.....	28
3.1.5. Adquisición o síntesis de antígenos comunes a los del propio hospedador.....	29
3.2. Factores dependientes del hospedador.....	30
3.2.1. Interacción con el sistema del complemento.....	30

3.2.2. Activación del sistema de coagulación.....	31
3.2.3. Actividad inmunosupresora.....	31
3.2.4. Mitogénesis no específica de linfocitos.....	32
3.2.5. Desarrollo de una respuesta inmune específica.....	32
4. Especies patógenas más representativas de micoplasmas	
ahilados de ganado caprino y porcino.....	34
4.1. Micoplasmosis de los pequeños rumiantes.....	35
4.1.1. Neumonías producidas por especies del grupo	
<i>Mycoplasma mycoides</i> en caprinos.....	35
4.1.1.1. Pleuroneumonía Contagiosa Caprina (PNCC) clásica.....	35
4.1.1.2. Neumonía producida por <i>Mycoplasma mycoides</i>	
subespecie <i>mycoides</i> Large Colony (<i>MmmLC</i>).....	37
4.1.1.3. Neumonía producida por <i>Mycoplasma mycoides</i>	
subespecie <i>capri</i> (<i>Mmc</i>).....	40
4.1.1.4. Neumonía producida por	
<i>Mycoplasma capricolum</i> subespecie <i>capricolum</i>	42
4.1.1.5. Neumonía producida por <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	44
4.1.2. Neumonía producida por <i>Mycoplasma agalactiae</i>	45
4.1.3. Neumonía producida por <i>Mycoplasma bovis</i>	48
4.1.4. Otras especies no patógenas de micoplasmas.....	49
4.1.5. Neumonías por pasteurelas en el ganado caprino y ovino.....	49
4.2. Micoplasmosis de los porcinos.....	52
4.2.1. Neumonía enzoótica porcina.....	52

5. Sistema Respiratorio	59
5.1. Pulmón.....	59
5.2. Pleura.....	68
6. Mecanismos de defensa de las vías respiratorias	69
6.1. Mecanismos protectores de carácter no inmunológico.....	69
6.2. Mecanismos protectores de carácter inmunológico.....	71
6.2.1. Macrófagos.....	73
6.2.2. Células presentadoras de antígeno.....	76
6.2.3. Linfocitos.....	78
6.2.3.1. Linfocitos B.....	79
6.2.3.2. Linfocitos T.....	80
6.2.3.3. Células NK.....	82
6.3. Receptores de superficie de linfocitos.....	83
6.4. Consecuencias biológicas.....	87
6.5. Redes de regulación de la respuesta inmunitaria.....	90
MATERIAL Y MÉTODOS	92
1. Obtención de las muestras	93
1.1. Cabritos infectados experimentalmente.....	93
1.2. Cerdos de matadero con lesiones características de NEP.....	96
2. Procesamiento laboratorial	97
2.1. Técnicas de histología de rutina.....	97
2.2. Estudio ultraestructural.....	98

2.3. Técnica histoquímica.....	100
2.4. Valoración microscópica de las lesiones.....	101
2.5. Procesamiento de muestras congeladas para inmunohistoquímica.....	102
2.6. Técnica inmunohistoquímica.....	103
2.7. Microbiología.....	108
RESULTADOS.....	113
1. Cabritos infectados experimentalmente.....	114
1.1. Clínica.....	114
1.2. Patología.....	114
1.3. Inmunohistoquímica.....	118
1.4. Microbiología.....	127
1.5. Serología.....	127
1.6. Estudio ultraestructural.....	128
2. Cerdos de matadero con lesiones características de NEP.....	129
2.1. Valoración microscópica de las lesiones.....	129
2.2. Inmunohistoquímica.....	131
2.3. Microbiología.....	142
2.4. Estudio ultraestructural.....	143

DISCUSIÓN	148
CONCLUSIONES	174
RESUMEN	177
SUMMARY	180
AGRADECIMIENTOS	183
BIBLIOGRAFÍA	185
ANEXO	212

ABREVIATURAS

µm	Micrometro
ABC	Avidina–Biotina–Peroxidasa
ACC	Agalaxia Contagiosa Caprina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
Ags	Antígenos
ARN	Ácido ribonucleico
BcR	“B cell Receptor” (receptor de células B)
CAR	Cilia-associated respiratory
CD	“Cluster of Differentiation” (Grupo o Antígeno de diferenciación)
cols.	Colaboradores
DAB	Diaminobenzidina
ELISA	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (Inmunoensayo ligado a enzima)
Fc	Fragmento cristalizabile
Fig.	Figura
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos-Macrófagos
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
Igs	Inmunoglobulinas
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltons

M.	<i>Mycoplasma</i>
Mcc	<i>Mycoplasma capricolum</i> subespecie <i>capricolum</i>
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MHC I	“Major Histocompatibility Complex” (Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I)
MHC II	“Major Histocompatibility Complex” (Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II)
ml.	mililitros
Mmc	<i>M. mycoides</i> subespecie <i>capri</i>
MmmLC	<i>M. mycoides</i> subespecie <i>mycoides</i> biotipo Large Colony
MmmSC	<i>M. mycoides</i> subespecie <i>mycoides</i> biotipo Small Colony
NEP	Neumonía Enzoótica Porcina
NK	“Natural killer” (Asesino natural)
nm	Nanómetros
O.C.T.	“Optimal Cutting Temperature” (Temperatura óptima de corte)
°C	Grados Centígrados
P.	<i>Pasteurella</i>
PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Menos logaritmo de la concentración de protones
PMN	Polimorfonuclear
PNCB	Pleuroneumonía Contagiosa Bovina
PNCC	Pleuroneumonía Contagiosa Caprina

SD	“Standar Desviation” (Desviación estándar)
<i>Spp.</i>	Especies
subsp.	Subespecie
TBS	Tris buffer salino
Tc	Linfocito T citotóxico
TcR	“T cell Receptor” (Receptor de células T)
Th	Linfocito T cooperador
TLAB	Tejido Linfoide Asociado a los Bronquios
TNF	“Tumour Necrosis Factor” (Factor de Necrosis Tumoral)
Ts	Linfocito T supresor
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
W-S	Warthin-Starry

INTRODUCCIÓN

La cabaña caprina constituye la especie más representativa de la ganadería de las Islas Canarias, presentando una implantación muy relevante en todas las islas del archipiélago. Los animales pertenecientes a la Agrupación Caprina Canaria son producidos para la obtención de carne, leche y sus derivados, muy especialmente los característicos quesos de diferentes localidades de las islas con propiedades organolépticas específicas.

Los micoplasmas son organismos caracterizados morfológicamente por la falta de pared celular y por su capacidad de adhesión a las superficies mucosas de los tractos respiratorio, mamario y urogenital, donde desarrollan su poder patógeno.

Las micoplasmosis son los típicos ejemplos de enfermedades multifactoriales, en las que factores tales como la existencia de infecciones intercurrentes, la constitución genética del individuo, el manejo, las condiciones climáticas y la edad entre otras, juegan un papel determinante en el inicio y desarrollo de la enfermedad. El poder patógeno de las diferentes especies de micoplasmas es muy variable, pudiéndose distinguir entre micoplasmas responsables de producir entidades patológicas calificadas como micoplasmosis mayores, como la Pleuroneumonía Contagiosa Caprina (PNCC) causada por *Mycoplasma (M.) capricolum* subespecie (subsp.) *capripneumoniae*, micoplasmosis oportunistas y micoplasmosis saprofíticas.

La dificultad que presentan algunos micoplasmas patógenos para su aislamiento e identificación, los distintos cuadros clínicos y lesionales fácilmente atribuibles a otros microorganismos, y la falta de un conocimiento profundo del mecanismo patogénico de las infecciones por micoplasmas, hacen suponer que la incidencia de estas micoplasmosis del ganado caprino sea mucho mayor que la referenciada en la bibliografía. Las

infecciones por micoplasmas en el ganado caprino son responsables de importantes pérdidas económicas en países del continente Africano, países Europeos del área Mediterránea, Estados Unidos y la India.

Durante la 62ª Asamblea General de la Oficina Internacional de Epizootias (**OIE**) celebrada en París del 16 al 20 de Mayo de 1994 se analizó el impacto socioeconómico de las infecciones por micoplasmas en el ganado bovino, ovino y caprino, considerándose éste muy importante a nivel mundial. En particular, se consideró que enfermedades como la pleuroneumonía contagiosa bovina, la pleuroneumonía contagiosa caprina y la agalaxia de los pequeños rumiantes debían estudiarse con especial interés, así como controlarse de una manera eficaz mediante sistemas de diagnóstico y vigilancia epidemiológica apropiados. En el año 1991 se constituyó un grupo de investigación en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, en colaboración con otras Facultades y centros de investigación nacionales y extranjeros. Esta colaboración se ha concretado en una acción COST (Contagious Bovine, Ovine and Caprine Mycoplasmosis: Control, Diagnostic and Prevention) a nivel europeo.

Por otra parte, en mi caso particular provengo de un grupo que comenzó a trabajar desde 1992 en la Cátedra de Patología General, Anatomía y Anatomía Patológicas de la Universidad Nacional de Rosario-Argentina en una línea de investigación de patologías respiratorias, y su impacto en la producción en cerdos criados en sistemas al aire libre (semi-intensivos o intensivos a campo). El análisis de los diferentes parámetros que participan en el desarrollo de procesos neumónicos en el ganado porcino permitió sentar las bases para la formación de postgrado de los integrantes del grupo.

En el presente estudio incluimos dos especies de micoplasmas descritas con capacidad patógena de distinta intensidad para el aparato respiratorio del ganado caprino: *M. agalactiae* y *M. bovis*.

M. agalactiae representa el principal agente causal de la Agalaxia Contagiosa Caprina (ACC), una de las principales patologías que afecta la producción del sector a nivel mundial y muy especialmente en el área Mediterránea donde es endémica. En todas las islas del archipiélago canario se han descrito importantes pérdidas en el ganado caprino causadas por *M. agalactiae*. *M. bovis* está estrechamente relacionado con *M. agalactiae* siendo un patógeno primario del ganado bovino a nivel mundial y asociado a neumonías, mastitis y artritis en animales de todas las edades.

En relación con el ganado porcino, varias enfermedades causan importantes pérdidas económicas siendo las de origen respiratorio las de mayor incidencia. La Neumonía Enzootica Porcina (NEP) es una enfermedad causada primariamente por *M. hyopneumoniae*, agente de distribución mundial, caracterizado por su alta morbilidad y baja mortalidad presentándose principalmente en sistemas de producción intensivos. En las Islas Canarias el sector porcino se encuentra en continua expansión siendo el censo de animales sacrificados de 137.000 al año en la totalidad de las islas si bien aún es necesaria la importación de carne refrigerada o congelada así como animales de reposición en las granjas. En estudios previos realizados por nuestro grupo determinamos que el 95% de las granjas evaluadas (36 granjas) presentaron enfermedades respiratorias de las que en matadero el 53% de los animales mostraban lesiones de NEP primariamente imputable a *M. hyopneumoniae*.

Como denominadores comunes de éstas enfermedades están su difícil diagnóstico y por tanto, la falta de datos epidemiológicos, su persistencia y difícil erradicación, su poca o escasa respuesta a los tratamientos antibióticos, la falta de vacunas comerciales efectivas y la alta tasa de morbilidad dando lugar a graves pérdidas económicas.

En los últimos años se han desarrollado anticuerpos mono y policlonales dirigidos frente a diferentes antígenos (Ags) celulares, mediadores químicos y poblaciones linfocitarias. La utilización de estos reactivos para la detección de Ags en tejidos fijados se está aplicando actualmente en enfermedades infecciosas y no infecciosas en Medicina Humana y Animal. Esta metodología proporciona una herramienta muy valiosa en el estudio los mecanismos inmuno-inflamatorios locales en diferentes entidades nosológicas. En nuestro caso particular, establecimos como hipótesis de trabajo que el conocimiento de las poblaciones celulares de la respuesta inflamatoria e inmunológica presentes en el tejido pulmonar infectado por micoplasmas, nos permitiría por una parte, profundizar en el conocimiento de la patogenia de las micoplasmosis respiratorias y por otro, nos proporcionaría elementos sobre los que se pueda incidir en los programas de inmunoprolifaxis y control de estas enfermedades.

Basándose en estos antecedentes, se estableció los siguientes objetivos del presente trabajo:

1. Estudio de la patogenia de *M. agalactiae* y *M. bovis* en el aparato respiratorio del ganado caprino infectado experimentalmente.
2. Análisis de la respuesta inmunoinflamatoria local en el aparato respiratorio caprino y porcino infectado con micoplasmas y su participación en el desarrollo de las lesiones pulmonares observadas.
3. Análisis de los cambios lesionales y de las células participantes en la respuesta inmune presentes en el tejido pulmonar de animales vacunados con *M. agalactiae* o *M. bovis* antes de la infección experimental.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. *Micoplasmas*

Micoplasma es la denominación de un grupo de microorganismos que difieren de las bacterias por no poseer pared celular y que se encuentran incluidos dentro de la clase *Mollicutes*, término derivado del Latín *mollis* = suave o fino y *cutes* = piel, que significa “piel blanda o suave” (Nicolet, 1996).

Las bases del sistema de clasificación y nomenclatura actual de estos microorganismos asientan en la propuesta de Edward y Freundt (1956) incluyéndolos en un único orden, *Mycoplasmatales*, con una única familia, *Mycoplasmataceae*, y un único género, *Mycoplasma*. A medida que se descubrían nuevos micoplasmas, la taxonomía fue evolucionando. En la sección 10 del “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, 9ª edición” (Razin y Freundt, 1984), encontramos la División *Tenericutes*. Esta división incluye una única clase, la clase *I Mollicutes*, con el orden *Mycoplasmatales*, que contiene las familias *Mycoplasmataceae* (con los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*), *Acholeplasmataceae* (con el género *Acholeplasma*) y *Spiroplasmataceae* (con el género *Spiroplasma*). La subdivisión en familias está basada en el hábitat, los requerimientos de esteroides para crecer, el tamaño del genoma y la tolerancia al oxígeno.

1.1. Características generales

Los micoplasmas son procariotas envueltos por una membrana plasmática trilaminar con proteínas y una alta proporción de lípidos, siendo incapaces de sintetizar peptidoglucanos lo que hace imposible que produzcan una pared celular (Topley y Wilson's, 1990). Esta

característica los hace muy pleomórficos con formas esféricas, cocoides, filamentosas o filamentosas helicoidales.

Poseen un diámetro medio de 300 a 800 nanómetros (nm), pudiendo atravesar filtros entre 220 y 450 nm. No poseen flagelos ni microvellosidades, pero algunas especies como *M. pneumoniae*, *M. pulmonis*, *M. genitalium* y *M. gallisepticum* poseen movilidad, el mecanismo de la cual permanece todavía desconocido **(Korolev y cols., 1994)**. Los micoplasmas son Gram (-), se colorean mal con otras técnicas rutinarias de tinción de bacterias, pero sí en cambio con el Giemsa. El genoma de los micoplasmas es de 500 - 1000 Mdaltons, con un porcentaje de guanina+citosina relativamente bajo (23-46%) **(Tully, 1992)**. Resisten la penicilina y la lisozima y son sensibles a la lisis por shock osmótico, detergentes, alcoholes y anticuerpos específicos fijadores del complemento **(Topley y Wilson's, 1990)**.

Estos microorganismos son capaces de multiplicarse en medios celulares, necesitando cultivos enriquecidos con colesterol, procedente de suero de diferentes especies animales, y precursores de ácidos nucleicos. Cuando se cultivan en medios líquidos crecen produciendo un ligero enturbiamiento, siendo en los medios sólidos donde se aprecian características culturales evidentes. Así, las colonias que aparecen en los mismos son pequeñas, de 0,1 a 1 mm de diámetro con tendencia a crecer y penetrar bajo el medio, con la característica apariencia de "huevo frito" en la mayoría de las especies cuando se cultivan en condiciones normales.

Además de las pruebas bioquímicas, los mejores métodos para la identificación de los micoplasmas son la inhibición de crecimiento y la inhibición del metabolismo, así

como la utilización de la técnica de inmunofluorescencia directa o indirecta sobre colonias utilizando sueros específicos anti-micoplasmas (**Picavet, 1991**). En los últimos años se han desarrollado técnicas diagnósticas basadas en el empleo de anticuerpos monoclonales (**Guerin y cols., 1993; Belton y cols., 1994; Thiaucourt y cols., 1994; Adegboye y cols., 1995a; Rodríguez y cols., 1996a; Ball y cols., 1997**) y basadas en técnicas de biología molecular (**Brandao y cols., 1994; Dedieu y cols., 1992 y 1994a,b; Hotzel y cols., 1994; Johansson y cols., 1994; Nicholas y cols., 1994; Kwon y Chae, 1999**).

Mediante microscopía electrónica se observa una membrana celular trilaminar, característica de todos los miembros de la clase *Mollicutes*, de 7.5 - 10 nm de grosor y una lámina intermedia menos electrodensa que la interna y externa. Periféricamente, no poseen pared rígida pero sí se ha demostrado en ciertos micoplasmas la presencia de una envuelta compuesta por hidratos de carbono y glucolípidos de gran importancia en los mecanismos patogénicos de estos microorganismos (**Topley y Wilson's, 1990**). El interior de los micoplasmas está constituido por un citoplasma poco denso, con ribosomas y material nuclear fibrilar muy manifiesto en algunas especies. La replicación del genoma en los micoplasmas ocurre como en otros procariotas, aunque se multiplican de una forma más lenta que el resto de las bacterias (**Taylor-Robinson, 1989**).

1.2. Ultraestructura

Los micoplasmas son los microorganismos más pequeños capaces de replicarse en medios de cultivo exentos de células y poseen sólo aquellos orgánulos y rutas metabólicas indispensables para su crecimiento y replicación. Así, su estructura se reduce a:

- membrana plasmática
- molécula bicatenaria circular de Ácido desoxirribonucleico (ADN)
- moléculas de Ácido ribonucleico (ARN)
- ribosomas
- gránulos citoplasmáticos

Los micoplasmas no presentan orgánulos subcelulares organizados, como mitocondrias, ni tampoco membranas intracitoplásmicas por lo que los mollicutes presentan solamente un tipo de membrana. La membrana plasmática presenta un perfil trilaminar y está compuesta por dos tercios de proteínas y un tercio de lípidos. A diferencia de las membranas bacterianas, la membrana de los mollicutes contiene colesterol y carece de ácido diaminopimélico. Es estructuralmente similar a las membranas celulares de las células eucariotas y es lo único que separa al citoplasma del medio ambiente (**Razin, 1969; Rosendal, 1988**). En su mayoría encontraremos fosfolípidos y glucolípidos, que junto a las proteínas constituyen los determinantes antigénicos más importantes. Al no tener pared, necesitan vivir en un entorno de elevada presión osmótica para permitir la isotonía con respecto al medio interior (**Howard y Gourlay, 1978; Kenny, 1979; Razin, 1979**).

El tamaño del genoma en la mayoría de las especies de micoplasmas es de aproximadamente 5×10^8 Daltons (**Tully, 1992**), lo que supone aproximadamente un cuarto del valor medio de la mayoría de las bacterias comunes. Este bajo número de genes se corresponde con la cantidad de proteínas que pueden sintetizar (en torno a 400) y en consecuencia, también lo está con su capacidad metabólica y actividad enzimática. De ahí

viene su modo de vida como parásito (**Stanbridge y Reff, 1979; Razin y Freundt, 1984; Tully, 1992; Rapaport y Levinshon, 1993**).

En algunos micoplasmas se ha observado un orgánulo polar en forma de huso o ampolla, desarrollado alrededor de un bastoncillo estriado y que parece corresponder a un mecanismo de virulencia para el ataque celular, y quizás intervenga en la movilidad de algunas especies (**Bredt, 1979; Razin, 1978**). Otra estructura especializada encontrada en algunos micoplasmas bovinos y caprinos, es la conocida como fibra rho (ρ) (**Rodwell y cols., 1972**) encontrada por toda la superficie celular, siendo su función desconocida. Algunos micoplasmas poseen carbohidratos en forma de una cápsula extracelular, el galactano en *M. mycoides* subsp. *mycoides* y un polímero de hexosamina en *Acholeplasma laidlawii*, son los más notables. En otras especies de mollicutes se ha evidenciado mediante microscopía electrónica, una cápsula que normalmente se tiñe de rojo rutenio, lo que sugiere que se trata de un material que contiene carbohidratos. Se ha demostrado que esta cápsula es de gran importancia en los mecanismos patogénicos de estos microorganismos (**Taylor-Robinson, 1989; Topley y Wilson's, 1990**).

1.3. Variación genética de los micoplasmas

El término “variación genética” se define aquí como la habilidad de un organismo unicelular de generar subpoblaciones que expresan una forma alternativa en sus componentes de superficie los cuales son reconocidos y distinguidos por anticuerpos (**Citti y cols., 1999**).

La existencia de sistemas de variación genética en micoplasmas surgió durante el estudio de las lipoproteínas de superficie de *M. hyorhinis* (**Rosengarten y cols., 1990**) y radica en mutaciones espontáneas de genes que codifican las denominadas lipoproteínas variables, posteriormente se han descrito variaciones genéticas en genes que codifican proteínas de superficie en *M. bovis*, *M. hominis*, *M. pulmonis* y quizás en *M. gallisepticum* (**Lysnyansky y cols., 1996; Rosengarten y cols., 1990; Rosengarten y cols., 1994; Athamna y cols., 1997**). Esto indica que las diferentes estrategias mutacionales pueden ser utilizadas por los micoplasmas para evadir las defensas del hospedador (*M. bovis* y *M. hyorhinis*) o para producir las variaciones en la severidad de la lesión en las micoplasmosis respiratorias (*M. pulmonis*) (**Citti y cols., 1999**). Por otra parte, estos hallazgos pueden determinar variaciones en la virulencia de cultivos provenientes de diferentes laboratorios y complicar la identificación de los micoplasmas provenientes de casos clínicos (**Rosengarten y Yogev, 1996**). Sin embargo, el hallazgo de las proteínas variables de superficie puede brindar herramientas para estudios epidemiológicos y nuevos ensayos serodiagnósticos (**Citti y cols., 1999**)

2. *Micoplasmosis*

En 1990, **Topley y Wilson's** describieron 77 especies de micoplasmas, 28 de ellas patógenas para el hombre, los animales domésticos y salvajes. La especificidad de estos micoplasmas con respecto a su hospedador es bastante alta, aunque se han descrito casos puntuales de interespecificidad.

Las micoplasmosis son los típicos ejemplos de enfermedades multifactoriales, en las que factores tales como la existencia de infecciones intercurrentes, la constitución genética del individuo, el manejo, las condiciones climáticas, la edad, etc., juegan un papel determinante en el inicio y desarrollo de la enfermedad (**Lefèvre y cols., 1987 b; Jones, 1989; DaMassa y cols., 1992**).

El poder patógeno de las diferentes especies de micoplasmas es muy variable, pudiéndose distinguir entre micoplasmas responsables de producir entidades patológicas calificadas como micoplasmosis mayores, como la Pleuroneumonía Contagiosa Bovina (PNCB), micoplasmosis oportunistas y micoplasmosis saprofitas (**Perreau, 1979b**). Las especies de micoplasmas patógenos muestran una alta especificidad por su hospedador, que puede estar basada en factores de colonización específicos proporcionados por el propio hospedador. Así, los receptores son necesarios para la adhesión a la membrana celular de *M. pneumoniae* o de *M. gallisepticum* (**Gourlay y Howard, 1982**).

Las enfermedades causadas por micoplasmas pueden ser divididas, según **Rosendal** (1988), en:

1.- Enfermedades en las cuales la **septicemia** es la característica predominante.

2.- Enfermedades en las que existe **una fase septicémica**, seguida de localización e **inflamación de las serosas y/o las articulaciones**.

3.- Enfermedades **localizadas** en el tracto respiratorio, tracto genital, glándula mamaria o conjuntiva.

Entre las enfermedades de este tercer grupo citaremos a continuación algunas de las más frecuentes en relación con el sistema o aparato afectado.

2.1. Enfermedades del aparato respiratorio

Aunque se han aislado muchos micoplasmas del aparato respiratorio del hombre y de los animales, los intentos de reproducir la enfermedad han sido en muchos casos no concluyentes. Esto parece deberse, fundamentalmente, a las dificultades que presenta el pulmón para la reproducción de enfermedades experimentales (**Blood y cols., 1988**). Un hallazgo común en las neumonías micoplásmicas es el incremento de las células mononucleares en el pulmón, como ejemplo *M. pulmonis* en ratones, *M. bovis* en bovinos, *M. gallisepticum* en gallinas y *M. hyopneumoniae* en cerdos (**Fernald, 1979; Howard y cols., 1987**). Esto conduce a la producción de cúmulos peribronquiolares y perivasculares de este tipo de células, muchas de las cuales son, probablemente, capaces de sintetizar anticuerpos (**Cassell y cols., 1974; Gourlay y Howard, 1982; Howard y cols., 1987**) como parte de la respuesta inmune frente a la infección.

M. mycoides subespecie *mycoides* (biotipo “Small Colony”= colonias pequeñas) (*MmmSC*) causa la PNCB. Ésta es la enfermedad más grave causada por microorganismos

del género *Mycoplasma* en bovinos. Se caracteriza por ser altamente contagiosa y cursa con una pleuroneumonía fibrinosa mortal en muchos casos **(Blood y cols., 1988)**.

M. mycoides subespecie *mycoides* (biotipo "Large Colony"= colonias grandes) (*MmmLC*) causa Neumonías Broncointersticiales en caprinos. Las lesiones suelen ser propias de una bronconeumonía, no en todos los casos se afecta la pleura. Histológicamente las lesiones se caracterizan por una neumonía intersticial con peribronquitis y dilatación de los septos interlobulillares. También se describen casos de neumonía fibrinosa y bronconeumonía catarralpurulenta con una marcada congestión septal **(DaMassa y cols., 1983a; Rosendal, 1983)**.

M. ovipneumoniae se ha aislado tanto de lesiones neumónicas como de pulmones y tráquea de ovinos y caprinos sanos. Tradicionalmente, y junto a *Pasteurella (P.) haemolytica* (recientemente recategorizada como *Mannheimia haemolytica*) biotipo A, se ha asociado a una neumonía intersticial crónica o neumonía atípica de los corderos **(Blood y cols., 1988)**. La infección experimental en ovejas por vía intravenosa o aerógena, induce una neumonía intersticial similar a la observada en los casos naturales **(DaMassa y cols., 1992; Mohan y Obwolo, 1990)**.

M. bovis es un agente causal importante de neumonías en bovinos de muchas partes del mundo, histológicamente causa bronconeumonía supurativa con hiperplasia linfoide peribronquiolar y focos de necrosis por coagulación rodeados de macrófagos, células plasmáticas y polimorfonucleares (PMN) neutrófilos **(Dungworth, 1993; Adegboye y cols., 1995b)**. También se ha aislado del tracto respiratorio de la cabra donde causa neumonías **(DaMassa y cols., 1992)** y mamitis **(Ojo e Ikede, 1976)**.

M. agalactiae se ha asociado a casos de neumonía en animales de corta edad, seguido de artritis y queratitis (**Bergonier y cols., 1997**). Histológicamente, las lesiones encontradas fueron neumonías broncointersticiales de distinto grado de intensidad. Los capilares septales mostraron congestión con exudación serosa o serofibrinosa y abundantes macrófagos alveolares. Las lesiones pleuroneumónicas sólo han sido descritas en algunos casos (**Cottew, 1984**).

M. hyopneumoniae es el agente etiológico primario de la NEP (**Maré y Switzer, 1966; Switzer, 1967**). Ésta es una enfermedad muy contagiosa que se manifiesta clínicamente por signos respiratorios moderados y por una disminución en el índice de crecimiento y engorde. Histopatológicamente, la lesión se corresponde con una neumonía broncointersticial crónica. *M. hyorhinis* también ha sido aislado de brotes neumónicos, pero se considera un patógeno secundario, que normalmente complica cuadros causados por otros microorganismos. *M. hyorhinis* también ha sido asociado a cuadros de artritis y poliserositis (**Switzer, 1955; Gois y Kuksa, 1974**). Este microorganismo es un habitante frecuente de la cavidad nasal de cerdos sanos y enfermos, y es considerado como uno de los micoplasmas que contaminan los cultivos celulares (**Barile, 1981**).

M. pneumoniae es el agente causal de la Neumonía Atípica Primaria en el hombre, afectando principalmente a niños y jóvenes. Las lesiones, normalmente nodulares, afectan a uno de los lóbulos inferiores, en los que histológicamente se describe una neumonía intersticial junto a una bronquitis descamativa y una bronquiolitis (**Razin y Barile, 1985**).

2.2. Enfermedades de las articulaciones

Se considera que las lesiones en las articulaciones se producen tras procesos septicémicos por especies de micoplasmas con tropismo articular. Algunos ejemplos son los producidos por:

M. bovis, que desarrolla una poliartritis preferentemente en terneros; *M. hyosynoviae*, agente causal de una artritis no purulenta en cerdos en crecimiento; *M. hyorhinis*, que produce artritis y poliserositis principalmente en lechones; *M. agalactiae*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* (McC) y *M. putrefaciens* los cuales se localizan frecuentemente en articulaciones produciendo poliartritis en cabritos. *MmmSC* puede causar artritis, con o sin lesiones pulmonares, en terneros de edad inferior a las seis semanas **(DaMassa y cols., 1987b; Blood y cols., 1988; DaMassa y cols., 1992; Rodríguez y cols., 1994)**.

2.3. Enfermedades del aparato genital y glándula mamaria

M. bovis, es el agente causal más frecuente de mamitis micoplásmica en ganado vacuno, siendo necesarios muy pocos microorganismos para reproducir experimentalmente una mamitis de curso rápido. Además, puede causar vulvovaginitis, endometritis y salpingitis en bovinos, ovinos y caprinos **(DaMassa y cols., 1992)**. También ha sido aislado en casos de mamitis en ganado caprino **(Ojo e Ikede, 1976; Egwu y cols., 2001)**.

M. agalactiae produce mamitis en cabras y ovejas con una alta morbilidad y baja mortalidad. La enfermedad producida por este microorganismo se ha denominado tradicionalmente "Agalaxia contagiosa de caprinos y ovinos" **(DaMassa cols., 1992)**. La enfermedad ha sido reproducida experimentalmente induciendo una mamitis aguda que

puede dar lugar a una corta y transitoria micoplasmemia, causando con frecuencia poliartritis y queratoconjuntivitis, siendo más raras las lesiones pulmonares (**Rosendal, 1988; DaMassa y cols., 1992**). Recientemente se ha descrito un brote de ACC causado por *M. agalactiae*, constituyendo ésta la primera referencia de infección por este microorganismo en las Islas Canarias (**Real y cols., 1994**).

M. putrefaciens se ha asociado a mamitis en caprino en California y Francia (**Adler y cols., 1980; Gaillard-Perrin y cols., 1985**). La enfermedad se caracteriza por una elevada leucocitosis en leche seguida de un súbito descenso de la producción, sin existencia de otros signos clínicos. Unos pocos microorganismos inoculados por vía intracanalicular producen una mamitis purulenta en animales en lactación (**Brooks y cols., 1981**). En California se observó un brote de mamitis y poliartritis fibrinopurulenta por este micoplasma (**DaMassa y cols., 1987a**). También se ha descrito un caso de poliartritis en cabritos asociado con *M. putrefaciens* en la isla de Gran Canaria sin la presencia de mamitis clínica en las madres (**Rodríguez y cols., 1994**).

2.4. Enfermedades del globo ocular

En este grupo de enfermedades las micoplasmosis más frecuentes son las producidas por:

M. bovoculi, que ha sido asociado con brotes de queratoconjuntivitis en bovinos, ovinos y caprinos; *M. agalactiae*, que también puede producir queratoconjuntivitis en el ganado caprino y ovino; *M. conjunctivae*, el cual ha sido aislado de forma única o asociado con otros microorganismos en queratoconjuntivitis ovinas y caprinas (**Egwu, 1992**). Las lesiones observadas en la enfermedad natural han podido ser reproducidas

experimentalmente al inyectar subconjuntivalmente este microorganismo (**Blood y cols., 1988; DaMassa y cols., 1992**).

3. Mecanismos patogénicos de las micoplasmosis respiratorias

Perreau (1979a y 1984) clasifica las distintas especies de micoplasmas en tres grupos atendiendo a su patogenicidad. Sin embargo, indica que todas ellas pueden provocar infecciones asintomáticas:

- Micoplasmas de poder patógeno indiscutible, responsables de lo que se conoce como micoplasmosis mayores. Entre otras, la PNCB, PNCC clásica y el denominado "Síndrome de Agalaxia Contagiosa" de los pequeños rumiantes, las cuales se han reproducido en condiciones experimentales.

- Micoplasmas oportunistas, con un poder patógeno menos claro, responsables de neumonías y mamitis en rumiantes.

- Micoplasmas saprofitos, huéspedes naturales del organismo, principalmente de las mucosas del tracto respiratorio y urogenital de numerosas especies animales.

En general, los factores patogénicos de los micoplasmas residen, entre otros menos conocidos, en su especificidad por el hospedador, en factores tóxicos, en su capacidad de activar el complemento, en su capacidad de activar los factores de la coagulación, y en su capacidad de modificar la respuesta inmune (**Gourlay y Howard, 1982**).

Según **Gourlay y Howard** (1982), la patogenia de las micoplasmosis respiratorias se puede dividir en las siguientes etapas:

- Exposición
- Unión o adhesión de los micoplasmas a la superficie epitelial
- Producción de toxinas
- Interacción con el sistema defensivo primario (macrófagos y neutrófilos) y con el sistema inmune (celular y humoral) del hospedador
- Inducción de factores que esquivan la respuesta del organismo como son la síntesis de cápsulas, la inmunosupresión y la producción o adquisición de Ags del hospedador
- Inducción de una respuesta inmune específica

Con todo, el desarrollo o no de la enfermedad dependerá, en primer lugar, del micoplasma implicado y en segundo lugar, de la especie animal afectada así como del estado del animal en el momento de la exposición.

3.1. Factores dependientes de los micoplasmas

3.1.1. Exposición o contacto con el epitelio respiratorio

Los factores patogénicos en esta fase están relacionados con la capacidad de movimiento, el tamaño y la posibilidad de evitar a las sustancias micoplasmicidas. El mucus secretado por las células de la mucosa respiratoria posee capacidad defensiva, al prevenir el contacto de los agentes extraños con la superficie epitelial de las vías respiratorias (**Gourlay y Howard, 1982**).

Algunos micoplasmas patógenos del tracto respiratorio tienen la capacidad de ser móviles, por lo que pueden modificar su estructura citoplasmática y dirigirse hacia las células epiteliales blanco de la mucosa respiratoria, a las que se adhieren. Otro factor que también ha sido indicado, es el tamaño de los micoplasmas, el cual favorece su penetración a través de la capa de mucus que recubre toda la superficie del epitelio respiratorio **(Gourlay y Howard, 1982)**.

3.1.2. Unión de los micoplasmas a las células epiteliales

Una vez que los micoplasmas acceden al aparato respiratorio, se unen a las células epiteliales para evitar su expulsión mediante los movimientos ciliares y/o el reflejo tusígeno. Esta capacidad de unión a sus células blanco es común para todos los micoplasmas respiratorios patógenos y apatógenos **(Gourlay y Howard, 1982)**.

La capacidad de los micoplasmas para adherirse a las células eucariotas es la propiedad patógena mejor estudiada de los microorganismos respiratorios **(Rosendal, 1988)**. Algunos micoplasmas como *M. pneumoniae* y *M. gallisepticum* poseen una proteína de adhesión en su superficie mediante la cual se unen a la membrana celular de la célula huésped. La proteína específica ha sido identificada como la Proteína P1, y ha podido ser bloqueada mediante anticuerpos específicos, evitándose así el fenómeno de la adhesión. Los pases por medios de cultivo pueden provocar la pérdida de la capacidad de adhesión, disminuyendo de esta forma el poder patógeno de este microorganismo **(Taylor-Robinson y cols., 1981; Brunner y cols., 1985)**.

Igualmente, se han descrito sustancias fabricadas por ciertos micoplasmas que permiten la adhesión a receptores de las células blanco (**Gourlay y Howard, 1982; Topley y Wilson's, 1990**). En este sentido, otro indicador patogénico de los micoplasmas es su capacidad de hemadsorción, la cual ha sido observada en 12 de los 28 micoplasmas patógenos descritos por **Topley y Wilson's** (1990), mientras que solamente 13 de las 49 especies no patógenas presentan esta propiedad.

3.1.3. Capacidad de producción de toxinas

La producción de toxinas por parte de las distintas especies de micoplasmas es uno de los aspectos más controvertidos de la patogenicidad de los micoplasmas (**Gourlay y Howard, 1982**).

La íntima asociación entre los micoplasmas y las células hospedadoras permite el intercambio de sustancias, de ahí que cualquier sustancia tóxica producida por este microorganismo pueda causar un efecto citopático directo sobre la célula epitelial. En este sentido, el único caso completamente demostrado es la neurotoxina producida por *M. neurolyticum*. Este micoplasma produce una proteína de 200 kdaltons que induce la muerte de los ratones infectados a las pocas horas de su inoculación intravenosa. También se han considerado como sustancias tóxicas, ciertos productos finales del metabolismo de los micoplasmas (**Gourlay y Howard, 1982**).

Son ejemplos la toxina presente en la cápsula del *MmmSC* denominada galactano, que contiene principalmente galactofuranosa, e induce efectos tóxicos al inocularla a embriones de pollo, así como edema y microtrombosis pulmonar en vaca, oveja y cabra,

jugando un papel importante en la prolongación de la micoplasmemia en el ganado vacuno **(Lloyd y cols., 1971)**.

La cilioestasis es uno de los efectos tóxicos más graves producidos por los micoplasmas. Un gran número de especies patógenas del aparato respiratorio posee dicho efecto perjudicial, habiéndose observado pérdida de cilios y cambios citopáticos en células de tráquea cultivadas. Inicialmente se pensó que los micoplasmas tenían que ser metabólicamente activos para producir cilioestasis; sin embargo, se ha demostrado que los aislados de membrana producen el mismo efecto que los microorganismos completos **(Carson y cols., 1979; Kahane, 1984)**.

Con *M. pneumoniae* se han realizado experimentos en hámsters, observándose cambios citotóxicos del epitelio traqueal por la peroxidación de los lípidos de la membrana citoplasmática. Este micoplasma induce la producción de aniones superóxido que inactivan la catalasa epitelial, permitiendo así la actividad oxidativa del peróxido de hidrógeno **(Kahane, 1984)**.

Otros micoplasmas como *MmmLC* producen en las infecciones en caprino un efecto citopático endotelial, pero su mecanismo patogénico está aún por dilucidar **(Valdivieso-García y cols., 1982; Rosendal, 1984 a y b)**.

3.1.4. Presencia de cápsula

Los micoplasmas carecen de pared celular, pero un gran número de especies patógenas presentan un material extracelular que rodea a la membrana citoplasmática. Esta estructura a modo de microcápsula se tiñe con el rojo rutenio que podría jugar un papel

importante en la virulencia de estos micoplasmas. Parte de este material extracelular es una proteína inhibidora de la fagocitosis como ocurre en las infecciones por *M. pulmonis* **(Howard y Gourlay, 1974)**.

3.1.5. Adquisición o síntesis de antígenos comunes a los del hospedador

Los micoplasmas pueden presentar Ags comunes a las células del hospedador (por un fenómeno de adsorción de material de la superficie celular o por síntesis del mismo). Mediante este mecanismo, el micoplasma puede eludir la respuesta inmune, representando un fenómeno realmente novedoso en la patogenia de la enfermedad. Estos Ags han sido observados en la estructura de *M. hyorhinis*, *MmmSC* y *M. pneumoniae*. De esta forma, parte de la composición del galactano encontrado en el *MmmSC* presenta similitud antigénica con ciertas proteínas del pulmón bovino y por otro lado, algunas proteínas de *M. pneumoniae* muestran una composición antigénica similar a la de algunas proteínas del pulmón y del cerebro humano **(Gourlay y Howard, 1982)**.

Este hecho ha conducido a demostrar que tras la inoculación de *MmmSC* en bovinos inmunodeprimidos, se produce una mayor diseminación del micoplasma en el pulmón, pero las lesiones resultaron menos intensas que en el caso de animales con un sistema inmunológico normal. Esto puede indicar que los fenómenos de necrosis observados durante la infección pulmonar por *MmmSC* pudieran deberse a una reacción inmunopatológica **(Rosendal, 1988; Topley y Wilson's, 1990)**.

3.2. Factores dependientes del hospedador

Se ha demostrado en estudios “*in vitro*” que los micoplasmas patógenos pueden adherirse a macrófagos y neutrófilos, no siendo fagocitados en ausencia de anticuerpos específicos. Este fenómeno a través del cual *M. pulmonis* evita la fagocitosis ha sido correlacionado con su mayor capacidad de virulencia en el aparato respiratorio **(Howard y Taylor, 1985)**. Igualmente, otros micoplasmas como *M. bovis*, *M. dispar*, *M. arthritis* y *M. hominis* son capaces de impedir su fagocitosis por parte de los PMN neutrófilos **(Gourlay y Howard, 1982)**.

La capacidad de digestión de los micoplasmas por parte de los macrófagos y los neutrófilos también es menor que para el resto de las bacterias. Esto se debe a que la membrana de los micoplasmas es muy rica en lípidos, lo que impide una digestión efectiva. Por esta razón, parte de la membrana de los micoplasmas que no ha sido digerida puede ser expulsada al exterior de los neutrófilos y macrófagos junto a enzimas hidrolíticas, lo que provoca una digestión heterolítica del tejido pulmonar adyacente **(Gourlay y Howard, 1982; Howard y Taylor, 1985)**.

3.2.1. Interacción con el sistema del complemento

La activación del sistema del complemento puede inducir la lisis del micoplasma a través de la cascada del complemento sobre la membrana del mismo **(Rosendal, 1984 a y b)**. *MmmLC* puede activar la vía clásica del complemento en ausencia de anticuerpos detectables, lo que provoca la liberación de las anafilotoxinas C3a y C5a, mediadores químicos inflamatorios, que actúan simultáneamente como activadores de la coagulación.

Todos estos fenómenos pueden afectar directa o indirectamente a las células blanco, "células inocentes" a las que está adherido el micoplasma (**Rosendal, 1984 a**). El conjunto de la activación de estos factores parece establecer el inicio del proceso inflamatorio a nivel pulmonar en la enfermedad natural (**Larsen y cols., 1980**).

3.2.2. Activación del sistema de coagulación

MmmLC es capaz, en la fase septicémica de la enfermedad, de activar el sistema de la coagulación. En este caso se piensa que la activación del sistema de coagulación se debe al daño producido por el micoplasma sobre las células endoteliales de forma directa, lo que ha sido demostrado en estudios "*in vitro*" sobre cultivos de aorta caprina. Este daño endotelial expone el colágeno subendotelial al contacto con los factores de la coagulación, activándose entonces la vía intrínseca de este sistema (**Rosendal, 1984 a y b**).

3.2.3. Actividad inmunosupresora

Las micoplasmosis crónicas y las infecciones persistentes asintomáticas sugieren que la respuesta inmune frente a la infección por estos microorganismos es inadecuada. Se han descrito varias especies de micoplasmas que presentan actividad inmunosupresora "*in vivo*": *MmmSC* en vacuno, *M. gallisepticum* en pollos, *M. arthritis* en ratón y *M. pneumoniae* en humanos (**Gourlay y Howard, 1982; Howard y Taylor, 1985**). En las fases más tempranas de la infección por *M. hyopneumoniae* se ha descrito una inmunosupresión transitoria. Además, este micoplasma produce una supresión de la mitogénesis linfocitaria (**Caruso y Ross, 1990; Asai y cols., 1996; Maes y cols., 1996**).

3.2.4. Mitogénesis no específica de linfocitos

Existen varias especies de micoplasmas con capacidad de estimular, de forma inespecífica, la división de linfocitos en detrimento de una correcta respuesta específica por parte del organismo. La actividad mitogénica puede variar dentro de una misma especie, lo que sugiere una posible correlación entre mitogenicidad y patogenicidad. En relación con este fenómeno se ha observado que extractos de membrana de *M. pulmonis* inoculados por vía intranasal, producen traqueítis y neumonía intersticial con infiltración de linfocitos a nivel perivascular y peribronquial (**Gourlay, 1981**).

3.2.5. Desarrollo de una respuesta inmune específica

La naturaleza y la composición antigénica de los micoplasmas es compleja y está aún sometida a discusión. En 1987 **Emo** estableció dos grupos de Ags:

- a) Ags de superficie, que determinan la especificidad de especie, y que son detectados mediante la prueba de la inhibición del crecimiento, inhibición del metabolismo e inmunofluorescencia.
- b) Ags internos o citoplasmáticos, más o menos comunes a grupos de micoplasmas emparentados, como los que constituyen el grupo *M. mycoides*, y que se demuestran por inmunoelectroforesis.

Para **Howard y Taylor** (1985), la especificidad antigénica no es en ningún caso muy patente entre los micoplasmas, ya que existen numerosas reacciones serológicas

cruzadas entre micoplasmas de diferentes especies, entre micoplasmas y otros gérmenes, y ciertos Ags celulares.

La infección por micoplasmas induce una respuesta inmune humoral y celular específica. En la primera, se producen anticuerpos frente a los micoplasmas de forma local y sistémica, lo que se demuestra serológicamente con técnicas de fijación del complemento, aglutinación, precipitación, inmunodifusión, inmunofluorescencia, inhibición del crecimiento e inhibición del metabolismo. La respuesta celular se demuestra por intradermorreacción “*in vivo*” y por estimulación de linfocitos y producción de linfocinas “*in vitro*” (**Gourlay y Howard, 1982; Howard y Taylor, 1985**). Sin embargo, el poder inmunógeno es muy variable entre especies y cepas, y la curación de una infección natural no suele acompañarse de una protección sólida y duradera (**Howard y Taylor, 1985**).

4. Especies patógenas más representativas de micoplasmas aislados de ganado caprino y porcino

A los efectos de simplificar la presentación, la información será expuesta en la tabla 1:

Tabla 1 Especies patógenas más representativas de micoplasmas aislados de ganado caprino y porcino.

Hospedador	Especie	Patógeno Supuesto o Establecido
Bovinos, ovejas y cabras	<i>Mycoplasma</i>	<i>M. mycoides</i> 'cluster'
	<i>Acholeplasma</i>	<i>MmmSC</i>
	<i>Anaeroplasma</i>	<i>MmmLC</i>
	<i>Ureaplasma</i>	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> (<i>Mmc</i>)
		<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>
		<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>
		Serogrupo 7 bovino
	<i>M. agalactiae</i>	
	<i>M. bovis</i>	
	<i>M. conjunctivae</i>	
Cerdos	<i>Mycoplasma</i>	<i>M. hyopneumoniae</i>
	<i>Acholeplasma</i>	<i>M. hyorhinis</i>
	<i>Ureaplasma</i>	<i>M. hyosynoviae</i>

(Nicolet y cols, 1996)

4.1. Micoplasmosis respiratorias de los pequeños rumiantes

4.1.1. Neumonías producidas por especies del grupo *M. mycoides* en caprinos

Las especies patógenas más importantes del aparato respiratorio, se encuentran agrupadas dentro de lo que se conoce como grupo *M. mycoides* o en inglés "*M. mycoides* cluster", con características serológicas, bioquímicas y genéticas similares (**Cottew y cols., 1987; Bergemann y cols., 1990; Bascunana y cols., 1994; Bashiruddin y cols., 1994**). Dentro de este grupo, los micoplasmas patógenos para el ganado caprino son *Mmm*LC y *Mmc*, así como *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (antiguo *M. Biotipo F-38*) y *M. capricolum* subsp. *capricolum* (**Erno y cols., 1978; Costas y cols., 1987; Cottew y cols., 1987; Jones, 1989; DaMassa y cols., 1992; Taylor y cols., 1992; Leach y cols., 1993**).

Las enfermedades provocadas en caprinos por este grupo de micoplasmas se describen a continuación con mayor detalle.

4.1.1.1. Pleuroneumonía contagiosa caprina clásica.

La PNCC clásica causada por *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (**Leach y cols., 1993**), antes "*M. Biotipo F38*", es la enfermedad más grave que afecta al aparato respiratorio del ganado caprino, al cual afecta en exclusividad. La enfermedad difiere de las neumonías producidas por otros miembros del grupo *M. mycoides* en sus aspectos clínicos, lesionales y epidemiológicos, y se define como una enfermedad producida exclusivamente por las distintas cepas de *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (**MacOwan y Minette, 1976; Jones, 1989; Picavet, 1991; DaMassa y cols., 1992; Leach y cols., 1993**).

La distribución geográfica de la PNCC clásica es muy importante en al menos 30 países de África y Asia, aunque se encuentra principalmente limitada al continente Africano, donde se ha descrito en Kenia (**MacOwan, 1976; MacOwan y Minette, 1977; Litamoi y cols., 1990**), Sudán (**Harbi y cols., 1981**), Etiopía (**Firke, 1984; Thiaucourt y cols., 1992**), Túnez y Libia (**Perreau, 1982**), Omán y Turquía (**Jones y Wood, 1988**) y el Chad (**Lefèvre y cols., 1987a**). Sin embargo, **Lefèvre y cols.**, (1987b) en un artículo de revisión, indican que probablemente en un futuro la distribución de este micoplasma será más amplia.

La enfermedad, que fue descrita por primera vez en 1881 por **Hutcheon** en África del Sur, se caracteriza por presentar lesiones pleuroneumónicas graves causantes de la muerte después de un curso agudo. Los brotes suelen aparecer por la introducción de animales portadores asintomáticos o con afección crónica en rebaños libres de la enfermedad. En estos casos, la enfermedad se extiende rápidamente con una morbilidad que puede llegar al 100% en pocas semanas y una mortalidad que oscila entre el 40 y el 70% del colectivo. Los animales que sobreviven permanecen como portadores crónicos, lo que permite el mantenimiento de la enfermedad de forma enzoótica (**MacOwan y Minette, 1977; Picavet, 1991**). La única vía a través de la cual se ha conseguido reproducir la enfermedad experimentalmente es por vía aérea (**Kaliner y MacOwan, 1976; Perreau, 1984; Perreau y cols., 1984; Lefèvre y cols., 1987a; Morin, 1987**), siendo ésta la vía de contagio de la enfermedad de forma natural.

Macroscópicamente las lesiones pueden ser unilaterales o bilaterales. En los casos agudos, la pleura de las regiones pulmonares afectadas está recubierta normalmente por membranas de fibrina. En la cavidad pleural se observa la presencia de abundante líquido

color amarillento que contiene flóculos de fibrina, la cual coagula parcialmente al contacto con el aire. Las regiones afectadas del parénquima pulmonar constituyen un mosaico de lobulillos que muestran distinto grado de hepatización y un aspecto granuloso al corte. Entre los lobulillos no hay engrosamiento del septo interlobulillar, predominando las lesiones intralobulillares (**Kaliner y MacOwan, 1976; MacOwan, 1984; Jones, 1989**). En los casos crónicos se observan adherencias pleurales fibrosas y, en el parénquima pulmonar, focos necróticos encapsulados por tejido conectivo. Los nódulos linfáticos regionales aparecen hipertrofiados y edematosos (**Kaliner y MacOwan, 1976, Jones, 1989; Picavet, 1991**).

Microscópicamente las lesiones consisten en una pleuroneumonía fibrinosa focal que afecta, en mayor o menor medida, al tejido conectivo intersticial. En la neumonía aguda se observan principalmente cambios vasculares especialmente a nivel capilar, con acúmulo de exudado serofibrinoso en bronquiolos y alvéolos y, la presencia de numerosos macrófagos y neutrófilos. En las fases crónicas del proceso se observa engrosamiento de los septos interalveolares, con depósito de fibrina y proliferación del tejido conectivo (**Kaliner y MacOwan, 1976; Jones, 1989; Picavet, 1991**).

4.1.1.2. Neumonía producida por *Mycoplasma mycoides* subespecie *mycoides* Large Colony.

Cottew y Yeats en 1978 propusieron diferenciar *MmmLC* y *MmmSC*, atribuyendo a las colonias grandes de alto grado de crecimiento a aislamientos provenientes de los caprinos y las colonias pequeñas a micoplasmas patógenos para los bovinos. *MmmLC* ha sido

aislado raramente en ovinos, si bien de forma experimental se ha logrado reproducir la enfermedad en esta especie (**Rosendal, 1981; Truscott y Finley, 1984; Okoh y Ocholi, 1986**). *MmmLC* no es patógeno para el ganado bovino (**Perreau, 1981; Rosendal, 1981; Jones, 1989**).

La distribución de este micoplasma es muy amplia, habiéndose aislado en numerosos países del mundo, y constituyendo un importante problema en el ganado caprino de los Estados Unidos (**DaMassa y cols., 1983a**), Francia (**Perreau, 1979a**), Israel (**Bar-Moshe y Rapapport, 1979 y 1981**) y la India (**Gupta y cols., 1984**), donde es el micoplasma más frecuentemente aislado a partir de lesiones pleuroneumónicas. En España, **Goncer Coca y Rodríguez-Ferri** (1990) realizaron un estudio en 8 explotaciones de ganado caprino encontrando una amplia difusión de este micoplasma. Estos autores describen que *MmmLC* es el micoplasma más frecuentemente aislado del pulmón del ganado caprino, en el que provoca un 37.5% de infecciones graves. Igualmente, el aislamiento de *MmmLC* en las Islas Canarias confirma la amplia difusión de este microorganismo (**Villalba y cols., 1992**).

El contagio natural de este micoplasma se realiza por vía oral, especialmente en cabritos lactantes, a través de leche mamítica (**DaMassa y cols., 1983a**), siendo necesarias altas concentraciones de microorganismos en la leche para que se produzcan lesiones graves (**Bar-Moshe y Rapapport, 1981; DaMassa y cols., 1986**). Se han sugerido otras vías naturales de contagio, como la intrauterina (**Bar-Moshe y Rapapport, 1981**), al observar cabritos neonatos con lesiones articulares de las que se aisló este micoplasma. Además *MmmLC* se ha aislado del conducto auditivo externo de

cabras sanas y enfermas, lo que ha sugerido la posibilidad, aún no demostrada, de esta vía de contagio **(Cottew y Yeats, 1982; DaMassa, 1983a; Hazell y cols., 1985)**.

La enfermedad producida por los distintos aislados de *MmmLC* se caracteriza por la presencia de varias formas clínicas. Una de curso agudo, con septicemia y desenlace fatal, principalmente en los animales más jóvenes **(DaMassa y cols., 1983a)**; una segunda de curso crónico, muchas veces asepticémica y que afecta a los animales jóvenes y adultos; y una tercera producida por algunas cepas de *MmmLC* que inducen artritis y mamitis en animales jóvenes y adultos. **(Perreau, 1979b; DaMassa y cols., 1986)**.

En los brotes descritos, la sintomatología en los animales jóvenes ha sido siempre muy parecida, predominando signos como cojera por la artritis, disnea, respiración abdominal, tos, ruidos respiratorios y exudación nasal purulenta. También se presenta sintomatología septicémica (fiebre, debilidad y anorexia) con rápida postración y muerte en cursos sobreagudos y agudos de la enfermedad. En los casos crónicos, los síntomas más frecuentes son la poliartritis, la pérdida de peso y, en algunos casos, diarrea, generalmente por las complicaciones bacterianas y parasitarias **(Perreau, 1979b; Rosendal y cols., 1979; Bölske y cols., 1982; DaMassa y cols., 1983a; Ruhnke y cols., 1983; Brooks y cols., 1984)**.

Muchos animales se recuperan de la enfermedad, principalmente los adultos, convirtiéndose en portadores inaparentes. Esto ha sido constatado mediante el aislamiento de *MmmLC* del pulmón y mama de individuos aparentemente sanos y/o con mamitis subclínicas **(Kasali y Ojo, 1981; DaMassa y cols., 1992)**. Muchos autores piensan que son necesarios una serie de factores predisponentes para que se desencadene

la enfermedad, entre los que destacan los factores ambientales, el estrés, la presencia de otras especies de micoplasmas o bacterias, coccidiosis, gestación avanzada, etc. **(Rosendal y cols., 1979; Cottew, 1984; Rapaport y Bar-Moshe, 1984; Jones, 1989, DaMassa y cols., 1992).**

En el aparato respiratorio las lesiones suelen estar localizadas preferentemente en los lóbulos apicales y medio. Éstos presentan áreas de hepatización o consolidación, propias de una bronconeumonía. No en todos los casos se afecta la pleura, por lo que las adherencias a la pared costal y al diafragma son inconstantes. También se describe con frecuencia un aumento de la cantidad de un líquido turbio en la cavidad torácica. Histológicamente las lesiones se caracterizan por una neumonía intersticial con peribronquitis y dilatación de los septos interlobulillares. También se describen casos de neumonía fibrinosa y bronconeumonía catarropurulenta con una marcada congestión septal **(DaMassa y cols., 1983a; Rosendal, 1983)**. Es frecuente que las lesiones iniciales inducidas por *MmmLC* se compliquen con otros microorganismos, principalmente *P. haemolytica* y *P. multocida*, observándose entonces lesiones secundarias en dichos pulmones **(Rapaport y Bar-Moshe, 1984; Bölske y cols., 1989)**.

4.1.1.3. Neumonía producida por *Mycoplasma mycoides* subespecie *capri* (*Mmc*).

Mmc ha sido considerado durante muchos años como la responsable de la PNCC clásica **(Jonas y Barber, 1969; Cottew, 1982; Gourlay y Howard, 1982; DaMassa y cols., 1992)** y está clasificado dentro del grupo *M. mycoides*, en íntima relación con *MmmLC*. La asociación inicial de este organismo con la PNCC fue reportado siguiente a su aislamiento

en Nigeria por **Longley** (1951). Exámenes posteriores de ésta y otras muestras a partir de diferentes regiones geográficas, designada la cepa Turca (PG3) como la cepa tipo (**Edward y Freundt, 1956**). La creencia inicial fue que *Mmc* era la mayor causa de PNCC, error que repitió en numerosos aislamientos de agalaxia contagiosa, que fueron en realidad *Mcc* identificados como *Mmc* (**Cottew, 1979**).

La presencia de este micoplasma ha sido notificada en África, Asia y Australia, siendo considerado actualmente por muchos investigadores como una especie inusual o rara (**MacOwan, 1984; DaMassa y cols., 1992**). El aislamiento de *Mmc* en un brote de pleuroneumonía caprina constituye la primera referencia de esta especie en España (**Villalba y cols., 1992**). La cepa patrón de este microorganismo fue aislada por Chu y Beveridge en 1949. Posteriormente se comprobó que la inoculación intramuscular de esta cepa desarrollaba lesiones purulentas en el punto de inoculación, y no lesiones neumónicas (**MacOwan, 1984**). Las lesiones neumónicas sí se producían después de la inoculación intranasal (aerosol), observándose pleuroneumonía en cabra y neumonía en oveja. Estas lesiones diferían claramente de las características propias de la PNCC clásica, por lo que se concluyó que *Mmc* es el agente causal de lesiones pleuroneumónicas, pero no de la PNCC clásica (**McMartin y cols., 1980; MacOwan, 1984**).

En los últimos años han sido muy escasos los aislamientos de este micoplasma, por lo que existe muy poca información adicional sobre la patogenicidad de este microorganismo. La enfermedad producida por *Mmc* se caracteriza por afectar casi exclusivamente a la cavidad torácica, pudiéndose presentar en una forma septicémica pasajera, aunque no es frecuente encontrar otra sintomatología orgánica (**Jones, 1989; DaMassa y cols., 1992**). Excepcionalmente, *Mmc* se ha aislado de mama (**Perreau y**

cols., 1972). En los brotes naturales de la enfermedad el curso puede ser agudo o crónico. En el primer caso, se observan dificultades respiratorias, con respiración abdominal, ruidos, tos y un aumento del reflejo tusígeno. En el segundo caso, los síntomas respiratorios son menos manifiestos y difíciles de detectar, pudiendo pasar desapercibidos **(Jones, 1989; DaMassa y cols., 1992).**

Macroscópicamente, los lóbulos pulmonares muestran distintos grados de hepatización, con moderada dilatación de los septos interlobulillares. La pleura de los lóbulos afectados se presenta con frecuencia cubierta por membranas de fibrina y adherencias al diafragma, pericardio y pared torácica, siendo constante la presencia de hidrotórax normalmente turbio y rojizo. El pericardio aparece engrosado con aspecto blanquecino debido a la presencia de fibrina. Los nódulos linfoides regionales, especialmente los bronquiales y mediastínicos, se observan aumentados de tamaño, edematosos y hemorrágicos. Histopatológicamente, las áreas del pulmón afectado muestran congestión de los septos alveolares, edema alveolar intenso, bronconeumonía purulenta aguda, pleuritis fibrino-purulenta aguda y pericarditis fibrinosa **(Kalinier y MacOwan, 1976; MacOwan, 1976; Ojo, 1976).**

4.1.1.4. Neumonía producida por *Mycoplasma capricolum* subespecie *capricolum* (Mcc)

Tully y cols. en 1974 fue el primero en proponer a *Mcc* como una nueva especie luego de examinar 6 muestras, incluyendo aislamientos realizados por Cordy y cols. en 1955 a partir de un brote de la enfermedad en cabras. Los trabajos de **Tully y cols.** (1974) y

Lemcke (1974) diferenciaron claramente los aislamientos de *Mcc* y *Mmc* (PG3). La descripción de *Mcc* (**Leach y cols., 1993**) se corresponde con la realizada por **Tully y cols.** en 1974 para *M. capricolum*. El ADN de *Mcc* presenta un 80% de homología con respecto al del antiguo *M. Biotipo F38*, por lo que tras diversos estudios (**Christiansen y Erno, 1982; Erno y cols., 1983; Costas y cols., 1987; Bonnet y cols., 1993**) se han considerado los antes denominados *M. capricolum* y *M. Biotipo F-38* como subespecies dentro de una misma especie, pasando a denominarse *Mcc* y *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* respectivamente (**Leach y cols., 1993**). Se adjudicaron a *Mcc* cuando se reexaminó, caracterizó y confirmó otros aislamientos de Zimbawe (**Swanepoel y cols., 1977**) y Australia (**Little-Jhons y Cottew, 1977**); y se observó que a partir del primer aislamiento (**Cordy y cols., 1984**), *Mcc* no fue casi detectado en 2 décadas hasta que fue implicado por **Swanepoel** en 1977. En los 80 es cuando comienza a ser aislado e identificado de cabras y ovejas con agalaxia contagiosa (**Cottew, 1979; Rosendal, 1994**). Esto es atribuible al incremento en el interés por estudiar el papel de los micoplasmas en las enfermedades de los animales.

Mcc es especialmente patógeno para el ganado caprino, aunque también se ha aislado del ganado ovino y bovino. Prácticamente todas las cepas aisladas son patógenas, causando cuadros agudos que afectan a animales de todas las edades y en especial a los más jóvenes, en los que la morbilidad y mortalidad son mayores. Produce aumento de la temperatura corporal y las lesiones más frecuentes consisten en poliartritis, mamitis con reducción de la producción de leche y con menor frecuencia, neumonía (**DaMassa y cols., 1983b, 1984 y 1992; Bölske y cols., 1988; Swanepoel y cols., 1977**). En un estudio de **Rodríguez y cols.** (1996c), indujo aborto 23 días postinoculación con 1×10^5

unidades formadoras de colonias por vía intratraqueal, *Mcc* se detectó en los trofoblastos y en la membrana corioalantoidea de los fetos abortados.

4.1.1.5. Neumonía producida por *Mycoplasma ovipneumoniae*

M. ovipneumoniae es un microorganismo ubicuo que se ha aislado con frecuencia del aparato respiratorio del ganado caprino (**DaMassa y cols., 1992**). La patogenicidad real de este micoplasma es muy controvertida, así para **Goltz y cols.** en 1986, *M. ovipneumoniae* causa neumonías agudas y crónicas y pleuritis en el ganado caprino. Las inoculaciones experimentales realizadas con *M. ovipneumoniae* por vía endobronquial producen signos de enfermedad en animales jóvenes y adultos (**Goltz y cols., 1986**). Sin embargo, otros autores lo consideran apatógeno para el ganado caprino, al haberlo aislado con frecuencia de pulmones de animales sanos (**DaMassa y cols., 1992**). También hay autores que lo consideran apatógeno para los ovinos, después de haberlo inoculado solo o conjuntamente con *P. haemolytica* (**Davies y cols., 1981; Buddle y cols., 1984**).

En un estudio experimental con macerados de pulmón que contenían *M. ovipneumoniae*, se observaron lesiones en el 50% de los animales, que consistieron en una neumonía exudativa-proliferativa intensa. Por el contrario, la inoculación de las cepas después de haberlas cultivado indujo lesiones en el 21% de animales, indicando así la atenuación de *M. ovipneumoniae* por pases en cultivo. Las lesiones macroscópicas se caracterizaron por el engrosamiento pleural, adherencias y abundante líquido amarillento en la cavidad torácica. El parénquima pulmonar situado bajo la zona de pleura afectada presentaba un color rojo-parduzco y una consistencia firme (**Goltz y cols., 1986**). Las

lesiones microscópicas descritas fueron pleuritis fibrinopurulenta con bronquiolitis y alveolitis **(Goltz y cols., 1986)**. En otros casos, se ha observado una neumonía leve con atelectasia y engrosamiento de los septos interalveolares, conteniendo éstos numerosos neutrófilos y linfocitos **(Mohan y Obwolo, 1990)**.

4.1.2. Neumonía producida por *Mycoplasma agalactiae*

Este micoplasma está implicado en el denominado "Síndrome de Agalaxia Contagiosa" en períodos de lactación, lo aisló por primera vez Bridre y Donatien en 1923. Este síndrome afecta a pequeños rumiantes (cabras y ovejas) y se caracteriza por cursar con mamitis, artritis, queratoconjuntivitis **(Rodríguez y cols., 1996d)** y ocasionalmente abortos. Aunque el principal agente etiológico del Síndrome de Agalaxia Contagiosa es *M. agalactiae*, *MmmLC*, *Mcc* y *M. putrefaciens* también contribuyen en la enfermedad, particularmente en las cabras **(Lambert, 1987; Nicholas, 1998)**.

La enfermedad se conoce en Europa desde hace 200 años, en Italia se la conocía como "mal di sito" (mal del lugar). Actualmente, es el síndrome más importante en cabras y ovejas del área Mediterránea. Es una enfermedad endémica en algunos países donde se incluye a España **(Garrido y cols., 1987; Villalba y cols., 1992; Real y cols., 1994)**. Sigue provocando grandes pérdidas económicas, sobre todo por la disminución de la producción lechera. La enfermedad se continúa diseminando, entrando en Cerdeña en 1980, en Brasil en 1986 y en las Islas Canarias en 1992 **(Villalba y cols, 1992; Déniz, 1996; Nicholas, 1998)**.

La agalaxia contagiosa es una enfermedad que aparece en el rebaño en la primavera, después de comenzar la lactación y probablemente representa la activación de una infección latente. Aparece una mamitis uni- o bilateral como resultado de la infección de la glándula mamaria. La mamitis puede progresar a septicemia y muerte en algunos de los animales afectados. Secuelas comunes en los animales supervivientes son artritis y queratoconjuntivitis, por lo que los tres principales signos de este síndrome son la mamitis, la artritis y la queratitis (**Lambert, 1987; Rosendal, 1994; Nicholas, 1998**).

Aunque este micoplasma está implicado más frecuentemente con las mamitis, también ha sido aislado de vías respiratorias (**Gupta y cols., 1984**), pero cuando estudiamos animales de corta edad ocurre algo diferente, donde *M. agalactiae* afecta predominante el aparato respiratorio, seguido de artritis y queratitis (**Bergonier y cols., 1997**). Algunos estudios experimentales han demostrado que *M. agalactiae* puede provocar por vía intratraqueal, neumonías en cabritos de 2 a 4 meses de edad. Sin embargo, la mortalidad en estos trabajos fue muy escasa, manteniéndose el micoplasma en el pulmón de los animales que sobrevivieron (**Guha y Verma, 1987**). Histológicamente, las lesiones encontradas fueron neumonías con distinto grado de intensidad. Los capilares septales mostraron congestión con exudación serosa o serofibrinosa y abundantes macrófagos alveolares. Las lesiones pleuroneumónicas sólo han sido descritas en algunos casos (**Cottew, 1984**). En la tabla 2 observamos los diferentes cuadros clínicos que se pueden encontrar en las cabras.

Tabla 2: Hallazgos clínicos dependiendo de la edad del animal o estado fisiológico.

	Adultos	Hembra lactante	Jóvenes
S. articulares	+++	+	+++
S. respiratorios	-/+	-/+	+++
S. oculares	++	+	+++
S. mamarios	-	+++	-
Abortos	-	+	-
S. Nerviosos	-	-	-
S. Genitales	Se presenta como una forma atípica *		-

S.: Síntomas.

*: granular vulvovaginitis en cabras, particularmente en India y África.

(Singh y cols., 1974; Bergonier y cols., 1997).

En los últimos años se ha comenzado a estudiar cada vez con mayor intensidad la presencia de proteínas inmunogénicamente activas, esto, es una buena herramienta para el estudio de posibles atributos de virulencia, para el desarrollo de test serológicos más específicos y para el desarrollo de vacunas más efectivas. Una proteína de 48 kDa, la llamada P48, ha sido estudiada por estar relacionada con la activación del complemento y la inducción de citocinas. Esta proteína es un buen punto de partida para clarificar los mecanismos patogénicos, la inmunomodulación en el curso de la enfermedad, averiguar la función del gen que codifica dicha proteína y la caracterización antigénica **(Rosati y cols., 2000)**.

4.1.3. Neumonía producida por *Mycoplasma bovis*

Se caracteriza por ser más invasivo y destructivo que otros micoplasmas aislados de casos de neumonía enzoótica bovina, afecta generalmente terneros de 1-3 meses, usualmente requiere además de la interacción de otros organismos bacterianos y víricos que participantes en neumonía enzoótica y factores medioambientales para causar la enfermedad clínica **(Dungworth, 1993)**.

Histológicamente se caracteriza por causar bronconeumonía purulenta con hiperplasia linfoide peribronquiolar y focos de necrosis por coagulación rodeados de macrófagos, células plasmáticas y polimorfonucleares (PMN) neutrófilos **(Dungworth, 1993; Adegboye y cols., 1995b)**. El agente localiza en relación a la superficie del epitelio de bronquiolos y vías respiratorias terminales. Las vías respiratorias pierden el epitelio, se produce un infiltrado inflamatorio necrótico intraluminal que finalmente acaba implicando el parénquima pulmonar. Es posible localizar *M. bovis* en tejido pulmonar utilizando la técnica de inmunohistoquímica **(IHQ)**, el cual se observa especialmente en la periferia de los centros de necrosis **(Adegboye y cols., 1995b; Rodríguez y cols., 1996b)**.

En el caso de las cabras se ha aislado del tracto respiratorio, donde causa bronquiolitis catarral o neumonía broncointersticial leve, subaguda a crónica con hiperplasia linfoide peribronquiolar. Aunque el aislamiento de *M. bovis* no es frecuente en las cabras, la leche bovina se usa frecuentemente como suplemento en la alimentación de cabritos, lo que provee una oportunidad para la colonización de la boca, orofaringe, tráquea y posteriormente pulmón **(DaMassa cols., 1992; Dungworth, 1993)**.

4.1.4. Otras especies no patógenas de micoplasmas

Del pulmón del ganado caprino han sido aislados otros micoplasmas apatógenos. Estos son *M. arginini*, *M. conjunctivae*, *Acholeplasma laidlawii*, y *Acholeplasma oculi* (**Cottew y Yeats, 1982; Jones, 1983; Hazell y cols., 1985**).

4.1.5. Neumonías por pasteurelas en el ganado caprino y ovino

P. haemolytica y *P. multocida* son las dos especies de *Pasteurella* que se han encontrado con mayor frecuencia en pulmones de ovinos y caprinos. La distribución de ambas es mundial, siendo la prevalencia de *P. haemolytica* superior en los pequeños rumiantes (**Carter, 1967; Gilmour, 1980**). Comparativamente, los aislamientos de *P. haemolytica* y *P. multocida* en brotes neumónicos se han descrito con mayor frecuencia en el ganado ovino que en el caprino (**Jones y cols., 1978 y 1982; Jones, 1989 Mugerá y Kramer, 1967; Pegram, 1974; Ojo, 1975; Doutre y Perreau, 1983a,b; Ngatia y cols., 1986; Hayashidani y cols., 1988**).

Las infecciones dobles, bien virus y *Pasteurella* especies (*spp.*) o *Mycoplasma spp.* más *Pasteurella spp.*, inducen los cuadros de lesión más graves en estos animales (**Davies y cols., 1977, 1981 y 1982; Sharp y cols., 1978; Al-Darraj y cols., 1982**). Así, la inoculación experimental de *P. haemolytica* provocó una bronconeumonía purulenta, con presencia de múltiples abscesos con centros necróticos próximos a bronquios, una pleuritis fibrinosa, y una bronconeumonía aguda necrotizante cuando se inoculó previamente el virus *Parainfluenza 3* (**Davies y cols., 1981 y 1982; Buddle y cols., 1984**).

La infección conjunta de *M. ovipneumoniae* y *P. haemolytica* indujo una neumonía crónica acompañada, en algunos casos, de pleuritis (**Jones y cols., 1978**). En la neumonía atípica de la oveja, el aislamiento negativo de *P. haemolytica* se ha interpretado como una rápida eliminación de esta bacteria de las lesiones pulmonares en relación al mismo fenómeno de eliminación de *M. ovipneumoniae* (**Gilmour y cols., 1982**).

Doutre y Perreau (1983a) aislaron 3 cepas de *M. arginini*, 21 cepas de *P. multocida* y 24 cepas de *P. haemolytica* de animales asintomáticos. En todos los casos, los aislamientos se realizaron a partir de muestras de senos nasales, laringe y tráquea, siendo negativas las muestras procedentes del parénquima pulmonar. De esta forma concluyeron que las neumonías por *Pasteurellas spp.* se deben a la complicación de las lesiones producidas por otros agentes. Igualmente, estas bacterias han sido aisladas de brotes de PNCC clásica, así como de lesiones pulmonares de las que se aislaron *MmmLC* y *Mmc* (**Bölske y cols., 1989; Rodríguez, 1993**).

Hasta el artículo publicado por Borgman en 1955, las enfermedades producidas por *P. multocida* y *P. haemolytica* en el ganado caprino fueron atribuidas exclusivamente a *P. multocida* (**Hayashidani y cols., 1988**). En 1960 Gourlay describió el primer caso en el cual se asociaba el aislamiento de *P. haemolytica* a lesiones neumónicas en cabras, sin que se aislaran otros microorganismos (**Hayashidani y cols., 1988**). Posteriormente, **Mugera y Kramer** en 1967 describieron un brote agudo de neumonía causada por *P. haemolytica* que afectó a un total de 20 cabras, muriendo 12 de forma aguda con síntomas respiratorios. Las lesiones encontradas se localizaron en pulmón, pleura y pericardio. El pulmón mostró zonas neumónicas en los lóbulos apicales y medio, con septos interlobulillares engrosados y de aspecto edematoso y fibrinoso, afectando a la pleura de la misma forma. En el

estudio histopatológico, los alvéolos se encontraron con abundante edema proteináceo junto a linfocitos, neutrófilos, macrófagos alveolares y células epiteliales descamadas. En la pleura se observó una inflamación fibrino-purulenta con focos de necrosis **(Jones, 1989)**.

4.2. Micoplasmosis de los porcinos

4.2.1. Neumonía Enzoótica Porcina (NEP)

La NEP, reconocida hace casi 100 años como un serio impedimento para la producción porcina, es una enfermedad respiratoria contagiosa distribuida mundialmente que está presente en la mayoría de las explotaciones (90-95%) afectando al 70-100% de los cerdos. Es una enfermedad crónica que se caracteriza clínicamente por la presencia de tos crónica, disminución en la ganancia diaria de peso, baja mortalidad y alta morbilidad. Se han utilizado diferentes nombres para describir la enfermedad pero NEP es más apropiado dado que describe el comportamiento epidemiológico de la enfermedad y no el agente etiológico o las lesiones que provoca, los cuales pueden variar. La intensificación de los sistemas de producción porcina en las últimas décadas ha contribuido a que la neumonía sea la enfermedad económicamente más importante en los cerdos en etapa de terminación (**Leman y cols., 1982, Morrison y cols., 1986, Falk y Lium, 1991, Lium y Falk, 1991, Maes y cols., 1996**).

El agente etiológico primario de la NEP es *M. hyopneumoniae* (**Maré y Switzer, 1966; Switzer, 1967**). Otros dos mollicutes patógenos suelen aislarse en los cerdos: *M. hyorhinis*, responsable de producir poliserositis en lechones y *M. hyosynoviae*, asociado con artritis en cerdos en etapas de terminación. *M. flocculare*, *M. arginini* y *M. buccale* pueden encontrarse ocasionalmente en el aparato respiratorio sin haberse establecido que tengan capacidad patógena. Simultáneamente se han descrito junto a estos micoplasmas la participación de bacterias, especialmente *P. multocida*, *Actinomyces pyogenes*, *Actinobacillus* (*A.*) *pleuropneumoniae*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.* y *Bordetella bronchiseptica*

(Dungworth, 1993; Friis y Feenestra, 1994; Wallgren y cols., 1994; Harding y cols., 1997).

La forma de transmisión de *M. hyopneumoniae* no se conoce con profundidad, aunque se ha postulado que el contacto directo es la forma más probable. Se ha sugerido como fuente de infección los aerosoles provenientes de los esputos de los animales infectados, siendo el tiempo que pueden sobrevivir dependiente de las condiciones meteorológicas o medioambientales **(Maes y cols., 1996)**. NEP es una enfermedad multifactorial, las condiciones medioambientales y de manejo influyen en la incidencia y severidad de la enfermedad **(Thompson y cols., 1992)**. Períodos de frío y humedad, alto tráfico de animales, estrés, la proximidad a mataderos o criaderos de cerdos, pobres medidas sanitarias y de bioseguridad, son algunos de los factores de riesgo de la enfermedad **(Goodwin, 1985, Thompson y cols., 1992)**.

La adherencia a las células ciliadas de la tráquea, bronquios y bronquiolos es el prerrequisito para la iniciación de la enfermedad, sólo algunos micoplasmas profundizan hasta los alvéolos. *M. hyopneumoniae* no penetra el epitelio de las vías aéreas, se sitúa el ápex de los cilios o en el espacio interciliar **(Blanchard y cols., 1992)**. Se detectó en la misma localización, así como en escasa cantidad de macrófagos, en la luz de bronquios y bronquiolos mediante la técnica de IHQ **(Doster y cols., 1988; Andrada y cols. 1998a y 1998b)**. **Kwon y Chae** (1999) detectaron ADN de *M. hyopneumoniae* mediante hibridación “*in situ*” en el epitelio de bronquios y bronquiolos y en menor medida en macrófagos alveolares e intersticiales.

Zielinski y Ross (1993) demostraron que es necesaria la existencia de receptores de *M. hyopneumoniae* para la adherencia a las células ciliadas del epitelio respiratorio. **DeBey y Ross** (1994) y **Young y cols.** (2000) evaluaron “*in vitro*” las interacciones que se producen entre *M. hyopneumoniae* y las células ciliadas del epitelio de anillos traqueales, observando que se producía ciliostasis y pérdida de los cilios cuando utilizaron cepas con escaso número de pases en cultivo y alta virulencia. Cuando incorporaron un filtro de 0,1 µm, el daño del epitelio no se produjo, demostrando que el daño celular y la ciliostasis se produce sólo cuando *M. hyopneumoniae* se adhiere a las células. Recientemente se ha purificado una proteína de 97 kDa de *M. hyopneumoniae* que los estudios moleculares han demostrado su comportamiento como adhesina. Actualmente se conocen 6 adhesinas más con capacidad para facilitar la interrelación entre *M. hyopneumoniae* y el epitelio de las vías respiratorias (**Ross y Young, 1993; Zhang y cols., 1995; Hsu y cols., 1997; Wilton y cols., 1998**).

A medida que la infección progresa, hay una reducción en la actividad ciliar, una pérdida gradual de los cilios, formación de microcolonias, finalmente se observa una pérdida total de los cilios con descamación y exfoliación de las células epiteliales (**Maes y cols., 1996**). Una proteína citotóxica y otras sustancias nocivas tales como peróxido de hidrógeno pueden estar involucrados en la destrucción de los cilios y células epiteliales. La presencia de mucus en las vías aéreas puede ser explicada por la reducción de la actividad ciliar y la hipersecreción de las células caliciformes y glándulas mucosas (**DeBey y cols., 1992**). Una proteína mitogénica localizada en la membrana del microorganismo sería la responsable de la masiva hiperplasia linfoide alrededor de las vías aéreas y vasos sanguíneos (**Messier y Ross, 1991**). También se ha postulado la supresión en la respuesta

inmune humoral causada por la reducción en la actividad de los linfocitos, la inhibición de la inmunidad celular por la disminución de la fagocitosis por parte de los macrófagos y el aumento de Prostaglandina E₂ (PGE₂) presente en los lavados bronquiales la cual reduce la actividad microbicida de los PMN. Estos efectos supresores son más pronunciados en las etapas tempranas de la infección pero pueden continuar durante varias semanas (**Gourlay y Howard, 1982; Caruso y Ross, 1990; Asai y cols., 1996; Maes y cols., 1996**).

El papel de la inmunidad mediada por células en los animales con neumonías micoplásmicas es ambiguo. En ratones, hamsters y cerdos, la supresión de la inmunidad mediante timectomía o la inyección de un suero anti-timocitos antes de la infección con micoplasmas capaces de producir neumonías dio como resultado el desarrollo de lesiones microscópicas menos severas que en los animales inmunocompetentes (**Denny y cols., 1972; Tajima y cols., 1984; Taylor y cols., 1974**), aunque la cantidad de micoplasmas presentes en el tracto respiratorio fue mayor en los animales inmunosuprimidos (**Denny y cols., 1972; Tajima y cols., 1984; Taylor y cols., 1974**) y la distribución hacia otros órganos de los micoplasmas se detectó más frecuentemente en los ratones inmunosuprimidos (**Denny y cols., 1972**).

La detección de proteínas inmunógenas es una buena herramienta para el estudio de posibles atributos de virulencia, para el desarrollo de test serológicos más específicos y para el desarrollo de vacunas más efectivas (**Strasser y cols., 1992**). En cuanto a la repuesta inmune frente a *M. hyopneumoniae*, **Morris y cols.** en 1994 estimó que la vida media de los anticuerpos calostrales en los lechones es de 15,8 días. La correlación entre los títulos de anticuerpos y la protección contra la enfermedad es pobre (**Kobisch, M.,**

1993, Pijoan, C., 1999). Wallgren y cols. en 1992 detectaron en estudios “*in vitro*” linfocitos circulantes capaces de producir inmunoglobulinas (**Igs**) contra *M. hyopneumoniae* a los 7 días postinoculación con un pico a los 14 días, luego de la segunda inoculación detectaron las células a los 3 días y en 1998 observaron por métodos similares que los lechones comienzan a producir Igs a partir de las 5-9 semanas de edad. Son muy importantes la inmunidad mediada por células, la secreción local de inmunoglobulina (Ig) A que previene la adherencia de los micoplasmas al epitelio ciliado y la IgG facilita la opsonización y posterior fagocitosis por parte de los macrófagos alveolares (**Sheldrake, 1990 y 1993, Walker y cols., 1996**). Hay un aumento en el número de células productoras de Igs en el pulmón de cerdos infectados experimentalmente con *M. hyopneumoniae* (**Messier y cols., 1990**). El fluido de lavados broncoalveolares de animales infectados experimentalmente sufre un incremento en los niveles de factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IL-1, IL-6, IL-8 y PGE₂; los cuales se encuentran directamente correlacionados con el aumento de la presencia de neutrófilos y macrófagos en lavados broncoalveolares (**Asai y cols., 1993, 1994 y 1996, Okada y cols., 2000**).

La sintomatología se caracteriza por la presencia de tos de aparición lenta, a partir de 6 días postinfección, con un pico a los 27 días y prácticamente desaparece a los dos meses (**Sorensen y cols., 1997**). Usualmente las categorías más afectadas son los cerdos en etapa de crecimiento y engorde, pero en algunos casos la sintomatología puede aparecer a las tres o cuatro semanas de edad dependiendo del estado inmune del animal y del manejo del rebaño. En sistemas de producción todo adentro/todo afuera los síntomas pueden atrasarse hasta las 12-20 semanas de edad (**Maes y cols., 1996**). La gravedad de los síntomas depende de la presencia de infecciones secundarias y de las medidas de

manejo del rebaño (**Amass y cols., 1994; Maes y cols., 1996**). Si la infección por *M. hyopneumoniae* no sufre complicaciones con otros agentes, la enfermedad puede cursar subclínicamente, con tos seca no productiva, fiebre leve y anorexia. Si hubiera complicaciones secundarias, la enfermedad puede adoptar un curso clínico con tos productiva, fiebre alta, anorexia, respiración dificultosa a golpes y postración. La morbilidad es alta y la mortalidad se incrementa, los grupos de cerdos no son uniformes, hay abundantes cerdos retrasados y las pérdidas económicas pueden ser muy importantes (**Dungworth, 1993; Maes y cols., 1996**).

La lesión macroscópica más importante corresponde con una consolidación de la región craneoventral del pulmón adoptando una coloración rosa violácea, que presenta en ocasiones pequeños nódulos en el centro de lobulillos atelectásicos indicativos de la presencia de tejido linfoide peribronquiolar. En áreas más crónicas la lesión tiende hacia una coloración gris más deprimida llegando a la formación de cicatrices fibrosas en los lóbulos lesionados (carnificación). Afecta principalmente los lóbulos apicales, medio, accesorio y tercios craneales de los lóbulos diafragmáticos; posiblemente debido a factores aerodinámicos/gravitatorios que producen una mayor carga de infección en los lóbulos craneales. Factores como la acumulación de exudados y mediadores químicos, menor capacidad de defensa del parénquima pulmonar de éstas áreas, escasa ventilación colateral han sido propuestos igualmente. Los lóbulos derechos suelen estar más afectados pero cuando el proceso tiende a ser más extendido, se encuentran afectados tanto derechos como izquierdos, esto probablemente porque el lóbulo apical recibe el aire del bronquio lobar, apical o derecho que proviene directamente de la tráquea. El tejido pulmonar afectado es de consistencia firme y más pesado que el tejido normal y está bien delimitado

del tejido sano que puede presentar un enfisema vicariante. La superficie de corte es húmeda y carnosa, y generalmente se encuentra un exudado catarropurulento en el interior de los bronquios. Bronconeumonías exudativas o neumonía lobar severa, especialmente con necrosis o formación de abscesos, sugieren infecciones bacterianas secundarias (**Lium y Falk, 1991, Strasser y cols., 1992, Dungworth, 1993, Maes y cols., 1996**).

M. hyopneumoniae puede causar en raras ocasiones pleuritis serofibrinosa o fibrinosa que tienden a formar adherencias entre lóbulos y con la pared costal; la afección grave de la pleura, se debe probablemente a infecciones asociadas con *M. hyorhinis* o complicadas con *P. multocida* o *A. pleuropneumoniae*. Los nódulos linfoides mediastínicos presentan una linfadenopatía hiperplásica inespecífica caracterizada por un aumento de tamaño, hiperemia y edematización (**Lium y Falk, 1991, Strasser y cols., 1992, Dungworth, 1993, Maes y cols., 1996**).

Histológicamente se observa en pulmón una neumonía broncointersticial catarral con proliferación peribronquial y perivascular del Tejido Linfoide Asociado a los Bronquios (TLAB). En los casos más graves el TLAB forma centros germinales, hace prominencia sobre la muscular de la mucosa y ocasionan un estrechamiento de la luz de las vías aéreas. En el epitelio de las vías aéreas se observa pérdida de cilios y exfoliación de células ciliadas; existe hiperplasia de células caliciformes en bronquios y bronquiolos, y las glándulas submucosas de los bronquios se encuentran hiperplásicas. El incremento de las células secretoras de moco es el responsable, en parte, de la presencia de gran cantidad exudado mucopurulento en las vías aéreas. El otro componente de la neumonía broncointersticial es la alveolitis, se observa especialmente alrededor de las vías aéreas,

con un engrosamiento de los septos interalveolares causado por la presencia de linfocitos de variado tamaño y escaso número de células plasmáticas; y en la luz de los alvéolos, se observa la presencia de exudado compuesto fundamentalmente por macrófagos y escaso número de células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos. La pared de los alvéolos afectados presenta una hiperplasia de neumocitos tipo II que reemplazan a los neumocitos tipo I. Los primeros estadios de la enfermedad se caracterizan por una bronquitis purulenta aguda con hiperemia, edema e infiltrado de PMN neutrófilos. La masiva hiperplasia del TLAB en extensas áreas del parénquima pulmonar y la proliferación de tejido conjuntivo intersticial con escaso infiltrado septal e intraluminal de macrófagos y PMN neutrófilos corresponde a una infección crónica (**Strasser y cols., 1992, Dungworth, 1993, Maes y cols., 1996**).

5. Sistema respiratorio

5.1. Pulmón

Los pulmones se encuentran divididos en lóbulos pulmonares que en los rumiantes y porcinos se denominan: apical (dividido en porción anterior y posterior en el pulmón izquierdo), medio (solo en el pulmón derecho), diafragmático y accesorio (que se considera parte del pulmón derecho). La tráquea se divide en los bronquios principales, que penetran en el parénquima pulmonar a nivel del hilio y se dividen en bronquios lobares, a continuación se ramifican por dicotomías sucesivas, dando lugar a vías respiratorias cada vez más pequeñas. Es destacable la presencia en los rumiantes y porcinos de un bronquio lobar, apical o derecho que origina de la tráquea directamente

para el lóbulo apical derecho antes de dividirse en los bronquios primarios **(Dellmann, 1980; Hare, 1982 a y b)**.

Las divisiones sucesivas de los bronquios acaban en los bronquiolos, que carecen de cartílago y de glándulas submucosas en sus paredes, a diferencia de los anteriores. En la transición, a medida que disminuye el cartílago en la pared del árbol bronquial, el músculo liso se hace cada vez más dominante y presenta pliegues longitudinales de altura variable, probablemente como consecuencia de la contracción postmortem de la musculatura lisa. Los bronquiolos dan lugar a los bronquiolos terminales. La parte del pulmón distal al bronquiolo terminal se llama acinus o unidad respiratoria final, tiene una forma aproximadamente esférica **(Dellmann, 1980; Banks, 1986; Fawcett, 1995)**.

La unidad respiratoria final está formada por bronquiolos respiratorios (procedentes del bronquiolo terminal), no se desarrollan igual ni existen en todas las especies. A menudo se hallan bien desarrollados en los carnívoros y monos, y son poco frecuentes en rumiantes y cerdo. Luego, estos bronquiolos van seguidos de los conductos alveolares, los cuales se ramifican inmediatamente y desembocan en los sacos alveolares (extremos ciegos de las vías respiratorias, cuyas paredes están formadas completamente por alvéolos). Los alvéolos se abren en los conductos a través de grandes orificios denominados atrios. Los racimos formados por tres a cinco bronquiolos terminales, cada uno de ellos con sus acinos correspondientes, suelen denominarse lobulillos pulmonares. La arquitectura lobulillar es muy prominente en rumiantes y cerdos **(Dellmann, 1980; Banks, 1986; Dungworth, 1993; Fawcett, 1995)**.

Acompañando a las ramificaciones bronquiales existe una doble circulación arterial (funcional y nutricia). En torno al hilio pulmonar, se forman plexos nerviosos con fibras simpáticas y parasimpáticas, que dan origen a nervios intrapulmonares que acompañan a las ramas bronquiales y vasculares. Dos juegos de vasos linfáticos drenan los pulmones: los superficiales y los profundos. Los capilares linfáticos del drenaje superficial se originan en el tejido conjuntivo pleural y drenan hacia el hilio en el tabique interlobulillar. Los vasos profundos se originan a nivel de los bronquiolos respiratorios o terminales y siguen el patrón del árbol bronquial hacia el hilio del pulmón. Los vasos profundos se anastomosan con el drenaje superficial en los tabiques interlobulillares. No se han demostrado vasos linfáticos interalveolares (**Banks, 1986; Fawcett, 1995; Kobzik, 2000**).

La mucosa respiratoria está revestida por:

- **Células epiteliales** pseudoestratificadas, cilíndricas y ciliadas, que se entremezclan en las vías respiratorias que contienen cartílago con abundantes células caliciformes. Se extienden desde la lámina basal hasta la luz de las vías aéreas, son columnares y en la superficie luminal presentan numerosos cilios y microvellosidades. Los cilios se encuentran anclados a la porción apical del citoplasma por los corpúsculos basales y se distinguen por presentar 9 microtúbulos en la periferia y un par central. Las microvellosidades no presentan una estructura interna aparente. El citoplasma presenta una distribución profusa de ribosomas y mitocondrias en la porción apical de la célula (particularmente en relación con las raíces de los cilios). Alrededor del núcleo se observan vesículas aisladas de retículo endoplásmico liso. El citoplasma es más electrolúcido que el de las células no ciliadas de Clara de los bronquiolos terminales. El complejo de Golgi se encuentra bien desarrollado en posición supranuclear. Se

observan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos cuya naturaleza y función no están claras, aunque se cree que están relacionados con la secreción de glucoconjugados macromoleculares. El núcleo es oval y se encuentra basalmente. Lateralmente las células se encuentran separadas de sus vecinas por un espacio intercelular fino y cerca del borde apical presentan uniones fuertes del tipo *zonula ocludens* o unión estrecha. Ocasionalmente, se identifican células que presentan microvellosidades y corpúsculos basales sin cilios que se estima que son células ciliadas en regeneración (**Varsano y cols., 1987; Kahwa y cols., 1997**).

- **Células caliciformes** secretoras de moco que disminuyen gradualmente en número hasta que desaparecen a nivel de los bronquillos, cuyo epitelio lo constituyen sólo células ciliadas y células de Clara. Las células productoras de moco son cuboidales y se encuentran adheridas apicalmente a sus vecinas mediante uniones estrechas o *zonulas ocludens*. La superficie del borde luminal presenta microvellosidades cortas y subdivididas. El núcleo, amplio y con nucléolos prominentes, se encuentra se encuentra en posición basal. Algunos gránulos electrolúcidos de mucus se observan en la región supra y subnuclear, los gránulos se encuentran formados por una única membrana que contiene el material floculento y electrolúcido. Otros gránulos presentan una densidad media. El retículo endoplásmico rugoso es abundante en estas células, el retículo endoplásmico liso es mucho menos abundante, particularmente en la mitad apical de la célula. El ápice de estas células hace protuberancia hacia la luz de las vías aéreas (**Kahwa y cols., 1997**).

- **Células de Clara** no ciliadas se observan en los bronquiolos terminales, son cuboidales, comúnmente presentan protuberancias apicales características y numerosas microvellosidades cortas y achatadas. Las células se encuentran unidas apicalmente a sus vecinas mediante uniones estrechas o *zonulas ocludens* y en el borde basal presentan numerosas interdigitaciones con las células vecinas. El retículo endoplásmico liso se encuentra en la región apical así como en la región vasolateral y pueden encontrarse unos pocos cuerpos de inclusión basofílicos cerca de la membrana basal. En la región apical se observan gránulos poco electrodensos cerca de la membrana limitante y mitocondrias con matriz poco electrodensa. Aunque su función no ha sido aclarada completamente, se acepta generalmente que su función es secretora como las células caliciformes o neumocitos tipo II y también se ha postulado que realizan una función en la eliminación de toxinas pulmonares (**Plopper y cols., 1989; Fawcett, 1995; Kahwa y cols., 1997**).

La altura del epitelio va disminuyendo progresivamente a lo largo del tracto, para hacerse cuboidal bajo en los bronquiolos terminales. La lámina propia, que está separada del epitelio por una lámina basal robusta, está formada por tejido conjuntivo laxo rico en fibras reticulares y elásticas, fibroblastos, linfocitos, células cebadas y algunos eosinófilos. Además, en la mucosa bronquial existen células neuroendocrinas dotadas de granulaciones de tipo neurosecretor y, finalmente, hay numerosas glándulas secretoras de moco, distribuidas a lo largo de las paredes de la tráquea y bronquios (pero no en los bronquiolos) (**Dellmann, 1980; Fawcett, 1995; Kobzik, 2000**).

Los septos, tabiques o paredes alveolares constan, desde el lado capilar a la superficie alveolar de las siguientes estructuras:

- **Endotelio capilar**, es continuo no fenestrado, tapiza la red entrelazada de capilares anastomosados, está constituido por células endoteliales, que son planas excepto en la región donde se localiza el núcleo, donde hace un abultamiento hacia la luz. Las prolongaciones citoplasmáticas de estas células presentan numerosas vesículas plasmalemales que pueden estar localizadas en el borde luminal, estar libres en su citoplasma o en el borde antiluminal y que son consideradas como estructuras dinámicas que responden activamente a varios tipos de injurias causadas experimentalmente, especialmente durante el edema pulmonar. En la región paranuclear se encuentran el complejo de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, liso, cuerpos multivesiculares y vesículas plasmalemales. Las uniones intercelulares de las células endoteliales son de tipo cerrado (**Atwal, 1988; Simionescu y Simionescu, 1991; Kahwa y cols., 1997**). Los macrófagos intravasculares pulmonares son una población de fagocitos mononucleares residentes que se encuentran adheridos al endotelio capilar de los rumiantes, cerdos y gatos; poseen una morfología similar a la de las células de Kupffer de los sinusoides hepáticos, retienen restos de células sanguíneas, bacterias y partículas de la sangre por endocitosis. Son células mononucleares grandes, de 20 a 80 μm con bordes irregulares y numerosos pseudopodos. El borde luminal está cubierto por el glucocálix y la superficie adherente se encuentra preferentemente asociada a las células endoteliales en la porción más gruesa de la pared alveolar para no interferir con el intercambio gaseoso; poseen un núcleo grande arriñonado, retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias, lisosomas y aparato de Golgi bien desarrollados. Aunque lo destacable es la relación con las células endoteliales, la presencia de estructuras tubulares vermiformes de

micropinocitosis (se encuentran en las células del sistema mononuclear fagocítico y representan una forma intensificada de endocitosis mediada por receptores), fagosomas con restos celulares y particularmente siderosomas. Finalmente, íntimamente asociado al endotelio capilar están los pericitos que probablemente están involucrados en la regulación de la microvasculatura (**Winkler y Cheville, 1985; Winkler, 1988**).

- Las **membranas basales** y el **tejido intersticial circundante** están separando a las células epiteliales del revestimiento alveolar. En las zonas delgadas del tabique alveolar, las membranas basales del epitelio y el endotelio están adosadas, mientras que las partes más gruesas ambas están separadas por un espacio intersticial (el intersticio pulmonar) que contiene fibras elásticas, haces de colágeno, escasas células conectivas fusiformes, células musculares lisas, mastocitos, linfocitos y monocitos (**Banks, 1986; Dungworth, 1993; Fawcett, 1995; Kahwa y cols., 1997**).
- El **epitelio alveolar** que consta de una capa continua con dos tipos de células principales:
 - **Neumocitos tipo I** (o neumocitos membranosos) aplanados, como un pavimento en forma de lámina que cubre el 95% de la superficie alveolar, que es ideal para el intercambio de gases pero que los hace mas vulnerables a las agresiones externas. Contienen un núcleo oval rodeado por escaso pericarión, además poseen un citoplasma extendido que cubre la mayor parte de la superficie alveolar. El citoplasma posee escasas organelas excepto por la presencia de numerosas vesículas pinocíticas. Ocasionalmente las células presentan protuberancias a partir de la superficie luminal

que se parecen a microvellosidades. En las uniones intercelulares se observan numerosas interdigitaciones y un tipo de unión *nexo* o *unión fisura*. Comúnmente se observa retículo endoplásmico tubular (especialmente en cabras adultas), que es un retículo endoplásmico liso modificado evidenciable cuando se utiliza la perfusión de glutaraldehído por vía vascular como método de fijación y que en íntima relación con vesículas plasmalemales formaría un sistema que sumado al de las células endoteliales capilares intervendrían en procesos de transporte de gases de origen ruminal hacia las vías aéreas para ser eructados. Los cuerpos laminares y partículas de glucógeno que se encuentran especialmente en las cabras viejas están asociados a la producción y almacenaje de fosfolípidos (**Atwal, 1988; Dungworth, 1993; Fawcett, 1995; Kahwa y cols., 1997**).

- **Neumocitos tipo II**, son redondeados, se observan ocupando una porción en el rincón de los espacios alveolares y pueden poseer dos bordes luminales, uno para cada espacio alveolar. Presentan numerosas microvellosidades en las superficies libres. El citoplasma contiene numerosos cuerpos multilaminares constituidos por numerosas capas dobles de fosfolípidos rodeadas por una membrana que varía en tamaño y número de célula a célula. Las mitocondrias son grandes, bien formadas, con una matriz electrodensa y presencia de cristales. Poseen retículo endoplásmico liso y rugoso, numerosos cuerpos multivesiculares y lisosomas. Se observan ocasionalmente el aparato de Golgi y numerosas vacuolas lipídicas de tamaños variables. El núcleo es grande, se sitúa centralmente, es vesicular y evidente por la naturaleza de su eucromatina delicadamente dispersa; ocasionalmente se puede observar un nucléolo. Los mecanismos de unión entre los neumocitos tipo I y II son principalmente del tipo

estrecha o *zonula ocludens* y mácula densa. Además se observan numerosas glicoproteínas que contribuye a la electrodensidad del espacio intercelular. Estos neumocitos producen surfactante constituido principalmente por fosfatidilcolina y son las principales células que intervienen en la regeneración del epitelio alveolar. Las paredes alveolares no son continuas, sino que están perforadas por los poros alveolares o de Kohn, son frecuentes en los carnívoros pero escasos en los rumiantes y porcinos permitiendo el paso de aire, bacterias y exudados de los alvéolos adyacentes **(Winkler, 1988; Dungworth, 1993; Kahwa y cols., 1997)**.

- Los **macrófagos alveolares** derivan de los monocitos sanguíneos, más tarde alcanzan el intersticio de los pulmones, donde se transforman en macrófagos que migran hacia la luz de los alvéolos. Estas células pertenecientes al sistema mononuclear fagocitario no forman parte de la pared alveolar, como se sugirió en un principio confundiéndolas con células epiteliales descamadas, sino que migran sobre su superficie luminal. Aunque la mayor parte de la actividad proliferativa que da origen a los macrófagos tiene lugar en la médula ósea, los histiocitos del intersticio pulmonar también poseen una limitada capacidad de división. Localizadas sobre la superficie luminal, están en contacto directo con las partículas de polvo y las bacterias inhaladas que pueden haber escapado al atrapamiento por el manto de moco en las porciones proximales de la vía respiratoria. Constituyen la primera línea de defensa frente a la infección pulmonar y superan con mucho al resto de los tipos celulares del pulmón, son continuamente eliminados y sustituidos. Muchos de ellos migran desde los alvéolos hasta la superficie de los bronquios, y son transportados por acción de los cilios a través del sistema respiratorio superior hasta la faringe, en donde son deglutidos con la saliva. El

mecanismo de su movimiento hasta los bronquiolos no ha sido aclarado del todo, pero la producción continua de agente tensioactivo y el trasudado de líquido desde los capilares forman probablemente una película que se desplaza en superficie y que contribuye al movimiento dirigido de estas células **(Dungworth, 1993; Fawcett, 1995; Kobzik, 2000)**.

5.2. Pleura

La pleura consiste en una fina capa de tejido conjuntivo con escasos fibroblastos, fibras de colágeno y varias capas de fibras elásticas. En su superficie interna está cubierta por una capa de células mesoteliales similar a la que reviste la cavidad peritoneal. La capa de mesotelio situada sobre la pared torácica es la pleura parietal y la que se refleja sobre la superficie de los pulmones es la pleura visceral. Una característica especial de la pleura es el gran número de capilares y linfáticos que contiene. Es relativamente gruesa en los rumiantes y se continúa con el tejido conjuntivo interlobulillar que separa completamente los lobulillos pulmonares en los rumiantes y porcinos **(Dellmann, 1980; Dungworth, 1993; Fawcett, 1995)**.

6. Mecanismos de defensa de las vías respiratorias

6.1. Mecanismos protectores de carácter no inmunológico

Las vías respiratorias están en íntimo contacto con el interior del organismo y su naturaleza hace posible el libre acceso del aire hacia los alvéolos. Este sistema requiere de un filtro, el aire se depura de la mayor parte de las partículas suspendidas mediante fenómenos de turbulencia que las orientan hacia las paredes; éstas, se encuentran cubiertas de moco, al cual aquellas se adhieren. La turbulencia se debe a la conformación de cornetes, tráquea y bronquios; esto hace que las partículas mayores a 10 μm de diámetro aerodinámico se depositen en las regiones anteriores a la laringe junto a un gran porcentaje de bacterias y virus, lo que permite su multiplicación o replicación en el epitelio o en el tejido linfoide de la porción alta del sistema respiratorio para posteriormente diseminarse o ser nebulizados durante la inspiración para ser transportados al sistema respiratorio profundo. Las partículas de tamaño aerodinámico menor de 2 - 10 μm pueden ser inhaladas y exhaladas o impactar por inercia en la superficie de la mucosa de los bronquios debido a los bruscos cambios de dirección que ocurren en las bifurcaciones. El punto crítico se produce con partículas de 1 - 2 μm , que pueden depositarse en la unión bronquiolo-alveolar, esto se debe a que el diámetro de las vías respiratorias se incrementa repentinamente en este sitio lo que hace que la velocidad del tránsito del aire se aproxime a cero y se depositen por la fuerza gravitacional lo que predispone a que esta zona sea especialmente vulnerable a los irritantes inhalados **(Dungworth, 1993; López, 1995; Tizard, 2000).**

Las partículas de 1-2 μm adquieren mayor relevancia debido a que las microgotas de este tamaño que se producen durante el estornudo de un animal enfermo o portador de un patógeno, son las que poseen mayor capacidad para mantenerse en suspensión y pueden transportar en su interior bacterias o virus que se depositarán en la unión bronquiolo-alveolar de otro animal. Este mecanismo de transmisión ha motivado numerosos trabajos de investigación y aún no ha sido aclarado completamente, permaneciendo dudas referentes a la capacidad que poseen estas microgotas de viajar a distancia o para resistir a la desecación. Pero se ha confirmado que el mayor éxito en la transmisión de enfermedades se produce entre animales que contactan nariz con nariz en el mismo ambiente (**Dungworth, 1993; López, 1995; Tizard, 2000**).

Las vías respiratorias superiores están cubiertas en sus paredes de una capa de moco producido por células caliciformes y el cual tiene propiedades “antisépticas”, principalmente debido a que contienen lisozima e IgA. Esta capa mucosa mantiene un flujo continuo que transporta secreciones desde los bronquiolos hasta la tráquea por la acción ciliar o, en sentido retrógrado, a lo largo de la cavidad nasal, hasta la faringe donde es deglutido. Las partículas menores de 5 μm pueden evadir este obstáculo mucociliar y llegar al alvéolo, donde son fagocitadas por macrófagos alveolares. Una vez que estas células han ingerido con éxito las partículas, migran hacia el sistema mucociliar y también son transportadas hasta la faringe (**Dungworth, 1993; Tizard, 2000**).

6.2. Mecanismos protectores de carácter inmunológico

El pulmón puede ser dividido en distintos compartimentos linfoides, el parénquima pulmonar, los espacios broncoalveolares, la lámina propia, los espacios vasculares y el TLAB (**Pabst, 1995**). Posee una cantidad considerable de tejido linfoide que se distribuye de manera difusa en la lámina propia de las vías aéreas (zona efectora) o formando nódulos próximos a las vías aéreas donde forman el TLAB (zona inductora). En las zonas inductoras tiene lugar el contacto con el antígeno (Ag) y la inducción de respuestas iniciales. En las zonas efectoras se localizan las células plasmáticas productoras de IgA del isotipo secretor (**McGhee y cols., 1992**).

Este TLAB es un tejido linforreticular que se encuentra localizado principalmente en el interior del ángulo formado por la bifurcación de los bronquios y bronquiolos; dicha área es especialmente importante dado que impactan gran cantidad de partículas en esta zona. La estructura histológica del tejido linfoide muestra una morfología común en ambas especies, se parece a las placas de Peyer del intestino delgado, facilita el atrapamiento antigénico y tiene un papel similar en la inmunidad de las mucosas. Normalmente se encuentra compuesto de un único folículo linfoide que hace protuberancia hacia el tracto respiratorio y forma un nódulo, el folículo linfoide se extiende desde la submucosa hasta la membrana basal del epitelio respiratorio y establece contacto directo con la misma. Se suele observar una arteriola pasando junto al folículo. Los folículos linfoides se encuentran compuestos principalmente por linfocitos y pocas células reticuloendoteliales. El epitelio especializado que cubre los folículos linfoides está compuesto de células columnares que pueden ser cuboidales o aplanadas sobre el nódulo y que se considera son análogas a las células M de las placas de Peyer y cuya función sería

la de transporte de Ags desde la luz hasta los linfocitos intraepiteliales (los mecanismos de activación a nivel de la lamina propia siguen un esquema de cooperación celular que se describirá más adelante). Ultraestructuralmente las células epiteliales cuboidales o planas presentan proyecciones citoplásmicas cortas en vez de cilios en su superficie y se encuentran conectadas con sus vecinas por medio de interdigitaciones y desmosomas. El citoplasma es electrodensito y presenta pocas mitocondrias y ribosomas. Muchas células presentan un núcleo prominente con indentaciones de la membrana nuclear. Las partículas son fagocitadas y transportadas por macrófagos y células dendríticas especializadas, esto facilita que los linfocitos tomen contacto con los Ags potencialmente patógenos y reacciona con una hiperplasia muy marcada en las enfermedades respiratorias crónicas **(Pankow y Wichert, 1988; Huang y cols., 1990; Pabst y Binns, 1994; López, 1995; Barman, y cols., 1996; Sánchez-Vizcaíno, 2000).**

La localización del TLAB es en la mucosa y submucosa, sintetiza principalmente IgA secretoria, en especial en las vías respiratorias superiores. Sin embargo, en los bronquiolos y en los alveolos, las secreciones contienen una gran proporción de IgG, cuya concentración tiene un valor intermedio entre las cifras de tráquea y suero. En los tejidos linfoides de las vías respiratorias superiores también se sintetiza una cantidad importante de IgE. Como en otras superficies corporales, se cree que la IgA de las vías respiratorias ejerce su acción protectora al evitar la adherencia de las partículas antigénicas, y entre ellas, de los microorganismos, mientras que IgG sólo parece tener una gran importancia cuando se produce una inflamación aguda y la correspondiente trasudación de proteínas séricas **(Huang y cols., 1990; Busse, 1991; Pabst y Binns, 1994; Tizard, 2000).**

Los microorganismos y Ags complejos llegan principalmente hasta los nódulos linfáticos del TLAB (zonas inductoras) son incluidos en endosomas por las células especializadas de la superficie y transferidos intactos al tejido subyacente donde se encuentran las células linfoides que los procesarán y presentarán a los linfocitos B y T (**Inman y Cantey, 1983; Wolf y cols., 1981**). En las zonas efectoras también se produce captación de Ags, pero mediante mecanismos diferentes. En este caso el Ag puede entrar por endocitosis a través de las mismas células epiteliales o atravesando las llamadas uniones estrechas o *zonulas ocludens* (**Torres, 1997**). La estimulación antigénica en las zonas inductoras produce también la inducción de inmunidad sistémica mediante IgGs e IgAs circulantes. La inmunidad lactogénica a través de la administración oral de un Ag fue demostrada por vez primera por **Montgomery y cols.** (1974) en conejos. Posteriormente esto fue corroborado en muchas otras especies animales, incluyendo el cerdo (**Saif y Bohl, 1986**). Esto se debe a que las células inducidas por un Ag en el pulmón abandonan el pulmón vía vasos linfáticos y alcanzan la circulación sistémica a través del conducto torácico. Finalmente migran hasta las diferentes zonas efectoras, como la lámina propia de glándulas mamarias, salivares y lacrimales, donde se produce su diferenciación.

A continuación se describirá las principales células que participan en el sistema inmune pulmonar: macrófagos, células presentadoras de Ag y linfocitos.

6.2.1. Macrófagos

Los macrófagos derivan de los monocitos sanguíneos, que representan un reservorio circulante, de donde migran a los diversos tejidos convirtiéndose en macrófagos. Son

células grandes, de alrededor de 15 μm de diámetro, con un solo núcleo que puede ser redondo, arriñonado o lobulado, un citoplasma abundante, aparato de Golgi desarrollado, retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y gran cantidad de lisosomas, muy ricos en enzimas hidrolíticas, proteasas y lipasas; que juegan un papel importante en los procesos de lisis intracelular que siguen a la ingestión de sustancias e indica su gran capacidad para sintetizar y secretar proteínas. Lisozima es un ejemplo, es una enzima que se encuentra en altas concentraciones en los lisosomas de los macrófagos y PMN neutrófilos, en el aparato respiratorio se encuentra en el moco bronquial, entre otras actividades ataca los peptidoglicanos de la pared de las bacterias y es una potente opsonina; esta enzima es marcada mediante IHQ para determinar la presencia de macrófagos y neutrófilos **(Álvarez y cols., 1997; Sánchez-Vizcaino, 2000; Tizard, 2000)**.

Poseen receptores de la fracción Fc de la IgG, y para diversos factores del complemento. Intervienen en la respuesta inmune captando el Ag, procesándolo y presentándolo a los linfocitos T específicos. Además liberan diversos factores solubles (IL-1, IL-6, TNF) que modulan esta respuesta inmune. Por último, median también funciones efectoras, como la lisis de microorganismos y de células tumorales de forma directa o a través de sus receptores para Igs y factores del complemento **(Suter, 1990; Álvarez y cols., 1997)**. La síntesis de IL-1 y TNF- α puede dar lugar también a la secreción de las proteínas de fase aguda, estimulando la producción de prostaglandinas y enzimas proteolíticas, y realizando la infiltración celular por quimiotaxis y mitosis. La IL-1 también desempeña un papel importante en las respuestas inmunes específicas de Ag, actuando como señal temprana en la activación de los linfocitos T, y participando en la red de citocinas que regula la diferenciación de los linfocitos B **(Mossmann y Coffman,**

1989; Nash y cols., 1992). Las citocinas juegan un papel dominante en la regulación de la capacidad funcional del macrófago durante respuestas inmunes específicas de Ag y no específicas, en primer lugar como moléculas que influyen directamente en el nivel funcional de los macrófagos, y en segundo lugar, como las moléculas efectoras de macrófagos activados (**Cao y cols., 1989**). Las citocinas pueden regular también la expresión del Ag de MHC II en los macrófagos (**Nash y cols., 1992**) y, puesto que los receptores de los linfocitos T reconocen el Ag en el contexto del MHC I o II, esta activación de los receptores de macrófagos son determinantes para el comienzo y desarrollo de la respuesta inmune.

Son células que fagocitan con avidez, de ahí el nombre de “fagocitos mononucleares”. En contraste con los neutrófilos, los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear son capaces de sostener una actividad fagocítica repetitiva. Los macrófagos se encuentran distribuidos en todo el cuerpo, los inmaduros se encuentran en la sangre como monocitos (5% de la población leucocitaria sanguínea total), en el tejido conectivo donde se conocen como histiocitos y en el pulmón macrófago alveolar, entre otros distribuidos por diversos tejidos. Sin embargo, ésta es solo una de sus funciones, también procesan y presentan Ags para la preparación de una respuesta inmunitaria; liberan mediadores solubles que amplifican la respuesta inmuno-inflamatoria; contribuyen directamente a la reparación del daño tisular mediante la eliminación del tejido que está en proceso de muerte y del dañado, y asisten en el proceso de regeneración (**Suter, 1990; Tizard, 2000**).

6.2.2. Células presentadoras de antígeno

Los **macrófagos** son las células presentadoras de Ag mejor estudiadas, pero no son las únicas, las **células dendríticas** y los **linfocitos B**, juegan un papel importante. Aunque todos los macrófagos fagocitan Ags, sólo algunos pueden procesar Ags exógenos de una manera que puedan estimular una respuesta inmunitaria. Las células presentadoras de Ag tienen una familia especializada de receptores proteicos en su superficie, la cual se denomina Ag **MHC** (de las palabras inglesas “**M**ayor **H**istocompatibility **C**omplex”, Complejo Mayor de Histocompatibilidad) **de clase II (MHC II)** que en los cerdos se denomina **SLA** (de las palabras inglesas “**S**wine **L**eucocyte **A**ntigens”, Ags Leucocitarios Porcinos) **de clase II**, a diferencia del resto de células con núcleo que son **MHC de clase I (MHC I) o SLA I** positivas. Para simplificar cuando se hable de MHC en este texto se estará englobando a ambos, MHC y SLA salvo aviso de lo contrario. Los MHC II son proteínas de transporte que fijan fragmentos de Ag y los conducen hasta la superficie celular, una vez en ella, presentan el Ag a los **linfocitos T cooperadores**, estas células reconocen el Ag sólo cuando está unido físicamente a un Ag MHC II. Pero la presentación de un Ag unido al MHC II es insuficiente para activar una respuesta inmunitaria, la célula T debe ser expuesta a proteínas “coestimuladoras” secretadas por el macrófago, entre las más importantes se encuentra la IL-1 (**Marrack y Kappler, 1986; Suter, 1990; Álvarez y cols., 1997; Banchereau y Steinman, 1998; Howard y cols., 1999**).

Las células dendríticas se cree que derivan de los monocitos sanguíneos, son células mononucleares con un núcleo arriñonado y citoplasma claro; se localizan en todos los tejidos, pero se concentran de manera especial en los órganos linfoides. Forman una

extensa membrana interdigitante compuesta de protuberancias citoplasmáticas (dendritas), que permite un fuerte atrapamiento del Ag (mucho más eficientemente que el macrófago). Funcionan de dos formas, en un animal que tuvo un contacto previo con el Ag, simplemente proporcionan una superficie sobre la cual puede ser presentado el Ag junto al MHC II y en los animales con complejos Ag-anticuerpo circulantes, las células dendríticas son capaces de retener al Ag en su superficie durante más de tres meses **(Algarra y Garrido, 1998; Banchereau y Steinman, 1998; Howard y cols., 1999)**. Otra proteína que es utilizada para marcar las células dendríticas es la proteína S-100 **(Sugimura y cols., 1990)**, es una proteína ácida denominada de esta forma porque es 100% soluble en sulfato amónico neutro **(Moore, 1965)**.

Los linfocitos B pueden reconocer el Ag incluso en su forma nativa (Ag libre sin necesidad de estar asociados al MHC o de haber sido transformados), a través de sus Igs de superficie sus receptores de anticuerpo, después lo internalizan, lo fragmentan y lo presentan en asociación con MHC II en su membrana plasmática. En definitiva, actúa de forma similar a las otras células presentadoras de Ags, aunque presenta dos diferencias principales: el Ag puede ser reconocido en su forma nativa y de forma específica mediante las Igs de superficie, y otra que no hay fagocitosis **(Suter, 1990; Banchereau y Steinman, 1998; Sánchez-Vizcaíno, 2000)**.

Sin embargo, algunos Ags que disparan una respuesta inmunitaria no son fagocitados sino que se originan dentro de la propia célula. Algunos ejemplos de éstos son glucoproteínas o nucleoproteínas sintetizadas por las células infectadas por virus. La diferencia del manejo entre estas proteínas y los Ags exógenos radica en que después de la fragmentación se unen a Ags de MHC I y son transportadas a la superficie celular y

activan a las células citotóxicas que destruyen a dichas células (**Suter, 1990; Sánchez-Vizcaíno, 2000; Tizard, 2000**).

6.2.3. Linfocitos

Existen dos grandes tipos de linfocitos:

- Los **linfocitos B** son los responsables de la respuesta inmune humoral, se originan en la médula ósea, aunque maduran en las placas de Peyer o en la médula ósea antes de migrar a los órganos linfoides secundarios. Se los localiza en la corteza de nódulos linfoides, en los folículos de las placas de Peyer, tejido linfoide asociado al intestino, TLAB, bazo y en la zona marginal de la pulpa blanca esplénica. Sólo una pequeña fracción de los linfocitos sanguíneos son B.
- Los **linfocitos T** provienen de la médula ósea a partir de sus precursores hematopoyéticos, maduran en el timo, luego lo abandonan, se acumulan en el paracortex de los nódulos linfoides, en la vaina linfoide periarteriolar del bazo, áreas interfoliculares de las placas de Peyer y áreas parafoliculares del tejido linfoide asociado al intestino y TLAB. Son los linfocitos predominantes (80% en sangre periférica) y son los responsables de la colaboración para la producción de anticuerpos y de los mecanismos de inmunidad celular.

Además existe una población de linfocitos que no son T ni B de gran importancia en la respuesta inmune natural o innata, son los conocidos como células NK (del inglés “natural killer”, asesino natural). Probablemente comparten el origen celular con los

linfocitos T pero no sufren el procesamiento tímico, se los encuentra en todos los tejidos y son escasos en sangre (**Suter, 1990; Álvarez y cols., 1997; Tizard, 2000**).

6.2.3.1. Linfocitos B

Desde un punto de vista morfológico los linfocitos B son indistinguibles de los T, ambos son células de tamaño pequeño (7-9 μ) con un núcleo voluminoso, de cromatina condensada y escaso citoplasma. Sin embargo existen diferentes marcadores que permiten diferenciar los linfocitos T de los B, el más conocido y utilizado es la inmunoglobulina de membrana, que constituye el receptor específico de Ag del linfocito B. Estas Igs se pueden poner de manifiesto con sueros anti-Igs mediante IHQ sobre cortes de tejidos. Además estos linfocitos también expresan receptores especializados en su membrana (C3b y C3d) y los receptores para el fragmento Fc de las Igs (estos últimos también presentes en monocitos, células NK y linfocitos T activados). También presentan receptores para factores de crecimiento, IL-4, y cuando están activados expresan receptores para IL-2 (**Suter, 1990; Álvarez y cols., 1997; Sánchez-Vizcaíno, 2000**).

Existen varios estadios de maduración de los linfocitos B, no dependientes de la presencia de Ags y que se regulan por factores presentes en el microambiente de los órganos linfoides primarios, donde los centros germinales de los folículos linfoides son un sitio crucial donde se desarrollan muchos eventos del desarrollo y diferenciación de los linfocitos B. Las células dendríticas intervienen estimulando indirectamente el crecimiento de linfocitos T cooperadores, aunque también pueden hacerlo directamente y pueden producir el cambio en el tipo de Igs producido. Los linfocitos B maduros tras el contacto

con el Ag específico entran en la fase final de su diferenciación que conduce a la secreción de Igs, este paso de linfocito B a célula secretora (célula plasmática) se acompaña de la pérdida de las Igs de superficie y de grandes cambios morfológicos. Las células plasmáticas presentan una forma redondeada con núcleo esférico, en posición excéntrica y con condensaciones de cromatina que recuerdan una rueda de carro. Poseen un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollados, en concordancia con su extraordinaria capacidad de síntesis y secreción de proteínas. Las células plasmáticas desarrollan una vida media muy corta, de 2-3 días, y se localizan fundamentalmente en la pulpa roja del bazo, cordones medulares de nódulos linfoides, sinusoides de médula ósea; y en la lámina propia del intestino y tracto respiratorio (**Álvarez y cols., 1997; Sánchez-Vizcaíno, 2000; Tizard, 2000**).

Después del estímulo antigénico no todos los linfocitos se diferencian en células plasmáticas. Algunos revierten a linfocitos pequeños de vida larga, son los denominados linfocitos B de memoria. Estos linfocitos, en respuesta a una segunda exposición al Ag, se diferencian rápidamente en células plasmáticas, sintetizando anticuerpos de mayor afinidad y de isotipos distintos de la IgM, característicos de una respuesta secundaria. Aunque es preciso recordar que los linfocitos B no son sólo productores de Igs, también son eficaces células presentadoras de Ag (**Álvarez y cols., 1997**).

6.2.3.2. Linfocitos T

Los linfocitos T presentan una superficie plana cuando los observamos mediante microscopía electrónica de barrido, mientras que los linfocitos B presentan una superficie

con múltiples proyecciones, que corresponden a las Igs de superficie. Estos linfocitos, a diferencia de los B, que reconocen el Ag en su conformación nativa a través de las Igs de superficie, reconocen el Ag una vez procesado y asociado a los Ags propios del MHC. Pueden dividirse en **cooperadores (Th)**, **citotóxicos (Tc)** y **supresores (Ts)**, de acuerdo con su función y la expresión de ciertas moléculas de superficie celular (Ags de diferenciación) (**Marrack y Kappler, 1986; Suter, 1990; Álvarez y cols., 1997; Sánchez-Vizcaíno, 2000**).

Los Th producen diferentes citocinas, esto determina que sean divididos en dos grupos principales, los **Th1** y **Th2**. Los Th1 producen principalmente **IL-2** e **Interferón (IFN)- γ** , la IL-2 activa principalmente a los linfocitos B, células NK y macrófagos; y el IFN- γ , inhibe la actividad de los Th2, estimula a los Th1, activa las células NK y macrófagos. Los Th2 producen principalmente **IL-4, IL-5, IL-9, IL-10** e **IL-13**. La IL-4 estimula el crecimiento y diferenciación de linfocitos B; la IL-5, estimula el crecimiento de los linfocitos B y eosinófilos; la IL-9 es un factor de crecimiento de linfocitos T; la IL-10 inhibe a los Th1 y suprime la funcionalidad de los macrófagos; y la IL-13, estimula el crecimiento de los linfocitos B e inhibe a los macrófagos. Pero además de las poblaciones anteriormente descritas existe otro Th, el **Th0** el cual secreta una mezcla de citocinas que es representativa de ambos, Th1 y Th2. Estas células pueden ser precursores de ambos o células que se encuentran en transición entre ambas poblaciones. Secretan IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ ; algunos linfocitos que secretan IL-2 pueden comenzar a secretar IL-4 después de la exposición al Ag, lo que implica que existe un cambio en el fenotipo de Th1 a Th2. Las principales moléculas que controlan este cambio son la IL-4 e IL-12 (producida por

macrófagos activados, linfocitos B y células dendríticas), cuando se cultivan células en presencia de IL-4 se convierten en Th2 y cuando se cultivan en presencia de IL-12 se convierten en Th1. En etapas tempranas del proceso inflamatorio existe una población mixta de Th0, Th1 y Th2; pero si el Ag persiste se produce una polarización de la población hacia Th1 o Th2 (**Domínguez y Alonso, 1991; Brown y cols., 1994; Murtaugh, 1994; Banchereau y Steinman, 1998; Rissoan y cols., 1999**).

Para comprender mejor este y otros apartados es conveniente ver el **Anexo**: Tabla resumen de las citocinas citadas en la revisión bibliográfica, sus células blanco y actividad.

6.2.3.3. Células NK

Las células NK presentan una actividad citotóxica frente a células infectadas por virus y células tumorales, aunque no las reconocen por un estímulo antigénico específico (las células NK no expresan TcR), ni está restringida por el MHC, como ocurre con los linfocitos T (CD8). Sus mecanismos de activación se inician al reconocer directamente células que no expresan adecuadamente el MHC, como ocurre en la mayoría de las células infectadas por virus. Por otra parte, liberan mediadores solubles (linfocinas), tales como TNF e IFN- γ , lo que permite la estimulación de diferentes mecanismos linfocitarios. Esta población celular se encuentra en mayor proporción en los animales jóvenes, lo que indica que el papel de las células NK parece estar más ligado a los mecanismos de respuesta natural o innata y no a los mediados por estimulación antigénica específica (inmunidad adquirida) (**Sánchez-Vizcaíno, 2000; Tizard, 2000**).

6.3. Receptores de superficie de los linfocitos

Los estudios del sistema inmune se han incrementado durante los últimos años, en particular las metodologías de purificación protéica y el uso de anticuerpos monoclonales desarrollados frente a moléculas de la superficie de los leucocitos, ha generado información de las poblaciones leucocitarias y sus interacciones. Estos anticuerpos monoclonales específicos han cambiado la forma de estudiar el sistema inmune, como resultado estas células pueden ser clasificadas, aisladas y estudiadas por sus propiedades funcionales (**Lunney, 1993; Saalmüller, 1996**).

Los receptores son proteínas, se localizan en la superficie celular, lo cual les permite desempeñar una función fisiológica. Los linfocitos necesitan receptores para las células presentadoras de Ag así como para numerosos factores que regulan la respuesta linfocitaria. Los receptores más importantes en los linfocitos B y T son los receptores de Ag, denominados **BcR** (del Inglés “**B cell Receptor**”, receptor de células B) y **TcR** (del Inglés “**T cell Receptor**”, receptor de células T), respectivamente (**Tizard, 2000**).

La tecnología de los anticuerpos monoclonales ha permitido caracterizar muchas moléculas de superficie que se expresan de forma restringida en diferentes poblaciones linfocitarias. Estas moléculas denominadas Ags de diferenciación se identifican por las siglas **CD**, del inglés “**Cluster of Differentiation**”, seguida de un número (**Suter, 1990; Álvarez y cols., 1997; Sánchez-Vizcaino, 2000**).

En los **linfocitos B**, los BcR consisten en moléculas de anticuerpo que se unen a la membrana celular de manera que puedan ser capaces de fijar el Ag a la superficie del linfocito. Los **linfocitos T** no portan anticuerpos de superficie, esto aporta una

herramienta para la distinción entre linfocitos B y T. Existen dos tipos de receptores para el Ag denominados **TcRa-b** y **TcRg-d**, la mayoría de los linfocitos periféricos expresan receptores TcR α - β , estos receptores reconocen el Ag sobre la superficie de otras células, siempre dentro del contexto de moléculas del MHC (**Arnaiz y cols., 1998; Sánchez-Vizcaíno, 2000**).

Los linfocitos con TcR γ - δ han sido identificados en un principio sólo en los rumiantes en alta proporción de los linfocitos T circulantes CD4⁻ CD8⁻ (**Clavers y cols., 1990**), aunque luego se han descrito en los cerdos, hay diferentes formas de TcR γ - δ basadas en la isoforma de la cadena γ , siendo estos linfocitos una significativa subpoblación del grupo de linfocitos T circulantes (**Carr y cols., 1994; Saalmüller, 1998**). En un trabajo realizado por **Caro y cols.** (1998) observaron en cabras de diferentes edades que el porcentaje de linfocitos TcR γ - δ disminuían con la edad (desde 20,6%=1 semana de edad, hasta 3,8%=3 meses de edad) en concordancia con lo observado en rumiantes por **Wyatt y cols.** (1994). Algunos autores relacionaron tales disminuciones con la capacidad funcional de esta población de brindar una inmunidad celular temprana a los animales jóvenes que no poseen todavía un sistema inmunitario maduro de linfocitos TcR α - β (**Hein y Mackay, 1991**). Se localizan preferentemente en piel e intestino, aunque han sido localizados en el bazo, nódulos linfáticos, TLAB, etc. de bovinos, cabras y cerdos, aunque en comparación con otras especies en el cerdo se sabe mucho menos (**Bonneville y cols., 1988; Itohara y cols., 1990; Carr y cols., 1994; Binns, 1994; Thome y cols., 1994; Mathy y cols., 1997; Caro y cols., 1998**).

CD2: es un péptido, todos los timocitos expresan el Ag, son las moléculas de adhesión primaria que contribuyen a potenciar la afinidad de unión del linfocito T a las células presentadoras de antígeno (Ag). Además es utilizado para diferenciar linfocitos T de B dado que en cerdos produce la adhesión de hematíes de oveja formando rosetas (**Saalmüller y Bryant, 1994; Arnaiz y cols., 1998; Sánchez-Vizcaíno, 2000**).

CD3: la mayoría de los linfocitos T periféricos lo expresan, es el término colectivo que se da a un complejo de siete cadenas peptídicas que forman una parte integral del complejo TcR y está presente en todos los linfocitos maduros y cuya función es transmitir la señal de activación a través de la membrana a causa del reconocimiento antigénico. Además, los linfocitos T portan otros receptores asociados al complejo CD3 que permiten diferenciarlos entre dos poblaciones principales: CD4 y CD8 (**Suter, 1990; Arnaiz y cols., 1998; Tizard, 2000**). Estudios realizados por **Ramos-Vara** (1992 y 1994) demostraron, mediante IHQ sobre tejidos fijados en formol, embebidos en parafina y tratados con pronasa, que un anticuerpo policlonal anti-CD3 de humano obtenido de conejo puede reconocer específicamente a poblaciones linfoides de tipo T de diferentes especies animales, entre ellas la caprina y porcina, tal como lo hace en el humano.

CD4: es una única cadena proteica de superficie celular que se encuentra asociada al TcR y el CD3, característica de los **Th**. En los linfocitos T, CD4 es la molécula que se une a las moléculas MHC II en la superficie de las células presentadoras de Ag (**Suter, 1990; Saalmüller y Bryant, 1994; Arnaiz y cols., 1998**). **Center y cols.** en 1996, observaron que la IL-16 es el ligando para el CD4, este hecho puede ayudar a un mayor conocimiento de la actividad de este receptor.

CD8: consiste de dos cadenas peptídicas de superficie celular unidas por puentes disulfuro que forman un solo receptor, que se encuentra asociado al TcR y al CD3, y se asocia con linfocitos T con función **supresora/citotóxica**. Se une a los Ags MHC clase I, esto hace posible que los linfocitos T se unan a casi todas las demás células nucleadas del organismo. También las células NK también expresan una escasa cantidad de CD8 (**Suter, 1990; Saalmüller y Bryant, 1994; Saalmüller y cols., 1994; Arnaiz y cols., 1998**).

La expresión de Ags CD4 ó CD8 guarda relación con el reconocimiento del Ag en asociación con los Ags MHC II ó I respectivamente y se pueden distinguir dos subpoblaciones de linfocitos T con funciones reguladoras o efectoras distintas. En general, los linfocitos CD4⁺ cooperan (Th) con el resto de las células del sistema inmune (linfocitos T, B y macrófagos) para facilitar su respuesta y son los responsables de las reacciones de hipersensibilidad retardada, mientras que los linfocitos CD8⁺ se encargan de la actividad citotóxica (Tc) y supresora (Ts), de manera que cuando desarrollan su actividad Tc al interactuar con el MHC I son capaces de actuar contra cualquier célula del organismo (**Mínguez y cols., 1988; Suter, 1990; Álvarez y cols., 1997**).

Especialmente en los porcinos existe un alto porcentaje de la población de linfocitos de sangre periférica que son CD4⁺ CD8⁺ (10-60%), aunque en las placas de Peyer se los ha localizado en mucha menor proporción (10% aproximadamente) al igual que en los linfonódulos peribronquiales. Se sabe relativamente poco de esta población de linfocitos, aunque se conoce que aumentan en proporción con la edad del animal, son linfocitos maduros ya que son notablemente diferentes morfológicamente de los linfocitos inmaduros, expresan el MHC II, por lo tanto son potencialmente células

presentadoras de Ags, hay muchas evidencias que indican que pueden representar una población de linfocitos CD4 que han adquirido el CD8 luego de una exposición antigénica. Se consideran linfocitos de memoria debido a que responden más rápidamente que otros linfocitos al estímulo antigénico y migrarían por la circulación linfática hacia otros tejidos luego de la estimulación antigénica en las mucosas (**Pescovitz y cols., 1994; Thome y cols., 1994; Zuckermann y Gaskins, 1996; Zuckermann y Husmann, 1996; Zuckermann, 1999; Davis y Hamilton, 1998**).

Las células NK porcinas reaccionan con los anticuerpos monoclonales frente a linfocitos T porcinos de los grupos CD2 y CD8, pero no con los CD3, **CD5** y CD6 (**Sánchez-Vizcaíno, 2000**). CD5 nos ayuda a discriminar las células NK de los Tc CD8⁺ porque estos últimos son CD5⁺ (**Saalmüller y Bryant, 1994**).

6.4. Consecuencias biológicas

Se necesita la **interacción de tres células** para que ocurra una respuesta inmunitaria efectiva: una **célula presentadora de Ags**, un **linfocito T efector** (la célula que en realidad regula la respuesta) y un **Th CD4⁺**. Las células efectoras pueden ser **linfocitos B** si se dispara la formación de anticuerpos o **Tc CD8⁺** si se dispara la inmunidad mediada por células. Aunque en el caso especial de los linfocitos B pueden reconocer el Ag, incluso en su forma nativa a través de sus Igs de superficie. Posteriormente el Ag es internalizado, fragmentado, asociado al MHC II y expresado en la membrana del propio linfocito B, si se encuentra el estímulo adecuado de un Th CD4⁺, se podrá iniciar la producción de Igs (**Sánchez-Vizcaíno, 2000; Tizard, 2000**).

La célula presentadora de Ags fija fragmentos de Ag junto al MHC II y los conducen hasta la superficie celular, una vez en ella, presenta el Ag al Th, pero la presentación de un Ag unido al MHC II es insuficiente para disparar una respuesta inmunitaria, el linfocito T debe ser expuesto a proteínas “coestimuladoras” secretadas por la célula presentadora de Ags y la más importante se denomina **IL-1**. La IL-1 se une a su receptor sobre un Th e induce la secreción de varias proteínas diferentes, estas incluyen la **IL-2** que se une a los receptores en las células efectoras, induciéndolas a proliferar y pasar de la forma G₁ a la fase S del ciclo celular. Al mismo tiempo, las células efectoras pierden sus receptores de Ag. Una vez que un número crítico de receptores de IL-2 contienen IL-2, sobrevienen la síntesis de ADN y la mitosis. La activación de TcR por el Ag activa aproximadamente al 50% de las células en un periodo que va de 30 a 120 minutos. Si el estímulo antigénico persiste, la presencia continua de IL-2 será suficiente para estimular una división repetida de las células T efectoras. Por lo tanto, la activación de células T es un proceso de dos etapas. El Ag lleva a la célula efectora del estado de reposo al G₁. La IL-2 lleva de G₁ a S y la mantiene en un estado estimulado. La IL-2 estimula la proliferación de la célula que la produce (efecto autocrino), así como la de las células cercanas (efecto paracrino). En ausencia de una cantidad suficiente de Ag, ocurre la reexpresión de CD3/TcR y el número de receptores de IL-2 disminuye. Todo el proceso trae aparejado como **consecuencia** que los **linfocitos T efectores** que responden a los Th, a medida que se van dividiendo, **se diferencian** en poblaciones de **linfocitos T efectores y memoria (Tizard, 2000)**. Los linfocitos T CD8⁺ memoria se encuentran programados para responder rápidamente sin tener que realizar una expansión clonal y

diferenciación, y reaccionan secretando principalmente IFN- γ e IL-2 en el caso de una estimulación antigénica **(Cho y cols., 1999)**.

Un Tc CD8⁺ activado puede migrar de los órganos linfoides para unirse a la célula blanco que presente un Ag unido al MHC I y provocar su apoptosis mediante la acción de proteínas denominadas **perforinas**, que al polimerizarse pueden insertarse en las membranas de las células blanco y producir la lisis celular **(Carter y Dutton, 1995)** y **granulisinas** que reducen la viabilidad de bacterias, hongos y parásitos “*in vitro*” mediante una alteración de la integridad de la membrana **(Stenger y cols., 1998)**. Aunque además se han propuesto un gran número de factores que colaboran en los mecanismos por los que los monocitos son capaces de matar microorganismos, entre los que se incluye la generación de óxido nítrico y la producción de radicales libres de oxígeno entre otros factores que no se analizarán en esta revisión **(Tizard, 2000)**.

No obstante existen otros mecanismos de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, donde células con receptores para Fc de Igs (monocitos, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos B y células NK) se unen a células tapizadas por las Igs favoreciendo la fagocitosis y/o la degranulación enzimática. Finalmente, la respuesta inmune mediante anticuerpos se desencadena, como se detalló en apartados anteriores, mediante la colaboración entre los linfocitos B y los CD4⁺ se produce al contactar ambas células gracias al MHC y al Ag, así como a la liberación de linfocinas, sobre todo la IL-4; de esta forma la producción de anticuerpos se inicia con la IgM y después, si persiste el estímulo antigénico, cambiará la región constante de las cadenas mu (IgM) por las gamma (IgG)

psilon (IgE) o alfa (IgA), pero conservará sus regiones variables (las que se unen al Ag) originales (**Babin, 1991; Sánchez-Vizcaino, 2000**).

La Figura (Fig.) 1 puede ayudar a comprender mejor como se desencadenan los distintos procesos de las respuestas inmunes y sus consecuencias:

6.5. Redes de regulación de la respuesta inmunitaria

La respuesta inmune celular y humoral, a la vez que son esenciales para la protección del organismo, pueden causar daños serios si actúan de manera incontrolada. Desde hace muchos años se sabe que las actividades mentales, en especial el estrés, influyen de manera importante en la resistencia a algunas enfermedades infecciosas. Durante el estrés se liberan neuropéptidos, como encefalinas y endorfinas que pueden unirse a receptores de los linfocitos e influir en su actividad. Otros neuropéptidos que pueden modificar al sistema inmunitario son la hormona adrenocorticotropa, oxitocina, péptido intestinal vasoactivo, somatostatina, prolactina, sustancia P y noradrenalina (**Tizard, 2000**).

La regulación celular de la respuesta puede estar determinada por **Ts** CD8⁺ y probablemente también por **funciones antagonistas** de las dos poblaciones de Th (**Th1 y Th2**). Sin embargo, los linfocitos T CD8⁺ también pueden secretar mezclas de citocinas típicas de las células Th1 o Th2, de tal forma que una célula CD8⁺ secretora de IL-10 podría ser una célula supresora eficaz. Cada población de células supresoras también puede actuar en diferentes puntos de la respuesta inmunitaria; la complejidad del sistema aumenta por una serie de vías de retroalimentación negativa y positiva que aseguran que el sistema funcione a su nivel apropiado (**Tizard, 2000**).

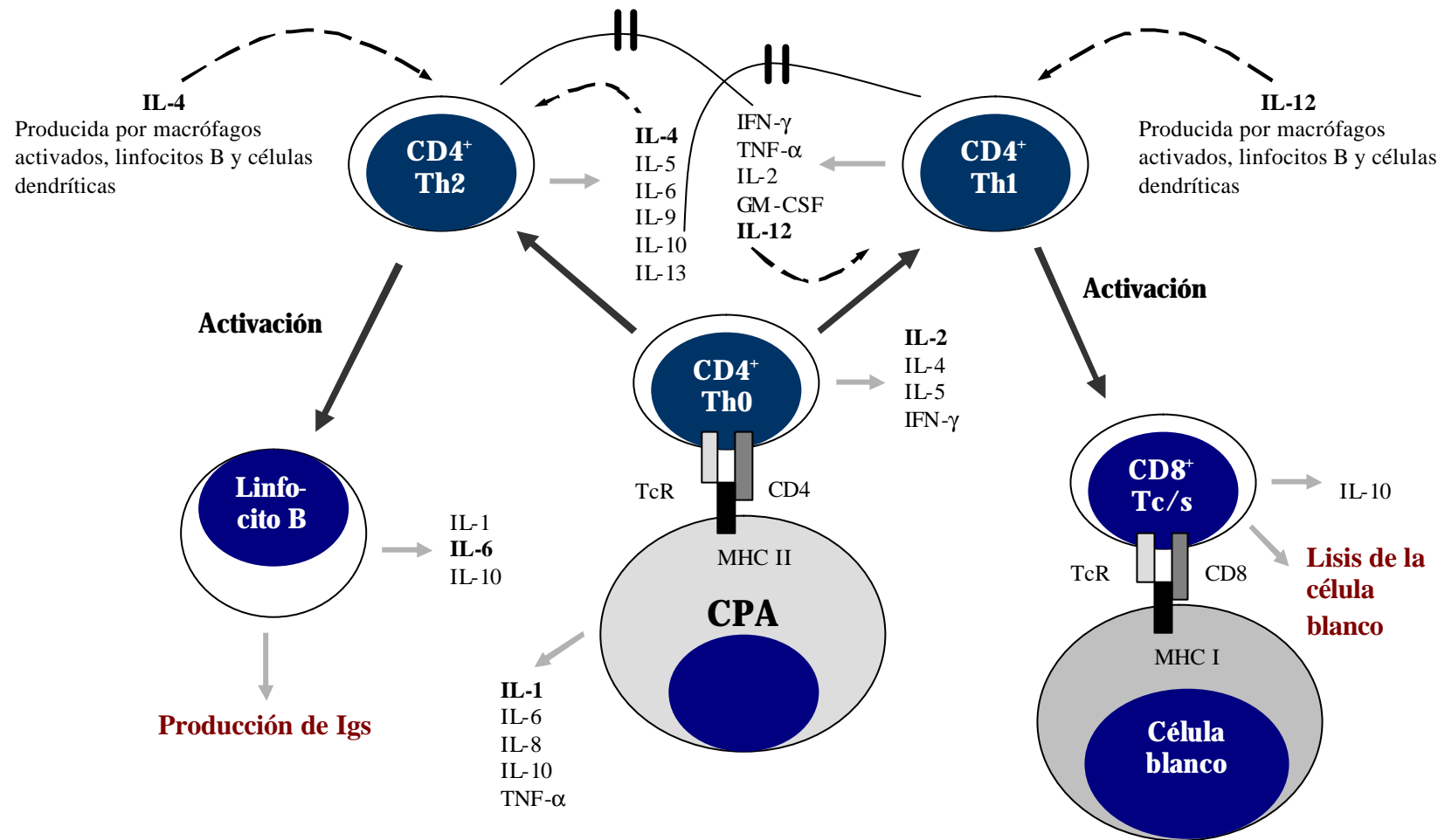


Fig. 1: Esquema de las principales citocinas y células que intervienen en la respuesta inmune humoral y celular.

CPA: Célula Presentadora de Antígenos. Las flechas negras indican la diferenciación o activación de las células. Las flechas discontinuas indican efectos positivos y las que poseen || indican efecto inhibitorio. Las flechas grises indican que las citocinas son producidas por dicha célula.

(Brown y cols., 1994; Banchereau y Steinman, 1998; Osterrieder y Wolf, 1998; Rissoan y cols., 1999; Tizard, 2000).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de las muestras

Las muestras de pulmones necesarias para la realización de este trabajo se obtuvieron de pulmones procedentes de:

1.1. Cabritos infectados experimentalmente

Para el experimento se utilizaron 12 cabritos de 3 meses de edad (Fig. 2), que se retiraron de su madre inmediatamente después del nacimiento de una granja de producción caprina de Gran Canaria en la que nunca se habían diagnosticado cuadros clínicos asociados a micoplasmas. Se



los alojó en el Area de Animales para Inoculación de la Facultad de Veterinaria-ULPGC, separados en tres habitaciones (inoculados con *M. agalactiae*, *M. bovis* y controles). Se realizó una inspección clínica de los animales y se obtuvo en tres ocasiones muestras de moco nasal, hisopos de nasofaringe y muestras de sangre de todos los cabritos para estudios microbiológicos y serológicos rutinarios (Real y cols., 1994; Ball y cols., 1997; Rodríguez y cols., 1996a).

Rodríguez y cols., 1996a).

Se vacunó a los cabritos (Fig. 3) en dos ocasiones a los 21 y 7 días antes de la inoculación de acuerdo con el protocolo detallado en la Tabla 3, utilizando *M. agalactiae* (aislado 123/97)



completo inactivado, *M. bovis* (aislado MC1750) completo inactivado (ambas preparadas en la Unidad de Epidemiología, Medicina Preventiva y Policía Sanitaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria). Los cultivos utilizados para la elaboración de las vacunas se encontraban en fase logarítmica, se cultivaron a 37°C en medio pH (**Kirchhoff y Rosengarten, 1984**), se centrifugaron y lavaron 3 veces en Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) y se inactivaron con formol al 0,4%. Asimismo, utilizamos un preparado protéico (5D8-6C7) producido en el Laboratorio de la VSD (Veterinary Science Division, DANI, Belfast, UK.) consistente en una mezcla de dos proteínas de membrana comunes a ambas especies de micoplasmas y purificadas mediante columnas de afinidad empleando anticuerpos monoclonales.

Los cabritos se inocularon simultáneamente por vía intranasal e intratraqueal con un cultivo fresco de *M. agalactiae* cepa 123/97 procedente de Gran Canaria (n= 5) o *M. bovis* cepa MC1750 procedente de Irlanda del Norte (n=5) (Tabla 3), dichas cepas se cultivaron en medio pH y se almacenaron a -70°C. Para su uso se diluyeron 10⁻¹ en medio pH para obtener 10 mililitros (ml.) de solución total, se incubaron durante 24 horas en estufa a 37° C en atmósfera enriquecida con un 5% de CO₂ para su posterior inoculación.

Se realizaron 2 inoculaciones consecutivas con un total de 3 x 10⁹ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) cada una. Se utilizaron dos cabritos control (n°11 y n°12), a los que se les inoculó en dos ocasiones simultáneamente por vía intranasal e intratraqueal con 10 ml. del mismo medio de cultivo estéril utilizado para el crecimiento de micoplasmas.

Los animales se sacrificaron mediante sedación profunda con tiobarbital vía endovenosa y desangrado a los 14 y 21 días postinfección según el protocolo de la Tabla 3.

Tabla 3: Protocolo de Inoculación

Número de Animal	Vacunación	Inóculo	Sacrificio (dpi)
1,2	<i>M. agalactiae</i> inactivado	<i>M. agalactiae</i>	14
3,4	5D8-6C7	<i>M. agalactiae</i>	21
5	PBS	<i>M. agalactiae</i>	21
6,7	<i>M. bovis</i> inactivado	<i>M. bovis</i>	14
8,9	5D8-6C7	<i>M. bovis</i>	21
10	PBS	<i>M. bovis</i>	21
11	PBS	MCE	14
12	PBS	MCE	21

dpi: días postinfección. **MCE:** Medio de cultivo estéril.

Se realizó la necropsia completa de todos los cabritos y se tomaron muestras de tráquea y pulmón para el examen histopatológico, ultraestructural, IHQ (parafina y congelación), microbiológico y serología.

Las muestras para microbiología se tomaron de tráquea y pulmón en el momento de la necropsia en placa de petri estéril. Además, se recogió sangre para serología mediante ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra *M. agalactiae* y *M. bovis*; y microbiología mediante cultivo en medio de micoplasma.

1.2. Cerdos de matadero con lesiones características de NEP

Se tomaron muestras de pulmón para el examen histopatológico, IHQ, microbiológico y ultraestructural de 56 pulmones de cerdos enviados al Matadero Insular de Las Palmas. Se escogió la región craneoventral de pulmones que presentaron lesiones compatibles macroscópicamente con NEP (Fig. 4). En el estudio



estructural se descartaron los animales que presentaron indicios de bronconeumonía exudativa o neumonía lobar, especialmente con necrosis o formación de abscesos, que indicaban la presencia de infecciones bacterianas concomitantes.

Las muestras se seleccionaron nuevamente quedando 25 animales sobre la base de:

- presencia de lesiones indicativas de NEP y no presencia de indicios de contaminación bacteriana secundaria,
- ausencia de reacción positiva a la técnica de impregnación argéntica de Warthin-Starry **(W-S) (Luna, 1968)**, utilizada para la demostración de CAR (Cilia-Associated Respiratory) bacillus,
- detección mediante IHQ de *M. hyopneumoniae* con reacción granular, no filamentosa, presente en el ápex de los cilios o en el espacio interciliar de bronquios y bronquiolos,
- aislamiento de *M. hyopneumoniae*,
- ausencia de aislamiento de bacterias patógenas en el aparato respiratorio porcino.

Como controles negativos se emplearon 4 muestras seleccionadas entre 16 de la región craneoventral del pulmón de cerdos enviados al Matadero Insular de Las Palmas que no presentaron:

- lesiones neumónicas (macroscópicamente y microscópicamente),
- reacción positiva a la técnica de impregnación argéntica de W-S (**Luna, 1968**),
- reacción IHQ positiva frente a *M. hyopneumoniae*,
- aislamiento de micoplasmas o bacterias patógenas en el aparato respiratorio del ganado porcino.

Para descartar la posible acción patógena del virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino y de Aujeszky se realizaron las técnicas de IHQ con los anticuerpos indicados en la Tabla 5.

2. Procesamiento laboratorial

2.1. Técnicas de histología de rutina

Se tomaron muestras de tejido de 1 cm. de espesor, se fijaron en formol tamponado al 10% durante 24-48 horas, se procesaron según el método habitual para MO en un procesador automático de tejidos (Leica TP-1050, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany), se incluyeron en parafina y se cortaron con un microtomo (Leica RM 2135, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) a 4 µm para tinción de rutina Hematoxilina y Eosina.

2.2. Estudio ultraestructural

El estudio ultraestructural se llevó a cabo en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba.

Para Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), la fijación de los pulmones se realizó en glutaraldehído al 2,5% en solución tampón fosfato según el proceder de **Sabatini y cols.** (1963), luego se siguió el siguiente protocolo (con refijación en tetraóxido de osmio y posterior inclusión en epoxi-resinas – Epon 812 y Durcupam® ACM, Fluka, Steinheim, Switzerland):

1^{er} día: Frigorífico (lunes):

- Troceo de las muestras,
- Solución lavadora de agua bidestilada, 3 pases de 15 minutos,
- Refijación con tetraóxido de osmio al 2% en tampón fosfato, durante 2 horas,
- Solución lavadora de agua bidestilada, 3 pases de 10 minutos,
- Deshidrataron en una escala ascendente de acetonas,

2^{do} día: Temperatura ambiente agitando (martes):

- Acetona 90 (2 lavados rápidos) y luego 40 minutos,
- Acetona 100 durante 30 minutos y acetona 100 con sulfato de cobre durante 30 minutos,
- Óxido de propileno, dos pases de 15 minutos,

- Óxido de propileno 3:1 parte mezcla A, 2:2 parte mezcla A y 1:3 parte mezcla A durante 45 minutos cada uno,
- En estufa a 50° mezcla A durante 1 hora, cambio la mezcla A y dejar durante 1 hora más,
- En estufa a 60° mezcla A durante toda la noche,

3^{er} día: Estufa a 60° (miércoles):

- En estufa a 60° en mezcla B durante 48 horas como mínimo,

4^{to} día: Sacar de la cápsula (lunes):

5^{to} día: Esperar 24 horas para su tallado:

mezcla “A”

mezcla A/M* 10 c.c.

mezcla B* 10 c.c.

mezcla D* 2 gotas

mezcla “B”

mezcla A/M 10 c.c.

mezcla B 10 c.c.

mezcla D 2 gotas

mezcla C* 6 gotas

(*A/M, B, C y D son productos comerciales de la casa Durcupan® ACM, Fluka, Steinhein, Switzerland)

De los bloques obtenidos se realizaron cortes de 0,5 a 1 micrómetro de grosor (semifinos), que se tiñeron con la técnica de Azul de Toluidina, utilizándose para el estudio estructural y como control para la selección de áreas que incluirían en el estudio de microscopía electrónica. De los bloques se realizaron, posteriormente, cortes de 50

nanómetros de grosor (cortes finos), que se contrastaron con acetato de uracilo y citrato de plomo.

Para la realización de los cortes finos se utilizó un ultramicrotomo LKB, Bromma modelo Ultratome Nova, empleando cuchillas de vidrio y diamante. Para el estudio ultraestructural, los cortes se observaron y fotografiaron con un MET Philips CM 10 (Fig. 5).



2.3. Técnica histoquímica

Para la demostración de CAR-bacillus se utilizó la técnica de W-S (**Luna, 1968**) sobre cortes histológicos de tráquea y bronquios fijados en formol. Dicha técnica se describe a continuación:

1. Se realizan soluciones de Nitrato de Plata al 1%, Gelatina al 5%, e Hidroquinona al 0,15%, utilizando como solvente agua acidificada, previamente elaborada añadiendo una solución de ácido cítrico al 1% a 1 litro de agua bidestilada hasta conseguir un pH de 4,0. Estas soluciones se mantienen inmersas en agua a 54°C.
2. Simultáneamente se coloca en estufa a 43°C una solución de Nitrato de Plata al 0,5% en la que se incuban los cortes durante 30 minutos.
3. Cuando salga de la estufa se tendrá ya preparada una mezcla a 54°C de las siguientes cantidades de los reactivos del apartado 1: Nitrato de Plata (1%), 1,5 ml.; Gelatina (5%), 3,75 ml. e Hidroquinona (0,15%), 2,0 ml.

Se procede a colocar el tejido sobre la solución.

4. Controlar bajo microscopio la coloración obtenida, mediante un control positivo.
5. Lavar con agua bidestilada precalentada a 56°C.
6. Enjuagar en agua destilada.
7. Deshidratar, aclarar y montar.

La interpretación de la técnica se realizó teniendo en cuenta la presencia o no de bacterias, filamentosas, alineadas perpendicularmente sobre la superficie del epitelio traqueobronquial, situadas entre los cilios y que igualmente se pueden observar en el exudado luminal de las vías respiratorias.

2.4. Valoración microscópica de las lesiones

La clasificación de las lesiones pulmonares observadas al microscopio óptico se realizó según el criterio de evaluación semi-cuantitativo propuesto por **Livingston y cols.** (1972), basado en la intensidad de las lesiones exudativas a nivel broncopulmonar y en la hiperplasia del TLAB:

Lesiones (-): negativa.

Lesiones (+): Uno o más nódulos linfoides a nivel de la submucosa bronquial pero sin penetrar en la capa muscular de la mucosa.

Lesiones (++): Uno o más nódulos linfoides que se extienden a través de la muscular de la mucosa, y escaso infiltrado inflamatorio, tanto a nivel septal como en luces bronquiales y alveolares (PMN neutrófilos). La pared alveolar está, por lo general, poco engrosada.

Lesiones (+++): Hiperplasia linfoide perivascular y peribronquiolar con numerosas células septales y PMN neutrófilos en las luces alveolares. En las áreas afectadas, el bronquio contiene, generalmente, un acumulo masivo de PMN neutrófilos.

Lesiones (++++): Hiperplasia linfoide perivascular y peribronquiolar intensa, en amplias áreas del parénquima pulmonar. El infiltrado septal e intraluminal (macrófagos y PMN neutrófilos) es escaso, y se puede observar edema alveolar en las áreas afectadas.

2.5. Procesamiento de muestras congeladas para Inmunohistoquímica

Para la realización de técnicas de IHQ en muestras congeladas se tomaron muestras de 0,5x1x1 cm., se incluyeron en O.C.TTM (Optimal Cutting Temperature, Tissue-Tek®, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, The Netherlands), se las sumergió en un recipiente con 2-metilbutano (Merk, Darmstadt, Germany) el cual se encontraba sumergido en nitrógeno líquido para lograr una congelación rápida del tejido. Las muestras congeladas se almacenaron a -80° C hasta que fueron cortadas con criostato (Reichert-Jung, 2800 Frigocut N, Germany), a -24° C y 7 μ m de grosor, los cortes se secaron a temperatura ambiente durante 40-60 minutos y se fijaron en acetona a 4° C durante 5 minutos, posteriormente se secaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y colorearon rutinariamente con Hematoxilina y Eosina para la selección de los cortes incluidos en el estudio inmunohistoquímico. Otros cortes se almacenaron envueltos en papel de aluminio a -80° C para la posterior realización de las técnicas de IHQ.

2.6. Técnica Inmunohistoquímica

Para la realización de las técnicas IHQs se utilizó el método de Avidina–Biotina–Peroxidasa (ABC) (**Navarro y cols., 1996**), con algunas modificaciones tanto para muestras incluidas en parafina como para muestras congeladas.

Sobre estos cortes y sobre los correspondientes controles positivos se realizó la demostración de Ags de micoplasmas y de diferentes poblaciones celulares utilizando la técnica de IHQ, descrita a continuación con diferencias para cortes incluidos en parafina y en congelación:

- Muestras incluidas en parafina:
 - los tejidos se cortaron a 3 μm , se montaron en portas cubiertos de Poly-L–lysina (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, USA) para evitar el desprendimiento del tejido durante la realización de las técnicas y se incubaron durante 24 - 48 horas en estufa a 37° C;
 - desparafinado mediante tres pases en xilol de 10, 5 y 5 minutos respectivamente;
 - alcohol 100°, durante 5 minutos;
 - inhibición de la peroxidasa endógena, con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos en agitación suave;
 - inicio de la rehidratación mediante tres pases por alcohol 100°, 96° y 70°, respectivamente, de 5 minutos cada uno;
 - 2 lavados en agua destilada de 5 minutos cada uno;
 - lavado con PBS pH 7,2 durante 5 minutos en agitación;

- desenmascaramiento antigénico con Pronasa (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, USA) al 0.1 % en PBS durante 3-10 minutos;
- 3 lavados en PBS de 3 minutos cada uno en agitación.

Inicio de la técnica de IHQ ⇒

- Muestras congeladas:
 - descongelado de la muestra desenvolviéndola del papel aluminio en el que estaba almacenada y dejándola secar a temperatura ambiente frente a un ventilador durante 20-30 minutos;
 - segunda fijación con cloroformo durante 20-30 minutos a temperatura ambiente;
 - secado de las muestras a temperatura ambiente frente a un ventilador durante 20-30 minutos;
 - 3 lavados en PBS de 5 minutos cada uno en agitación;
 - inhibición de la peroxidasa endógena mediante el tratamiento con Fenil-hidrazina (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, USA) 0.2% diluida en PBS durante 40 minutos en agitación;
 - 3 lavados en P BS de 5 minutos cada uno en agitación.

Inicio de la técnica de IHQ ⇒

▷ **Técnica de IHQ:**

- incubación en cámara húmeda con suero normal de la especie en que fue creado el suero secundario diluido al 10% en PBS durante 30 minutos;
- incubación con el correspondiente antisuero primario en cámara húmeda, 2 horas en estufa a 37°C o 18 horas a 4°C. Los sueros empleados, la dilución y los fijadores en que fueron empleados se muestran en Tabla 4 y 5. Los sueros primarios se diluyeron en todos los casos en PBS conteniendo un 1% de suero normal de la especie en que fue creado el suero secundario;

Tabla 4: Relación de anticuerpos primarios usados en las técnicas IHQs sobre pulmones caprinos.

Anticuerpo	Especificidad	Fuente	Dilución	Fijador
5A10 ₁	<i>M. bovis/agalactiae</i>	VSD	1:1000	Formol
295 ₂	<i>M. bovis/agalactiae</i>	VSD	1:1000	Formol
Anti-lisozima ₂	Lisozima	DAKO	1:500	Formol
Anti-S-100 ₂	S-100	DAKO	1:500	Formol
MAC 387 ₁	Ag Mieloide/Histiocítico	DAKO	1:100	Formol
Anti-CD3 ₂	CD3	DAKO	1:500	Formol
GC5A10 ₁	CD4	VMRD	1:50	Congelación
CACT80C ₁	CD8	VMRD	1:100	Congelación
H42A ₁	MHC II	VMRD	1:10 000	Congelación
CACTB6A ₁	TcR γ/δ	VMRD	1:200	Congelación
Anti-IgG-Caprino ₂	IgG-Caprino	DAKO	1:100	Formol
SwAG/sIgA ₂	IgA-Caprino	Nordic	1:1000	Formol

1: Anticuerpo Monoclonal. 2: Anticuerpo Policlonal. **VSD:** Veterinary Science Division, DANI, Belfast, UK. **DAKO:** Dako, Glostrup, Denmark. **VMRD:** Veterinary Medical Research and Development, Pullman Inc., Pullman, USA.. **Nordic:** Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, The Netherlands.

Tabla 5: Relación de anticuerpos primarios usados en las técnicas IHQs sobre pulmones porcinos.

Anticuerpo	Especificidad	Fuente	Dilución	Fijador
Anti-Aujeszky ₂	Aujeszky	UCO	1:80	Formol
SDOW17 ₁	PRRS (cepas americana y europea)	DVS	1:1000	Formol
1AC7 ₁	PRRS (cepa europea)	Ingenasa	1:250	Formol
Anti- <i>M.hypopneumoniae</i> ₂	<i>M. hypopneumoniae</i>	DVL	1:1000	Formol
Anti-lisozima ₂	Lisozima	DAKO	1:500	Formol
Anti-S-100 ₂	S-100	DAKO	1:500	Formol
MAC 387 ₁	Ag Mieloide/Histiocítico	DAKO	1:200	Formol
MCA 1155 ₁	CD2	Serotec	1:250	Congelación
Anti-CD3 ₂	CD3	DAKO	1:100	Formol
74-12-4 ₁	CD4	VMRD	1:300	Congelación
MCA 1223 ₁	CD8	Serotec	1:100	Congelación
MCA 1335 ₁	MHC II	Serotec	1: 100	Congelación
Anti-IgG ₂	IgG–Porcino	Sigma	1:400	Formol
GASw/IgA(Fc) ₂	IgA–Porcino	Nordic	1:1000	Formol

1: Anticuerpo Monoclonal. 2: Anticuerpo Policlonal. **UCO:** Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba. **DVS:** Department of Veterinary Science, South Dakota State Univ. USA. **Ingenasa:** Ingenasa, Madrid, España. **DVL:** Danish Veterinary Laboratory, DK-1790 Copenhagen V, Denmark. **DAKO:** Dako, Glostrup, Denmark. **VMRD:** Veterinary Medical Research and Development, Pullman Inc., Pullman, USA. **Serotec:** Serotec Ltd., Oxoford, UK. **Sigma:** Sigma Chemical Company, St. Louis MO, USA. **Nordic:** Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, The Netherlands.

- lavado con PBS, 3 pases de 5 minutos en agitación;
- incubación con el anticuerpo secundario biotinado (anti la especie en que fue creado el anticuerpo primario), diluido 1:200 en PBS conteniendo un 1% de suero normal de la especie en que fue creado el suero secundario, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda;

- lavado con PBS, 3 pases de 5 minutos en agitación;
- incubación con el Complejo ABC (Vectastain® *Elite* ABC Kit, Vector Laboratories, Inc. Burlingame CA, USA) diluido 1:50 en PBS durante 1 hora, en cámara húmeda y en lugar oscuro;
- breve lavado en Tris Buffer Salino (**TBS**) pH 7,6 en agitación;
- revelado de la reacción inmunoenzimática utilizando 0,07 g de 3,3' Diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, USA) en 200 ml. de TBS, y peróxido de hidrógeno al 0,1%, durante 1-5 minutos;
- lavado en agua corriente durante 5 minutos;
- contratinción nuclear con hematoxilina de Harris durante 1 minuto, deshidratación y montaje con DPX (medio de montaje con Tolueno, Xileno, Di-n-Butilo Ftalato-Panreac, Química S.A., Barcelona).

Las células marcadas positivamente correspondientes al TLAB de cada muestra de pulmón se contaron a 400 aumentos en 20 diferentes campos seleccionados aleatoriamente. Para obtener el porcentaje de células marcadas positivamente, se calculó la media de dichos porcentajes y el correspondiente desvío estándar (**SD**). El análisis estadístico entre los animales estudiados (cabras inoculadas o cerdos naturalmente infectados y los controles de cada estudio) se realizó aplicando el Test no paramétrico para variables independientes W de Wilcoxon $P < 0.05$, utilizando el programa informático SPSS® 10.0 (SPSS Inc. Headquarters, S. Wacker Drive, Chicago, Illinois, USA).

2.7. Microbiología

Los exámenes microbiológicos se llevaron a cabo por parte de la Unidad de Epidemiología, Medicina Preventiva y Policía Sanitaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Para el aislamiento de los micoplasmas se flameó un trozo de lóbulo pulmonar que previamente se había introducido en alcohol de 96°. A continuación se realizó una incisión con un bisturí también flameado. De esta forma se pudo acceder al parénquima pulmonar con una torunda estéril, evitando así la contaminación debida a la manipulación. Las muestras de tráquea (en el caso de los caprinos) fueron obtenidas directamente de la luz de la tráquea mediante hisopos estériles.

Las muestras se inocularon en 2 ml. de los medios líquidos pH y SP4-II (**Ramírez y cols., 1998**). Los tubos, que se incubaron a 37°C durante 24 horas, se filtraron con un tamaño de poro de 0.45 µm. El filtrado se subcultivó en medio fresco durante 2-15 días. Posteriormente, las muestras se sembraron en medio sólido con 0,2 ml. de cada cultivo líquido. La incubación de las placas se llevó a cabo, en cámara húmeda, a 37°C durante al menos 15 días antes de considerarlas negativas (en el caso especial de las muestras de porcinos se mantuvieron hasta 30 días). Los aislamientos se conservaron mediante liofilización.

El primer paso consistió en verificar que se estaba trabajando con un aislamiento en cultivo puro. En el caso de mezcla de micoplasmas y otro tipo de bacterias se procedió a su separación aprovechando la habilidad de los micoplasmas de atravesar las membranas de los filtros con un tamaño de poro de 0,45 µm o menor. Para asegurarnos que no se

trataba de una forma L (bacterias que han perdido la capacidad de sintetizar momentáneamente la pared celular) se realizaron pruebas de reversibilidad, consistentes en pases sucesivos en medio sin inhibidores de crecimiento (antibióticos), de esta forma, en caso de presencia de bacterias, éstas volverían a sintetizar pared celular.

Se realizó el clonaje del cultivo fresco de micoplasmas, para lo cual se llevaron a cabo sucesivas diluciones y se sembraron en medio sólido con la finalidad de conseguir colonias individualizadas. Con la ayuda de pipetas Pasteur estériles se tomaron colonias del medio sólido y se cultivaron en medio líquido. Estas acciones se repitieron al menos 3 veces.

Para la identificación el primer paso en el proceso es el test de sensibilidad a la digitonina. Este método, desarrollado por **Freundt y cols.** en 1973, es un método indirecto para conocer los requerimientos de esteroides. Evalúa la inhibición del crecimiento en medio sólido producida por la digitonina, los mollicutes que requieren colesterol para vivir, incorporarán la digitonina en sus membranas desorganizándolas por lo que se podrá observar un halo de inhibición, mayor de 5 mm, alrededor los discos. Con esta prueba se pueden diferenciar dos tipos de mollicutes:

- Los que requieren colesterol: Géneros *M.*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Spiroplasma* y *Anaeroplasma*.
- Los que no requieren colesterol: Géneros *Mesoplasma*, *Acholeplasma* y *Asteroleplasma*.

En las pruebas bioquímicas se utilizó el método descrito por **Poveda** (1998), para identificar las cepas estudiadas.

Todos los medios de cultivo correspondientes a las muestras de los pulmones con lesiones compatibles con NEP fueron sometidos a la técnica de inmunoperoxidasa sobre papel de nitrocelulosa para confirmar la positividad del cultivo y la identificación de la especie de micoplasma. Esta técnica fue descrita por **Ter Laak y Noordergraaf** (1987), para la identificación de *M. dispar*. Como controles positivos se utilizó la cepa de referencia J de *M. hyopneumoniae* (ATCC cepa 25934), para lo cual una semana antes, se centrifugaron 2 mililitros que luego fueron reconstituidos en 500 mililitros de los cuales se sembraron 5 mililitros en papeles de nitrocelulosa estériles de 0.5x0.5 cm. de superficie, que previamente se habían dejado media hora sobre el medio de cultivo sólido SP4-II. A continuación en otros papeles de nitrocelulosa se sembraron por cuadruplicado por el mismo procedimiento con un cultivo líquido de los aislamientos problema. Como control negativo se utilizó papeles de nitrocelulosa a los que se les añadió medio de cultivo estéril para descartar posibles reacciones inespecíficas frente al medio de cultivo por parte del anticuerpo primario y el otro control negativo utilizado fueron papeles de nitrocelulosa sembrados con la cepa J de *M. hyopneumoniae* y cada uno de los aislamientos problema, que no se enfrentaron al suero primario para detectar posibles reacciones inespecíficas del suero secundario.

Los papeles de nitrocelulosa se incubaron en una cámara húmeda a 37°C durante una semana y luego:

- se traspararon a placas de cultivo de tejidos estériles de 24 pocillos de 16 milímetros (Corning Cell Wells™, Corning Glass Works, New York, USA);

- se les añadió 200 µl de suero normal de caballo (monoclonal) y cabra (policlonal), 30 minutos a temperatura ambiente, en agitación;
- breve lavado con 600 ml. de PBS;
- se añadieron 200 µl de suero primario anti-*M. hyopneumoniae* a la dilución de 1:500, en 2 de los 4 papeles sembrados con cada uno de los casos problema se utilizó un suero primario policlonal (Danish Veterinary Laboratory, DK-1790 Copenhagen V, Denmark) y en los otros 2 un monoclonal (Veterinary Science Division, DANI, Belfast, UK); los cuales fueron incubados durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación;
- lavado con 600 ml. de PBS, 3 lavados durante 3 minutos en agitación;
- incubación con el anticuerpo secundario biotinado, diluido 1:200 en suero normal de caballo al 1% en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda;
- lavado con 600 ml. de PBS, 3 lavados durante 3 minutos en agitación;
- incubación en oscuridad con el Complejo ABC (Vectastain® *Elite* ABC Kit, Vector Laboratories, Inc. Burlingame CA, USA) diluido 1/50 en TBS durante 1 hora, en cámara húmeda y en lugar oscuro;
- breve lavado con 600 ml. de TBS en agitación;
- revelado de la reacción inmunoenzimática utilizando 0,07 g de 3,3' DAB (Sigma Chemical Company, St. Louis MO, USA) en 200 ml. de TBS y peróxido de hidrógeno al 0,1% durante 1 minuto;

- 3 lavados con PBS durante 3 minutos, para detener a la solución reveladora.

Todas las muestras se valoraron mediante lupa (Olimpus B061 - SZ 40) a 40 aumentos, considerándose positivas una reacción granular de coloración marrón-ocre sobre el papel, indicativas de la presencia de microcolonias de *M. hyopneumoniae*.

RESULTADOS

1. Cabritos infectados experimentalmente

1.1. Clínica

Se realizaron 2 exámenes clínicos diarios desde el día de la inoculación hasta el sacrificio de los animales, evaluando la temperatura corporal, apetito, frecuencia cardíaca y respiratoria y presencia de secreciones nasales. Un día postinfección, dos cabritos (nº 2 y nº 5) mostraron un moderado incremento en la frecuencia respiratoria (50-60 movimientos respiratorios/minuto), tos e inapetencia, retornando a la normalidad 3 días postinfección. Todos los cabritos infectados mostraron una pirexia transitoria, si bien no se observaron signos respiratorios en los restantes 8 animales.

1.2. Patología

En la necropsia no se observó consolidación de los pulmones en ninguno de los cabritos control. Los animales inoculados presentaron áreas de distinto tamaño con aumento de coloración (Fig. 6 A) que al corte se encontraban en relación a bronquios (Fig. 6 B). En el examen microscópico, los animales utilizados como control no presentaron cambios significativos (Tabla 6 y Fig. 7). En los animales inoculados, el principal cambio consistió en una hiperplasia linfoide peribronquiolar y perivascular con una moderada a intensa acumulación de linfocitos y, en menor número, de células plasmáticas (Tabla 6 y Fig. 8). Esto causó la oclusión de la luz de algunos bronquiolos y la atelectasia de las regiones alveolares distales al bronquiolo ocluido (Fig. 9 A y B). Los septos alveolares aparecieron engrosados por la acumulación de macrófagos, linfocitos de tamaño variable y células plasmáticas (Fig. 9 C). El exudado presente dentro de los

alvéolos consistió predominantemente en macrófagos y un pequeño número de linfocitos, células plasmáticas y PMN neutrófilos. Los cambios fueron más prominentes en el pulmón de los animales sacrificados a los 21 días posteriores a la infección (Tabla 6).

Tabla 6: Resultados Histológicos e Inmunohistoquímicos (cabritos).

Porcentajes de células marcadas positivamente en el TLAB \pm DS* en cabritos 1-12, inoculadas con												
Anticuerpos	<i>Mycoplasma agalactiae</i>					<i>Mycoplasma bovis</i>					Medio de cultivo estéril (controles)	
	1† (++)	2† (++)	3† (+++)	4† (+++)	5† (++)	6† (+)	7† (++)	8† (+++)	9† (+++)	10† (+++)	11† (-)	12† (-)
5A10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pab295	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisozima	0.71 \pm 0.20	0.63 \pm 0.23	1.23 \pm 0.78	0.44 \pm 0.75	0.32 \pm 0.12	1.30 \pm 0.42	0.74 \pm 0.24	1.15 \pm 0.66	0.83 \pm 0.36	1.91 \pm 0.35	0.97 \pm 0.18	1.22 \pm 0.24
S-100	3.30 \pm 0.43	3.30 \pm 1.68	3.61 \pm 1.89	2.25 \pm 0.54	3.14 \pm 0.44	2.94 \pm 1.65	3.23 \pm 1.68	2.37 \pm 0.75	4.16 \pm 1.68	2.98 \pm 0.68	2.37 \pm 0.91	3.88 \pm 1.44
Ag. Miel./hist.	0.31 \pm 0.18	0.23 \pm 0.14	0.20 \pm 0.11	0.43 \pm 0.42	0.37 \pm 0.21	0.42 \pm 0.12	0.41 \pm 0.22	0.34 \pm 0.11	0.30 \pm 0.12	0.39 \pm 0.14	0.46 \pm 0.32	0.36 \pm 0.75
CD3	52.15 \pm 3.21	41.21 \pm 5.56	44.22 \pm 5.65	38.81 \pm 4.88	59.10 \pm 6.23	40.32 \pm 6.33	40.31 \pm 7.47	59.12 \pm 6.88	57.84 \pm 6.31	52.13 \pm 5.46	34.23 \pm 3.56	38.35 \pm 5.33
CD4	37.52 \pm 4.12	31.21 \pm 4.67	30.55 \pm 3.34	35.65 \pm 5.33	37.05 \pm 5.44	31.14 \pm 3.45	28.25 \pm 4.87	42.70 \pm 5.56	31.90 \pm 5.66	34.23 \pm 7.43	16.33 \pm 2.74	19.15 \pm 3.54
CD8	12.95 \pm 2.17	14.28 \pm 3.55	12.79 \pm 2.89	15.83 \pm 4.21	11.05 \pm 2.64	12.17 \pm 2.58	14.10 \pm 3.75	20.16 \pm 4.87	15.37 \pm 4.21	16.19 \pm 2.64	17.72 \pm 3.56	21.23 \pm 4.36
CD4/CD8	2.89	2.18	2.38	2.25	3.35	2.55	2.00	2.11	2.07	2.11	0.92	0.90
TcR γ/δ	0.34 \pm 0.11	0.18 \pm 0.10	1.26 \pm 0.65	0.76 \pm 0.32	0.97 \pm 0.22	1.16 \pm 0.34	0.58 \pm 0.21	0.35 \pm 0.14	0.89 \pm 0.21	0.78 \pm 0.31	0.84 \pm 0.21	0.91 \pm 0.24
MHC II	37.02 \pm 3.67	36.12 \pm 7.98	45.39 \pm 6.84	41.50 \pm 7.43	48.51 \pm 4.29	49.30 \pm 7.49	46.01 \pm 5.31	44.50 \pm 5.56	44.69 \pm 4.76	45.75 \pm 5.56	25.14 \pm 3.54	23.53 \pm 5.67
IgG	6.97 \pm 1.97	7.81 \pm 2.77	5.91 \pm 1.63	7.11 \pm 2.04	6.38 \pm 1.87	3.72 \pm 1.12	7.32 \pm 1.68	8.90 \pm 2.32	9.48 \pm 2.66	8.54 \pm 1.67	1.22 \pm 0.35	1.40 \pm 0.14
IgA	3.33 \pm 0.20	2.27 \pm 0.38	2.94 \pm 0.41	3.01 \pm 0.92	2.46 \pm 0.38	3.24 \pm 0.61	4.17 \pm 0.14	2.82 \pm 0.73	2.17 \pm 0.13	2.14 \pm 0.19	1.30 \pm 0.11	1.58 \pm 0.31

* DS: Desvío estándar.

† Sacrificados a los 14 días (\pm 21 días) postinoculación.

Hiperplasia Linfoide: (-), negativa; (+), leve; (++) moderada; (+++), severa.

Ag. Miel./hist.: Antígeno Mieloide/histiocítico.

El Test W de Wilcoxon revela una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las células CD3⁺, CD4⁺, relación CD4⁺/CD8⁺, MHCII⁺ IgG⁺ e IgA⁺ de los cabritos control e infectadas; la diferencia fue no significativa con los otros anticuerpos.

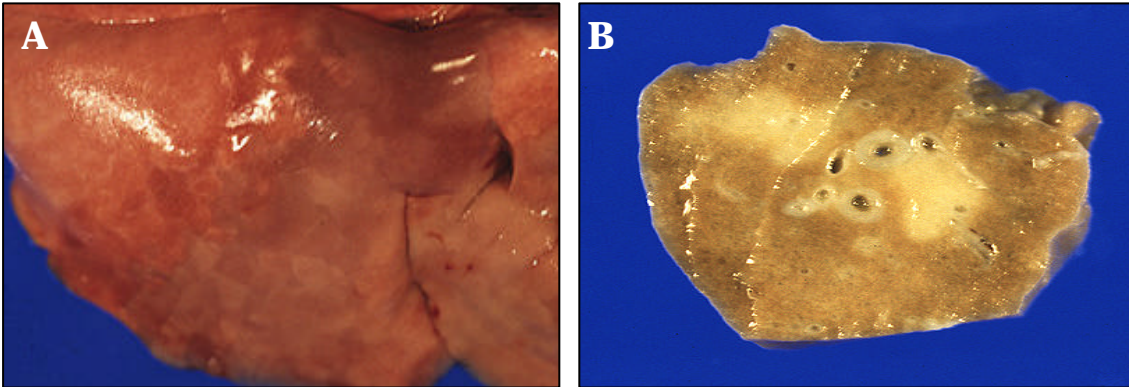


Fig. 6 Aumento en la coloración en el lóbulo diafragmático, animal nº9, inoculado con *M. bovis* (A). Focos indicativos de consolidación o linfoproliferación en relación a bronquios, animal nº3, inoculado con *M. agalactiae*, tejido fijado en formol tamponado durante 24 horas (B).

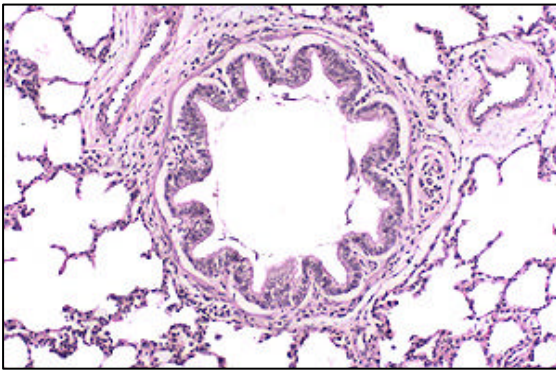


Fig. 7 Pulmón histológicamente normal del cabrito control nº12. H&E 10x.

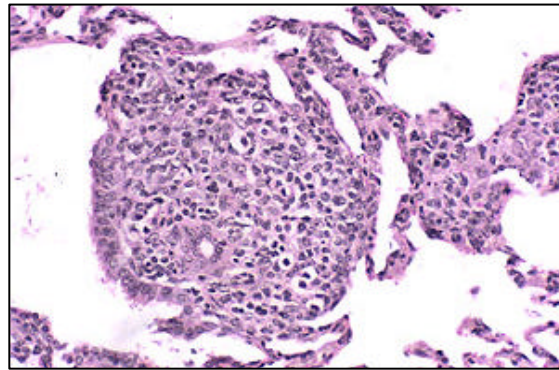


Fig. 8 Leve proliferación linfoide en relación a un bronquiolo de un cabrito inoculado con *M. agalactiae* nº2. H&E 20x

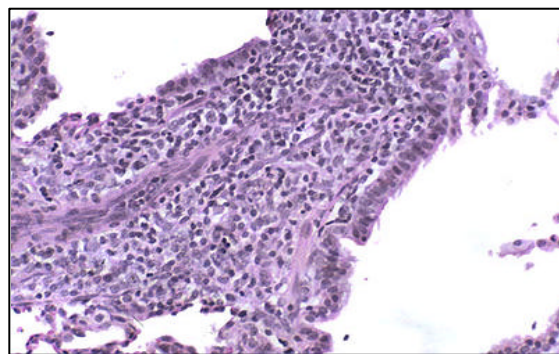
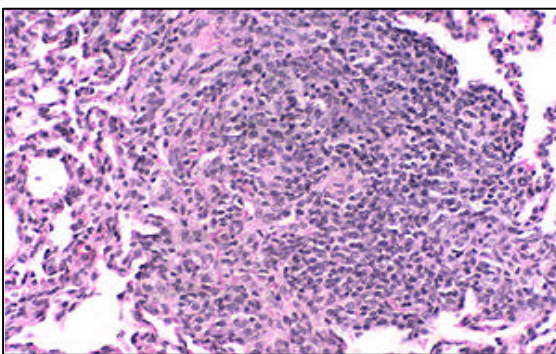
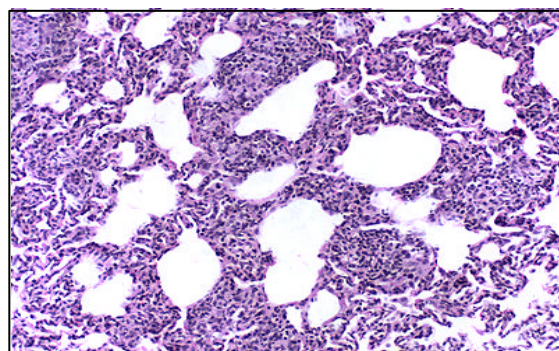


Fig. 9 Moderada proliferación linfoide en relación a un bronquiolo, cabrito nº9 inoculado con *M. bovis*. H&E 10x (A) y H&E 20x (B), que se extiende a los septos interalveolares cercanos a las vías aéreas, cabrito nº9. H&E 10x. (C)



1.3. Inmunohistoquímica

Los resultados del estudio inmunohistoquímico en el TLAB se encuentran resumidos en la Tabla 6.

Expresión de Ags de M. agalactiae y M. bovis: Los Ags de micoplasma no se detectaron usando los anticuerpos policlonal 295 y monoclonal 5A10 en ningún tejido pulmonar infectado experimentalmente (Tabla 6), aunque se detectó en el punto de inoculación (Fig. 10).

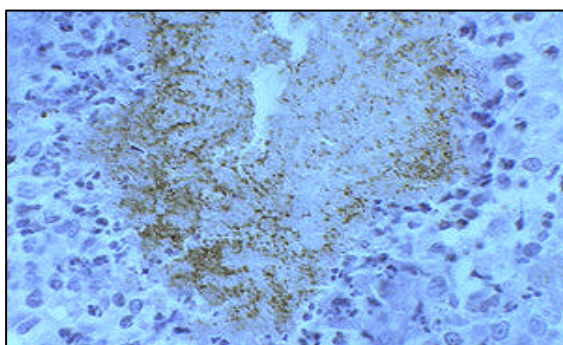


Fig. 10 Dermatitis nodular piogranulomatosa con centro de necrosis correspondiente al punto de inoculación con *M. agalactiae*. Método ABC anticuerpo monoclonal 5A10. **20x**.

Expresión de lisozima: La inmunorreactividad frente al anticuerpo policlonal anti-lisozima se observó en el citoplasma de los macrófagos localizados principalmente en las áreas perifoliculares del TLAB. Se observaron numerosos macrófagos inmunorreactivos en los espacios alveolares y en la luz de los bronquiolos. Algunos PMN neutrófilos

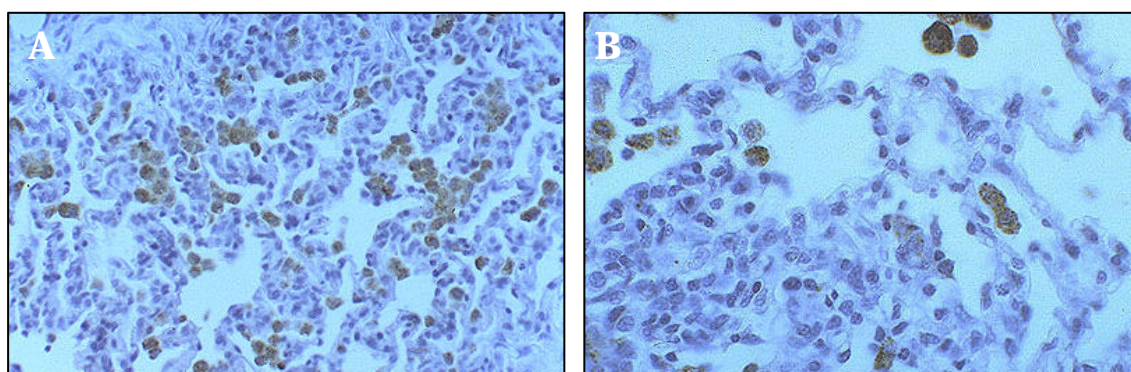


Fig. 11 Presencia de macrófagos y PMN neutrófilos inmunorreactivos en la luz de alvéolos, animal n°4 **20x** (A) y n°8, **40x** (B). Método ABC anti-Lisozima.

intravasculares resultaron en ocasiones inmunomarcados (Fig. 11 A y B). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas del TLAB entre inoculados y control (Tabla 6).

Expresión de S-100: Presencia de inmunoreactividad difusa en el núcleo y citoplasma de células con el citoplasma estrellado y largos procesos citoplasmáticos (células dendríticas), a nivel del TLAB (Fig. 12 A y B). Algunos linfocitos, células musculares lisas, terminaciones nerviosas, condrocitos y macrófagos de la pared de los alvéolos mostraron en ocasiones inmunorreacción (Fig. 12 C). No se observaron diferencias entre inoculados y control (Tabla 6).

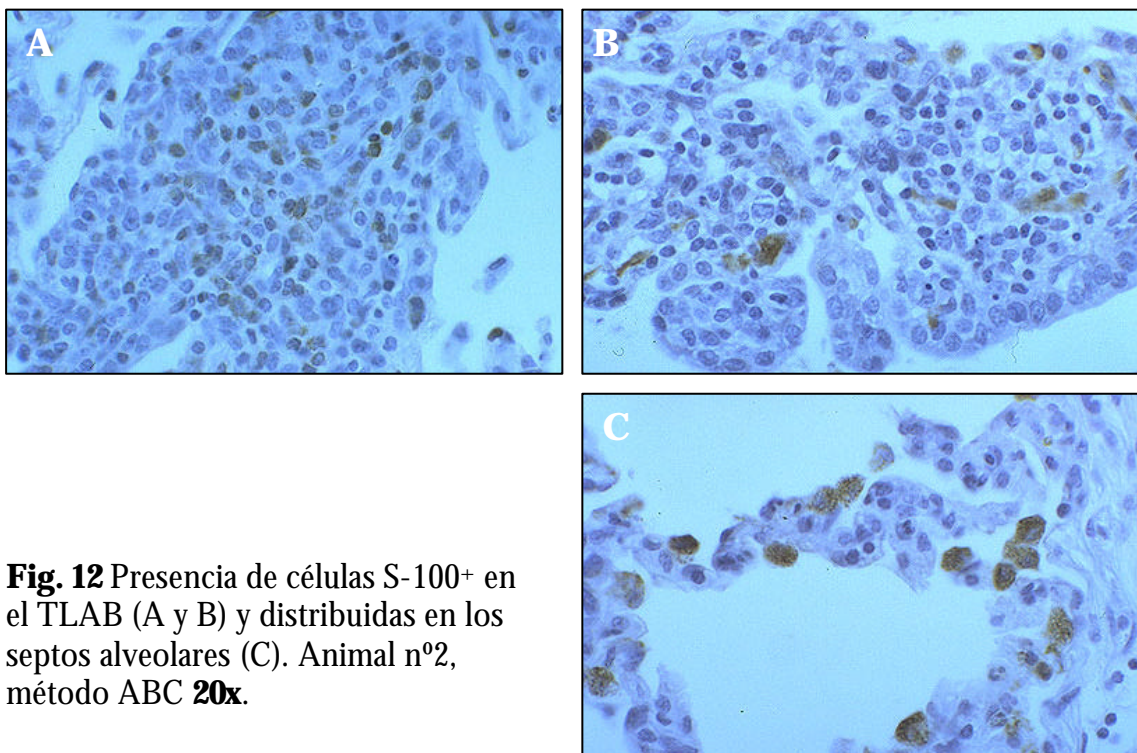


Fig. 12 Presencia de células S-100+ en el TLAB (A y B) y distribuidas en los septos alveolares (C). Animal n°2, método ABC **20x**.

Expresión del Ag Mieloide/Histiocítico: Se observó inmunorreactividad frente al anticuerpo monoclonal anti-Ag Mieloide/Histiocítico humano en escasa cantidad de PMN neutrófilos y monocitos intravasculares (Fig. 13). No se observó inmunorreacción en las células presentes en los alvéolos o en las células de la lámina propia de las vías aéreas. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas del TLAB entre inoculados y control (Tabla 6).

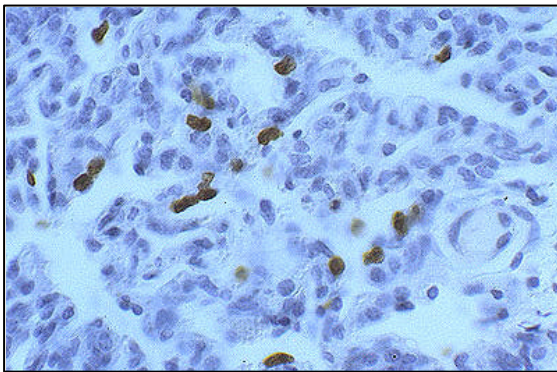


Fig. 13 Células distribuidas en los vasos sanguíneos de septos alveolares, animal n^o4. Anticuerpo anti-Ag Mieloide/Histiocítico. Método ABC **20x**.

Expresión del Ag CD3: Con el anticuerpo policlonal anti-CD3, se detectó intensa inmunorreactividad en la membrana plasmática de linfocitos del TLAB localizados principalmente en áreas perifoliculares (Fig. 14 A, B y C) y también en linfocitos infiltrados en las paredes alveolares (Fig. 14 C). La diferencia en porcentaje de células positivas entre inoculados (mediana 48,17%) y control (mediana 36,29%) en el TLAB fue estadísticamente significativa (Gráfico 1 y Tabla 6).

Gráfico 1: Porcentaje de células CD3⁺ del TLAB de cabritos inoculados/control.

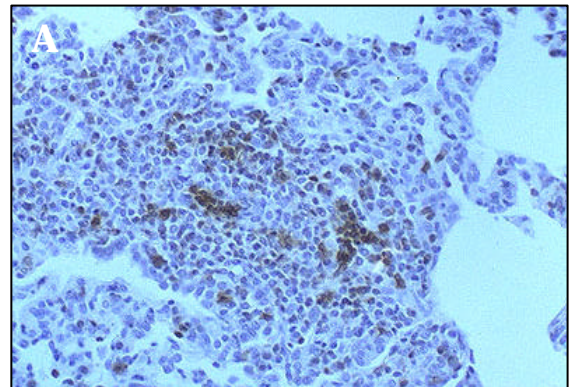
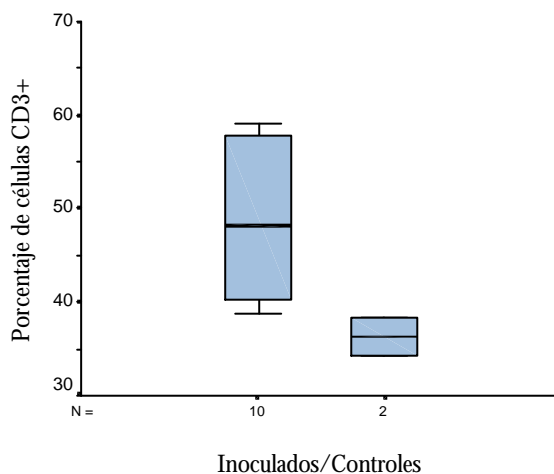
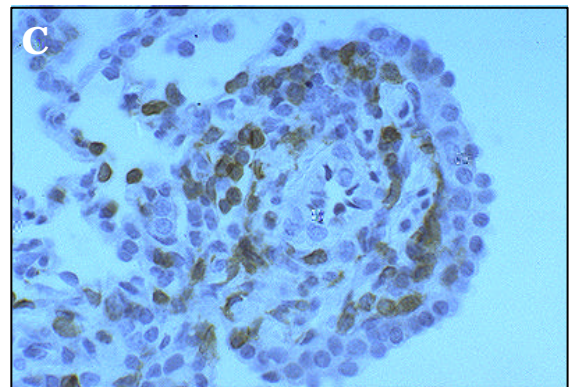
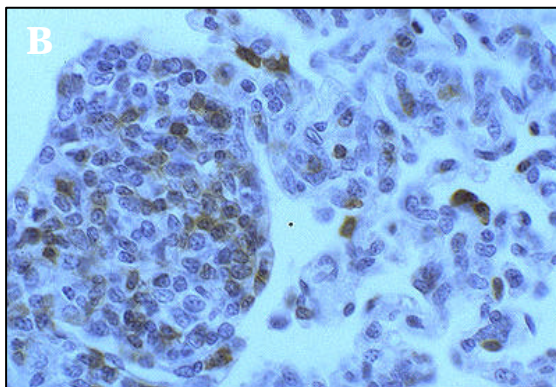


Fig. 14 Distribución de células CD3⁺ en el TLAB, animal n^o2 (A, B y C); nótese igualmente en paredes alveolares (B). Método ABC **10x** (A) y **20x** (B y C).



Expresión de Ags CD4 y CD8: Con el anticuerpo monoclonal anti-CD4, las células CD4⁺ fueron significativamente más numerosas que las CD8⁺ en los animales inoculados (Gráfico 2 A y Tabla 6) y se localizaron principalmente en las áreas perifoliculares del TLAB (Fig. 15 A y B); en el caso de las células CD8⁺, se localizaron debajo del epitelio de los bronquiolos, intraepiteliales y distribuidas de forma difusa en los folículos del TLAB (Fig. 15 C y D). El resultando fue una relación CD4/CD8 mayor a 1 en todos los cabritos inoculados (mediana 2,21:1) con diferencia significativa entre inoculados y control

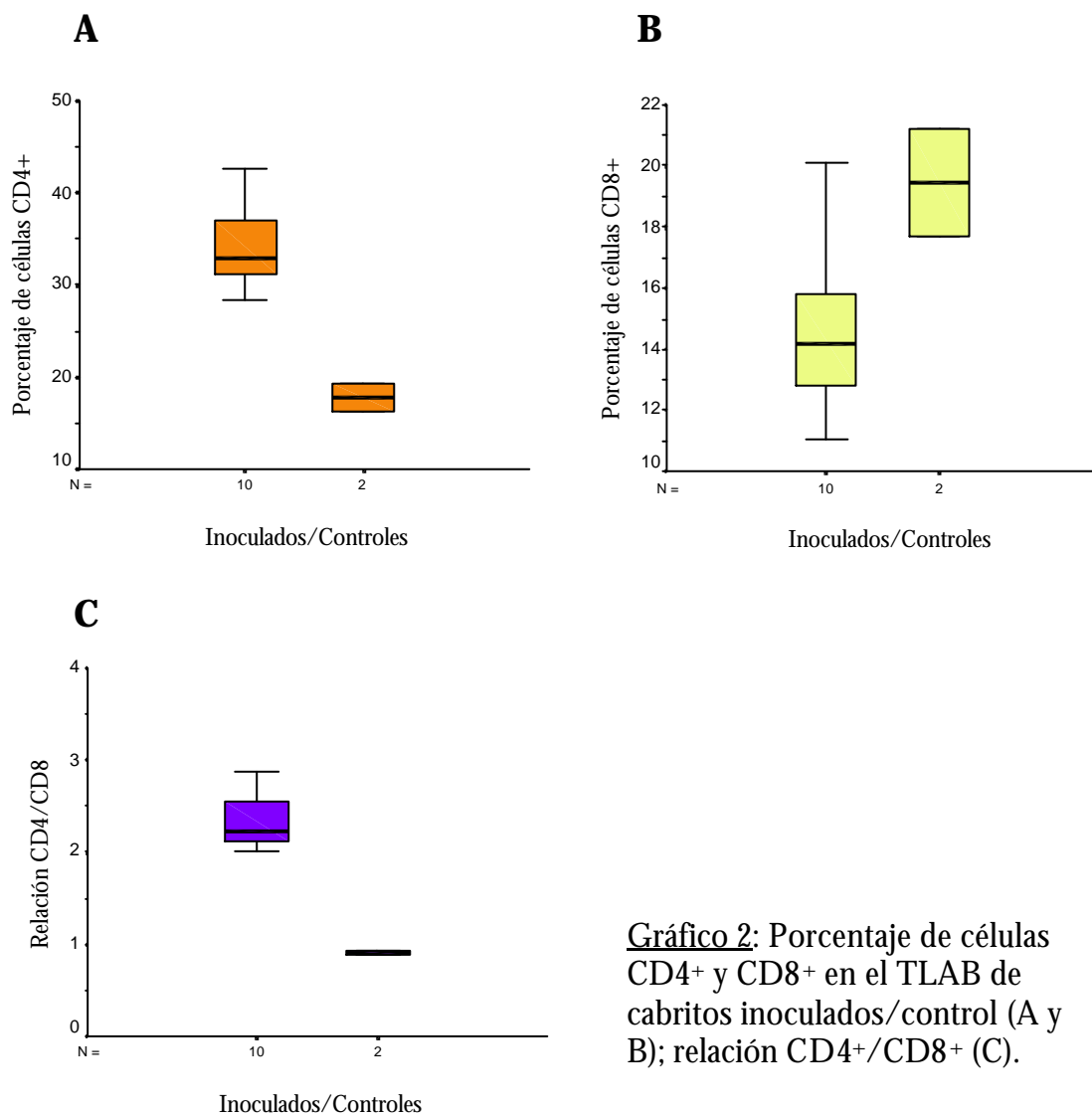


Gráfico 2: Porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ en el TLAB de cabritos inoculados/control (A y B); relación CD4⁺/CD8⁺ (C).

(mediana 0,91:1) (Gráfico 2 C y Tabla 6).

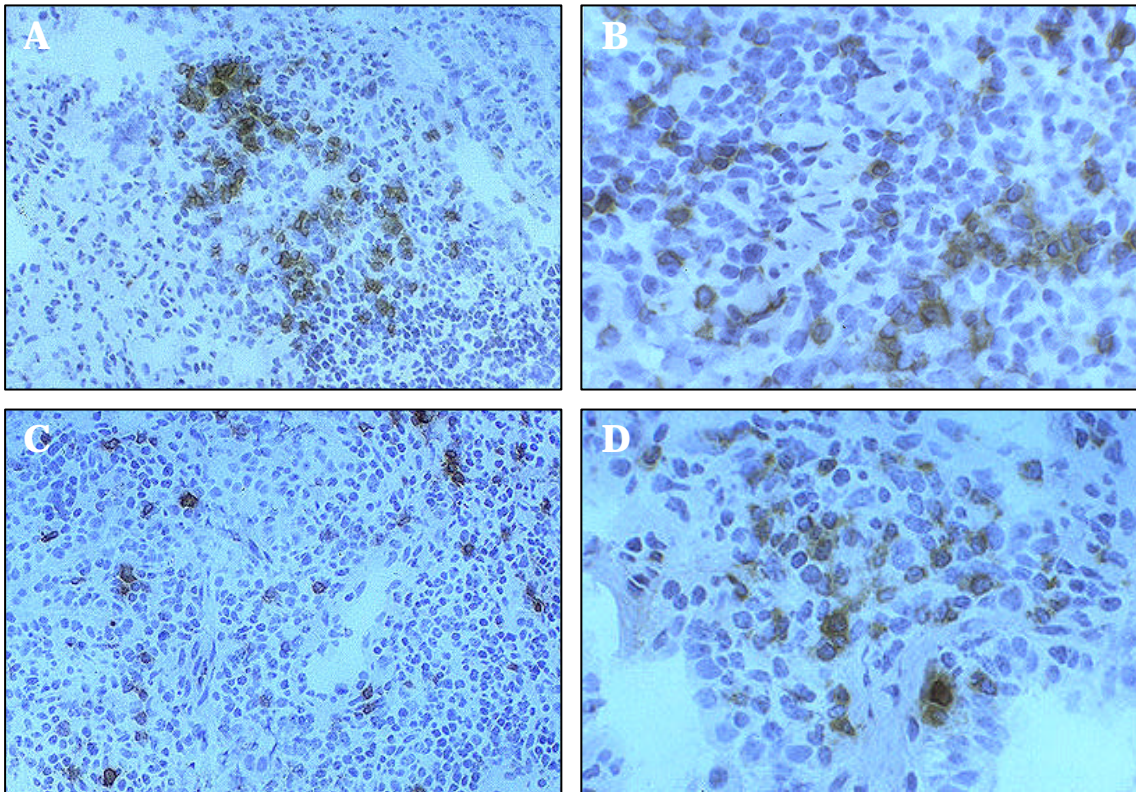


Fig. 15 Células CD4⁺ distribuidas en el TLAB (A y B); células CD8⁺ en el TLAB (C y D). Nótese la presencia de células CD8⁺ en la submucosa y en relación a células del epitelio bronquiolar (D). Animal n^o2, método ABC, **10x** (A y C) y **20x** (B y D).

Expresión de Ags TcR γ / δ : Los linfocitos TcR γ / δ del TLAB fueron escasos y aparecieron íntimamente asociados a la lámina propia de los bronquiolos (Fig. 16). No se

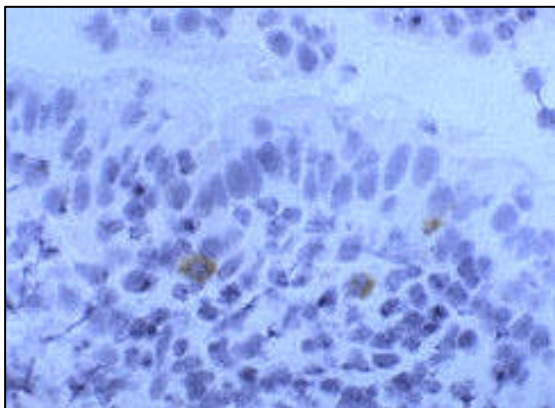


Fig. 16 Linfocitos TcR γ / δ ⁺ del TLAB asociados a la lámina propia de un bronquiolo. Animal n^o9, método ABC, **20x**.

observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas del TLAB entre animales inoculados y control (Tabla 6).

Expresión de Ags MHC II: El Ag anti-MHC II marcó células de morfología irregular con prolongaciones citoplasmáticas que se encontraron entre linfocitos del TLAB y debajo de la membrana basal del epitelio bronquial y bronquiolar (Fig. 17 A y B). El porcentaje de células positivas del TLAB fue significativamente mayor en los animales inoculados (mediana 45,04%) respecto de los control (mediana 24,33%) (Gráfico X y Tabla 6).

Gráfico 3: Porcentaje de células MHC II⁺ del TLAB de cabritos inoculados/control.

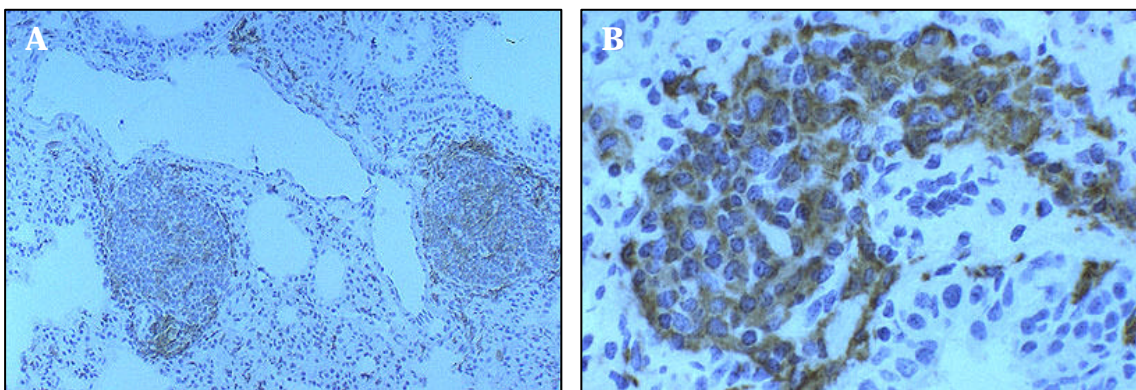
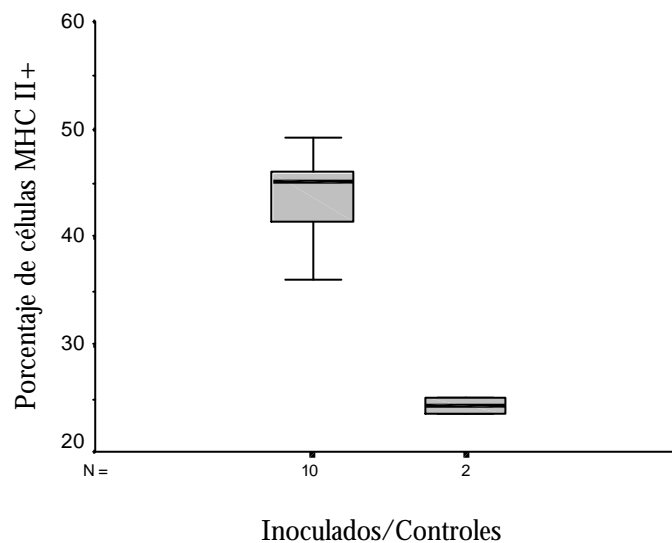


Fig. 17 Distribución de células MHC II⁺ en el TLAB. Animal n°9, método ABC **4x** (A) y animal n°7 **40x** (B).

Expresión de IgG: Se detectó con el anticuerpo policlonal anti-IgG caprina inmunorreacción en el citoplasma y membrana plasmática de un moderado número de células plasmáticas y en la superficie de algunos linfocitos localizados principalmente en el tejido perifolicular y subepitelial (Fig. 18 A). En ocasiones, se marcaron en células plasmáticas y linfocitos de la pared alveolar (Fig. 18 B). El porcentaje de células positivas del TLAB fue significativamente mayor en los animales inoculados (mediana 7,21%) que en los control (mediana 1,31%) (Gráfico 4 y Tabla 6).

Gráfico 4: Porcentaje de células IgG⁺ en el TLAB de cabritos inoculados/control.

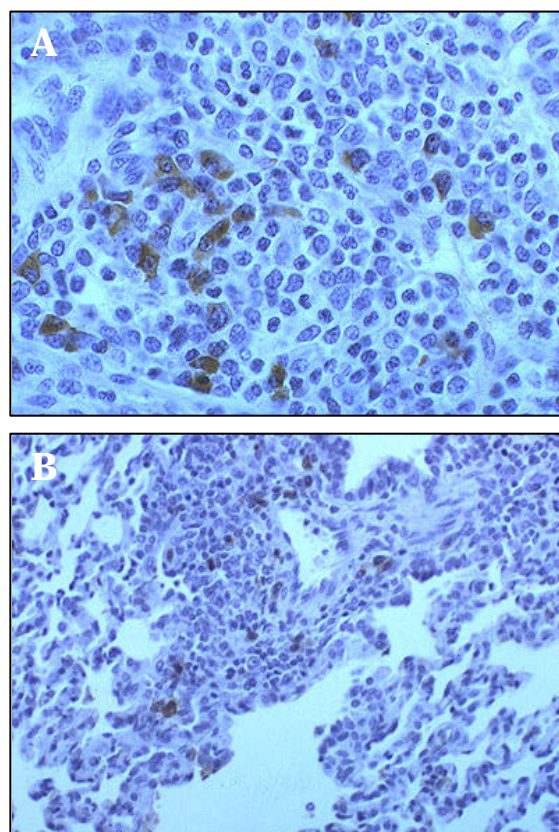
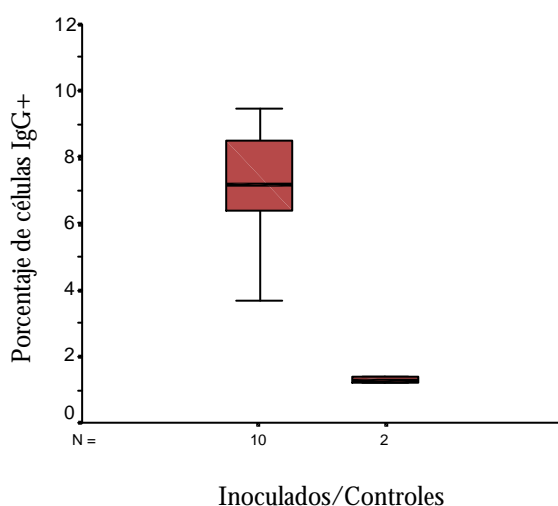


Fig. 18 Distribución de células IgG⁺ en el TLAB (A) que se observan distribuidas en los septos alveolares (B). Animal n°9, método ABC **20x** (A) y **10x** (B).

Expresión de IgA: Con el anticuerpo policlonal anti-IgA caprina se detectó inmunorreactividad en el citoplasma y membrana plasmática de un moderado número de células plasmáticas localizados principalmente en el tejido perifolicular, submucosa de las vías aéreas (Fig. 19 A) y en relación a las glándulas submucosas de los bronquios; el producto de secreción de éstas glándulas (Fig. 19 B) y el mucus presente en la luz de las vías aéreas fueron de igual forma IgA⁺. En algunas ocasiones se observaron células plasmáticas y linfocitos en la pared alveolar. El porcentaje de células positivas del TLAB fue significativamente mayor en los animales inoculados (mediana 2,88%) respecto de los control (mediana 1,44%) (Gráfico 5 y Tabla 6).

Gráfico 5: Porcentaje de células IgA⁺ en el TLAB de cabritos inoculados/control.

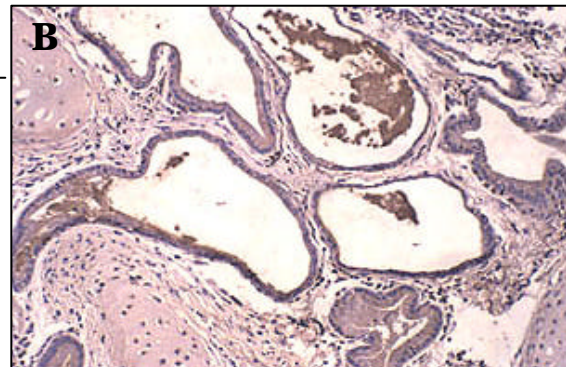
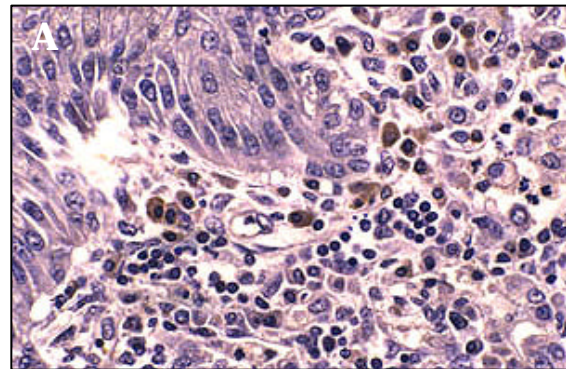
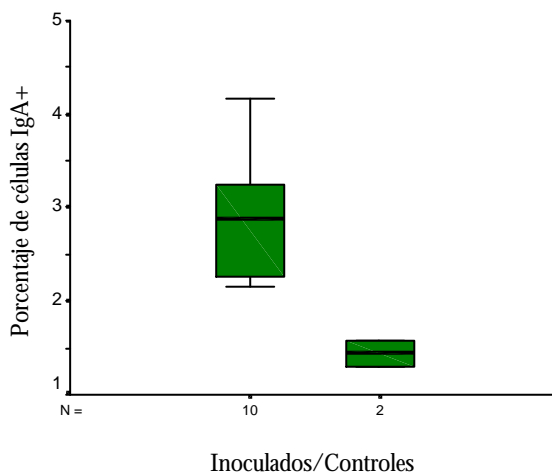


Fig. 19 Células IgA⁺ en la submucosa de vías aéreas (A, **20x**); sustancia IgA⁺ en conductos de secreción de glándulas submucosas de un bronquio (B, **10x**). Animal n°7, método ABC.

1.4. Microbiología

Previo a la infección no se detectó en ningún animal micoplasmas o bacterias patógenos para el aparato respiratorio del caprino. Después de la infección, *M. agalactiae* se recuperó de los respectivos tractos respiratorios o pulmones de todos los cabritos inoculados, *M. bovis* se recuperó de 3 animales infectados experimentalmente y 2 fueron negativos (nº8 y nº10). No se detectó septicemia en ningún animal al momento del sacrificio y no se aislaron bacterias patógenas para aparato respiratorio del ganado caprino. De los animales control los aislamientos de micoplasmas y bacterias fueron negativos.

1.5. Serología

En la inoculación experimental de los cabritos se detectó los anticuerpos específicos frente a *M. agalactiae* o *M. bovis* en suero.

1.6. Estudio ultraestructural

En el estudio ultraestructural de los cabritos inoculadas con *M. agalactiae* o *M. bovis*, reveló la presencia de microorganismos compatibles con micoplasmas sobre el epitelio ciliado de las vías respiratorias de animales inoculados experimentalmente (Fig. 20). Debido al escaso tamaño del TLAB en los animales infectados no conseguimos seleccionar áreas idóneas para el estudio ultraestructural del TLAB. En los animales control no se observaron cambios ultraestructurales significativos en las vías aéreas o alvéolos (Fig. 21 y 22).

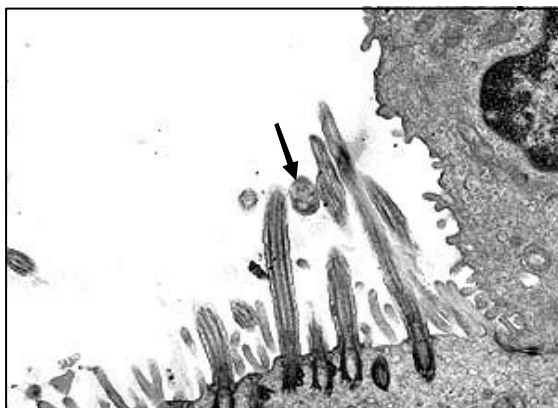


Fig. 20: Epitelio cilíndrico ciliado de un bronquiolo donde se observa un microorganismo compatible con micoplasma (flecha) y una disminución en el número de cilios. Animal nº9. **11500x**

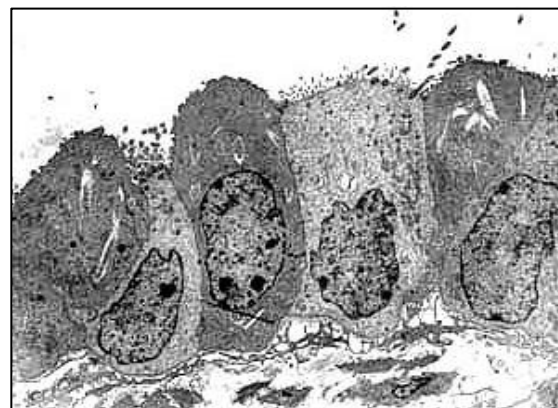


Fig. 21: Epitelio cilíndrico simple de bronquiolos de un control negativo donde se observan células ciliadas intercaladas con células de Clara, más electrodensas que las anteriores. Animal nº12. **2200x**

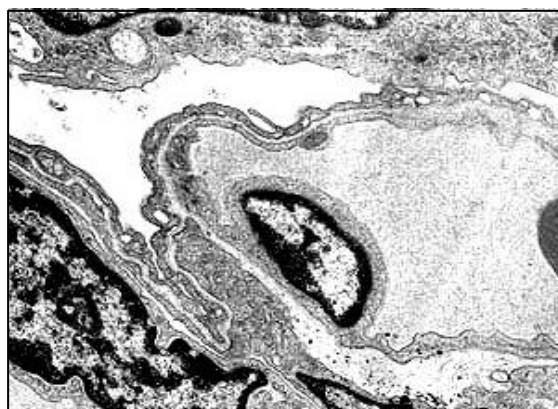


Fig. 22: Pared alveolar normal de cabrito control. Animal nº12. **9000x**

2. Cerdos de matadero con lesiones características de NEP

2.1. Valoración microscópica de las lesiones

El 100% de los casos problema mostraron lesiones neumónicas características de NEP. En el examen microscópico se observó neumonía broncointersticial catarral con linfoproliferación peribronquial del TLAB, peribronquiolar y perivascular (Fig. 23 y 24). Los centros germinales, eran prominentes en algunas ocasiones y hacían prominencia sobre la muscular de la mucosa, ocasionando un estrechamiento de la luz de las vías aéreas y, en los casos en que la linfoproliferación fue más importante, con masiva hiperplasia del TLAB, se observó atelectasia en extensas áreas del parénquima pulmonar (Fig. 24). El epitelio de las vías aéreas mostraba pérdida de cilios y exfoliación de células ciliadas, hiperplasia de células caliciformes en bronquios, bronquiolos y de las glándulas submucosas de los bronquios. Se observó alveolitis especialmente alrededor de bronquiolos terminales, con un engrosamiento de los septos interalveolares causado por la presencia de linfocitos de tamaño variable y escaso número de células plasmáticas. La luz de los alvéolos presentó un exudado compuesto fundamentalmente por macrófagos y escaso número de células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos. La pared de los alvéolos afectados presentó una moderada hiperplasia de neumocitos tipo II.

Los resultados del estudio histopatológico se encuentran resumidos en la Tabla 7 (a y b). Las lesiones se clasificaron según el criterio de evaluación semi-cuantitativo propuesto por **Livingston y cols.** (1972). La aplicación de este baremo en los animales objeto de este estudio dio lugar a los siguientes resultados:

- Los casos control (4) fueron negativos (-).

- Ocho casos problema (32%) presentaron lesiones tipo (++). En esta categoría se incluyen lesiones caracterizadas por la presencia de uno o más nódulos linfoides que se extienden a través de la muscular de la mucosa, y escaso infiltrado inflamatorio, tanto a nivel septal como en luces bronquiales y alveolares (PMN neutrófilos). Los septos alveolares se encontraban, por lo general, poco engrosados.
- Cinco (20%) lesiones tipo (+++). Caracterizados por hiperplasia linfoide perivascular y peribronquiolar con numerosas células septales y PMN neutrófilos en las luces alveolares. Los bronquios contenían, generalmente, un acúmulo masivo de PMN neutrófilos en la luz.
- Doce (48%) lesiones tipo (+++). Observándose hiperplasia linfoide perivascular y peribronquiolar intensa en amplias áreas del parénquima pulmonar. El infiltrado septal e intraluminal (macrófagos y PMN neutrófilos) fue escaso, y se pudo encontrar edema alveolar en las áreas afectadas.

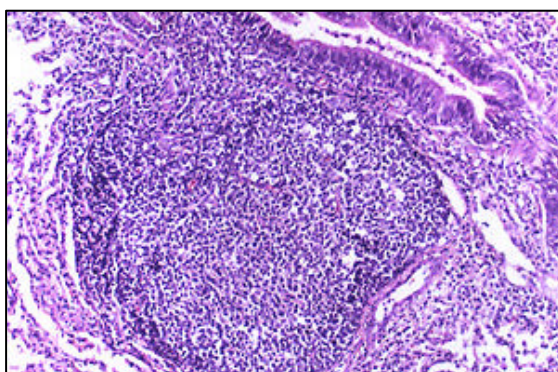


Fig. 23 Hiperplasia linfoide del TLAB en un pulmón de cerdo utilizado como caso problema con lesión tipo ++, caso n°1. H&E 10x.

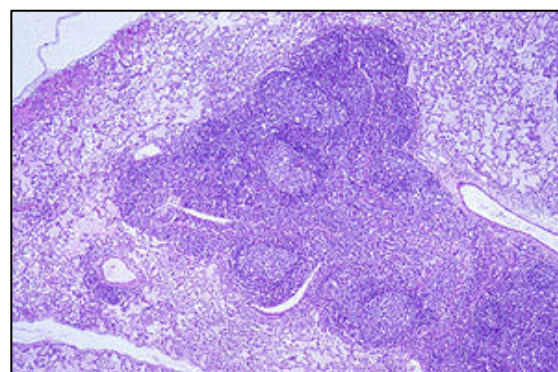


Fig. 24 Masiva hiperplasia linfoide del TLAB, peribronquial y perivascular en un pulmón de cerdo utilizado como caso problema con lesión tipo ++++, casos n°20. H&E 4x.

- Inmunohistoquímica

Los resultados del estudio de IHQ se encuentran resumidos en la Tabla 7_(a y b).

Expresión de Ags de M. hyopneumoniae: Cuando se utilizó el anticuerpo policlonal anti-*M. hyopneumoniae* el 100% de los casos problema manifestó una reacción de tipo granular, presente en el ápex de los cilios o en el espacio interciliar de bronquios y bronquiolos (Fig. 25 A y B). Los casos control no mostraron inmunorreacción.

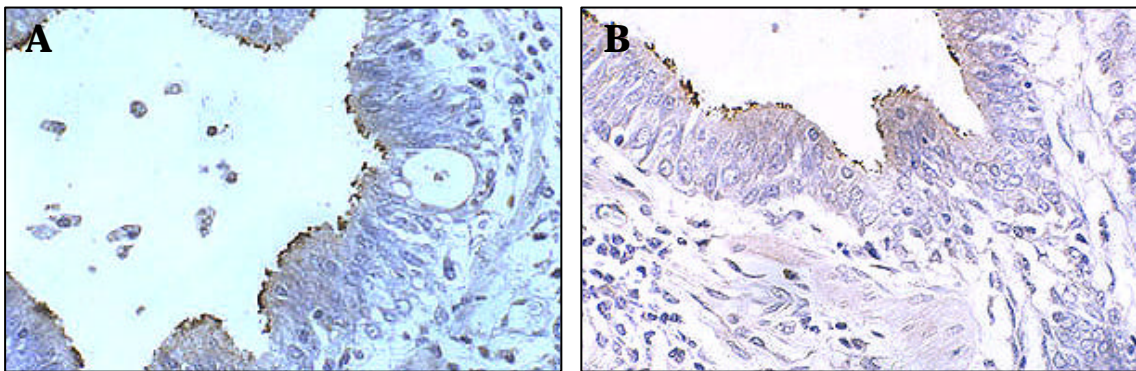


Fig. 25 (A y B) Reacción IHQ positiva de tipo granular con el anticuerpo anti-*M. hyopneumoniae* en la superficie del epitelio ciliado de las vías aéreas del pulmón de cerdo, caso nº1. Método ABC **20x**.

Tabla 7 (a): Resultados Histológicos e Inmunohistoquímicos (cerdos)

Anticuerpos	Porcentajes de células marcadas positivamente en el TLAB \pm DS*														
	1 (++)	2 (+++)	3 (++)	4 (+++)	5 (++)	6 (++)	7 (+++)	8 (++++)	9 (++)	10 (++)	11 (++)	12 (++++)	13 (++++)	14 (++)	15 (+++)
Anti- <i>M.hyop.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisozima	1.18 \pm 0.21	1.11 \pm 0.07	0.82 \pm 0.19	0.71 \pm 0.21	0.87 \pm 0.19	0.67 \pm 0.14	1.00 \pm 0.18	0.76 \pm 0.25	0.92 \pm 0.28	0.83 \pm 0.17	0.81 \pm 0.17	0.33 \pm 0.25	0.62 \pm 0.05	0.44 \pm 0.03	0.66 \pm 0.10
S-100	10.79 \pm 2.03	8.06 \pm 2.74	9.27 \pm 2.37	9.53 \pm 2.93	10.64 \pm 2.11	9.70 \pm 2.71	8.75 \pm 1.03	10.46 \pm 1.57	6.68 \pm 1.04	8.02 \pm 0.09	10.24 \pm 2.62	7.96 \pm 2.23	5.19 \pm 0.49	8.39 \pm 2.15	10.09 \pm 1.53
Ag. Miel./hist.	0.57 \pm 0.07	0.49 \pm 0.01	0.66 \pm 0.06	0.93 \pm 0.43	0.62 \pm 0.13	0.48 \pm 0.02	0.66 \pm 0.17	0.56 \pm 0.07	0.59 \pm 0.04	0.69 \pm 0.06	0.90 \pm 0.56	0.75 \pm 0.08	0.84 \pm 0.11	0.62 \pm 0.05	0.67 \pm 0.07
CD2	16.67 \pm 3.40	34.51 \pm 4.86	30.16 \pm 3.68	24.30 \pm 3.50	27.47 \pm 3.65	28.73 \pm 1.69	29.16 \pm 3.80	22.52 \pm 1.82	35.23 \pm 0.53	33.88 \pm 3.89	27.07 \pm 4.61	24.71 \pm 2.08	26.31 \pm 3.22	25.23 \pm 1.10	36.35 \pm 5.96
CD3	27.19 \pm 2.86	25.13 \pm 1.11	24.04 \pm 1.72	25.80 \pm 4.27	26.97 \pm 3.87	27.26 \pm 1.49	20.93 \pm 0.69	20.74 \pm 1.99	34.68 \pm 5.24	32.05 \pm 4.34	25.73 \pm 1.40	25.78 \pm 4.67	23.39 \pm 4.03	25.85 \pm 3.54	33.24 \pm 4.55
CD4	23.40 \pm 3.42	18.95 \pm 2.24	19.27 \pm 3.41	15.86 \pm 2.48	21.07 \pm 6.00	19.13 \pm 3.84	16.41 \pm 1.05	15.19 \pm 3.97	25.21 \pm 2.37	25.96 \pm 4.28	21.16 \pm 0.76	18.22 \pm 4.58	17.36 \pm 2.54	14.57 \pm 3.61	21.34 \pm 7.13
CD8	5.79 \pm 2.32	5.24 \pm 1.32	6.37 \pm 0.98	5.47 \pm 1.46	5.59 \pm 1.17	4.62 \pm 2.19	3.65 \pm 0.59	5.07 \pm 1.31	5.12 \pm 1.17	4.15 \pm 0.95	4.83 \pm 0.95	4.01 \pm 0.31	4.14 \pm 0.44	2.73 \pm 0.42	2.94 \pm 0.51
CD4/CD8	4.04	3.62	3.03	2.90	3.77	4.14	4.50	2.99	4.93	6.25	4.38	4.55	4.32	5.34	7.25
MHC II	22.49 \pm 4.86	20.90 \pm 2.83	12.19 \pm 0.22	16.14 \pm 0.88	22.74 \pm 4.72	27.42 \pm 1.93	19.39 \pm 2.98	27.97 \pm 7.09	22.88 \pm 2.72	24.31 \pm 1.68	25.61 \pm 7.99	23.26 \pm 6.53	26.56 \pm 3.24	24.37 \pm 2.76	19.22 \pm 3.83
IgG	2.34 \pm 0.27	2.13 \pm 0.47	2.07 \pm 0.36	1.62 \pm 0.35	2.82 \pm 1.08	2.05 \pm 0.93	1.58 \pm 0.47	2.30 \pm 0.77	1.85 \pm 0.71	1.35 \pm 0.39	1.96 \pm 0.56	1.92 \pm 0.75	1.77 \pm 0.36	3.08 \pm 0.35	2.38 \pm 0.41
IgA	1.35 \pm 0.41	4.62 \pm 0.62	1.21 \pm 0.43	2.21 \pm 0.37	1.91 \pm 0.26	1.67 \pm 0.66	0.84 \pm 0.16	2.80 \pm 0.29	1.91 \pm 0.38	1.45 \pm 0.25	1.64 \pm 0.30	2.30 \pm 1.10	1.85 \pm 0.22	2.70 \pm 1.17	2.44 \pm 0.75

* DS: Desvío estándar.

(-), (+), (++) , (+++), (++++): Valoración microscópica de las lesiones de NEP.

Anti-*M.hyop.*: Anti-*M.hyopneumoniae*. Valoración de la reacción IHQ: (+), positivo; (-), negativo.

Ag. Miel./hist.: Antígeno Mielocitoide/histiocítico.

El Test W de Wilcoxon revela una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las células S-100⁺, CD4⁺, CD8⁺, relación CD4⁺/CD8⁺, IgG⁺ e IgA⁺ de los casos problema y controles; la diferencia fue no significativa con los otros anticuerpos.

Tabla 7 (b): Resultados Histológicos e Inmunohistoquímicos (cerdos)

Anticuerpos	Porcentajes de células marcadas positivamente en el TLAB \pm DS*										Porcentajes de células marcadas positivamente en el TLAB \pm DS* (Controles)			
	16 (++++)	17 (++++)	18 (++++)	19 (++++)	20 (++++)	21 (++++)	22 (+++)	23 (++++)	24 (++++)	25 (++++)	26 (-)	27 (-)	28 (-)	29 (-)
Anti- <i>M.hyop.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Lisozima	0.56 \pm 0.24	0.83 \pm 0.17	0.87 \pm 0.20	0.86 \pm 0.31	0.62 \pm 0.22	0.60 \pm 0.12	0.68 \pm 0.14	1.09 \pm 0.11	0.97 \pm 0.30	0.63 \pm 0.05	0.67 \pm 0.06	0.91 \pm 0.15	0.86 \pm 0.18	0.61 \pm 0.08
S-100	7.07 \pm 1.87	9.13 \pm 1.68	8.19 \pm 2.97	8.69 \pm 0.91	6.92 \pm 1.40	8.23 \pm 1.79	8.69 \pm 1.78	7.61 \pm 0.80	9.39 \pm 1.07	11.93 \pm 0.50	11.41 \pm 1.16	11.38 \pm 2.36	12.52 \pm 2.30	11.22 \pm 2.30
Ag. Miel./hist.	0.54 \pm 0.07	0.73 \pm 0.15	0.57 \pm 0.06	0.70 \pm 0.09	0.56 \pm 0.04	0.54 \pm 0.04	0.58 \pm 0.02	0.67 \pm 0.15	0.65 \pm 0.09	0.66 \pm 0.15	0.82 \pm 0.54	0.63 \pm 0.61	0.55 \pm 0.36	0.50 \pm 0.27
CD2	29.80 \pm 5.18	31.00 \pm 4.55	28.52 \pm 3.26	27.43 \pm 7.78	29.27 \pm 5.00	27.11 \pm 2.79	27.19 \pm 1.57	28.55 \pm 2.91	24.86 \pm 2.00	24.61 \pm 7.85	16.09 \pm 4.70	30.77 \pm 6.05	15.36 \pm 1.19	13.20 \pm 2.55
CD3	26.73 \pm 2.66	21.95 \pm 1.93	23.49 \pm 3.80	23.11 \pm 1.61	23.93 \pm 1.84	26.53 \pm 4.80	28.18 \pm 4.59	24.55 \pm 5.24	24.38 \pm 1.22	21.78 \pm 2.03	33.33 \pm 3.20	32.87 \pm 6.61	27.47 \pm 5.85	25.66 \pm 5.46
CD4	24.43 \pm 4.75	19.22 \pm 5.20	20.07 \pm 1.37	19.99 \pm 3.18	19.61 \pm 3.40	23.57 \pm 3.61	26.46 \pm 1.59	21.86 \pm 2.29	19.08 \pm 1.30	16.10 \pm 2.60	6.98 \pm 0.43	12.14 \pm 2.39	10.43 \pm 2.02	9.97 \pm 2.08
CD8	3.43 \pm 0.24	2.61 \pm 0.46	3.84 \pm 0.34	3.57 \pm 0.94	4.72 \pm 0.33	4.02 \pm 0.17	2.86 \pm 0.38	3.17 \pm 0.71	4.12 \pm 2.15	3.79 \pm 0.24	19.83 \pm 3.65	18.98 \pm 3.36	21.86 \pm 2.99	22.49 \pm 5.57
CD4/CD8	7.12	7.36	5.22	5.59	4.16	5.87	9.25	6.90	4.63	4.25	0.35	0.64	0.48	0.44
MHC II	23.03 \pm 8.87	23.09 \pm 3.43	21.50 \pm 4.96	26.67 \pm 3.37	26.07 \pm 5.95	18.66 \pm 0.99	14.37 \pm 6.08	27.01 \pm 3.35	21.09 \pm 6.05	16.55 \pm 0.35	31.90 \pm 4.92	21.28 \pm 5.37	25.38 \pm 2.65	28.80 \pm 3.26
IgG	1.67 \pm 0.52	3.61 \pm 1.76	1.48 \pm 0.03	1.07 \pm 0.03	1.52 \pm 0.43	1.21 \pm 0.09	2.01 \pm 0.59	1.54 \pm 0.45	2.49 \pm 0.23	1.63 \pm 0.41	1.04 \pm 0.26	1.03 \pm 0.24	0.69 \pm 0.06	1.03 \pm 0.07
IgA	2.81 \pm 0.46	2.19 \pm 0.48	1.67 \pm 0.19	1.71 \pm 0.20	1.67 \pm 0.74	1.46 \pm 0.27	2.06 \pm 0.35	2.38 \pm 0.56	1.95 \pm 0.38	2.52 \pm 0.38	1.08 \pm 0.12	1.03 \pm 0.20	0.74 \pm 0.09	0.96 \pm 0.10

* DS: Desvío estándar.

(-), (+), (++) , (+++) , (++++): Valoración microscópica de las lesiones de NEP.

Anti-*M.hyop.*: Anti-*M.hyopneumoniae*. Valoración de la reacción IHQ: (+), positivo; (-), negativo.

Ag. Miel./hist.: Antígeno Mieloide/histiocítico.

El Test W de Wilcoxon revela una diferencia significativa (P<0.05) entre las células S-100⁺, CD4⁺, CD8⁺, relación CD4⁺/CD8⁺, IgG⁺ e IgA⁺ de los casos problema y controles; la diferencia fue no significativa con los otros anticuerpos.

Expresión de lisozima: La inmunorreactividad frente al anticuerpo policlonal anti-lisozima se observó en el citoplasma de los macrófagos principalmente localizados en las áreas perifoliculares del TLAB (Fig. 26 A). Se observaron numerosos macrófagos inmunorreactivos en los espacios alveolares y en la luz de los bronquiolos (Fig. 26 B). Algunos neutrófilos intravasculares presentaron en ocasiones inmunorreacción. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas del TLAB entre casos problema y control (Tabla 7 a y b).

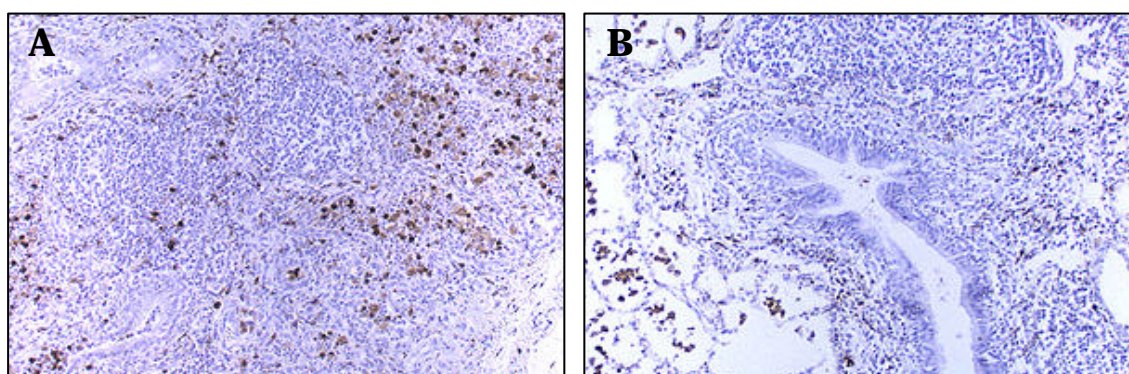


Fig. 26 Presencia de macrófagos y PMN neutrófilos inmunorreactivos en la periferia del TLAB, caso n°25 **10x** (A) y en la luz de los alvéolos, caso n°1 **20x** (B). Método ABC anti-Lisozima.

Expresión de S-100: En el TLAB se observó una inmunorreactividad difusa en el núcleo y el citoplasma de células con el citoplasma estrellado y largos procesos citoplasmáticos (células dendríticas) (Fig. 27 C). Estas células se encontraron distribuidas especialmente dentro de los centros germinales y en la periferia de los folículos linfoides donde se observó una moderada cantidad de linfocitos positivos (Fig. 27 A y B). Algunos linfocitos, células musculares lisas, terminaciones nerviosas, células endoteliales, condrocitos y macrófagos de los septos de los alvéolos fueron en ocasiones positivos. Algunas células mononucleares en bronquios y bronquiolos resultaron inmunomarcados

con este anticuerpo (Fig. 27 A y B). La diferencia en porcentaje de células positivas entre casos problema (mediana 8,69%) y control (mediana 11,39%) en el TLAB fue estadísticamente significativa (Gráfico 6 y Tabla 7_{a y b}).

Gráfico 6: Porcentaje de células S-100⁺ del TLAB de cerdos casos problema/control.

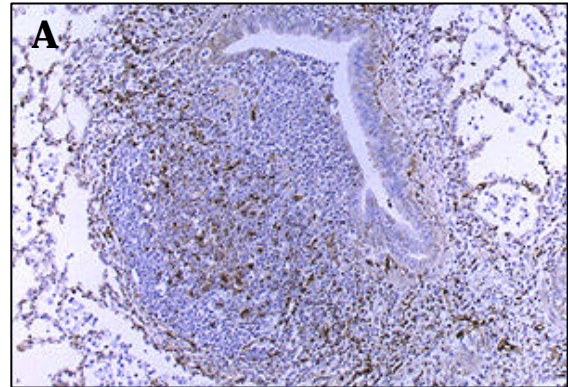
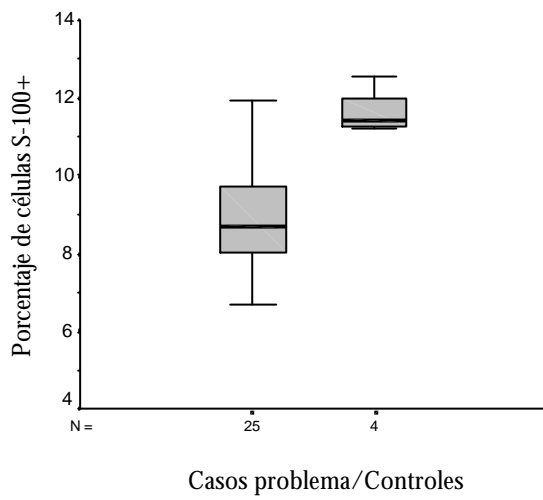
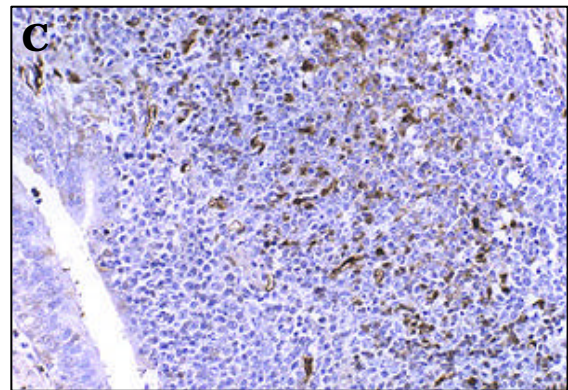
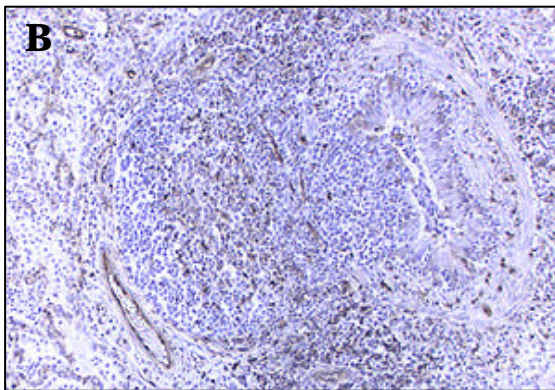


Fig. 27 Presencia de células S-100⁺ en TLAB y distribuidas en los septos alveolares (A y B), obsérvese la morfología alargada de las células positivas (C). Método ABC, caso n^o2 **10x** (A y B) y **20x** (C).



Expresión del Ag Mieloide/Histiocítico: Se observó inmunorreactividad frente al anticuerpo monoclonal anti-Ag Mieloide/Histiocítico humano en muy escasa cantidad de PMN dentro del TLAB. Similar positividad mostraron los PMN distribuidos dentro de los alvéolos hecho que contrasta con una leve positividad de los macrófagos alveolares, lo mismo ocurrió con estas poblaciones celulares en la luz de las vías aéreas (Fig. 28 A y B). La lámina propia de las vías aéreas mostraron escasa cantidad de PMN positivos (Fig. 28 A). Dentro de los vasos sanguíneos se observa escasa cantidad de PMN y monocitos positivos. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas del TLAB entre casos problema y control (Tabla 7 a y b).

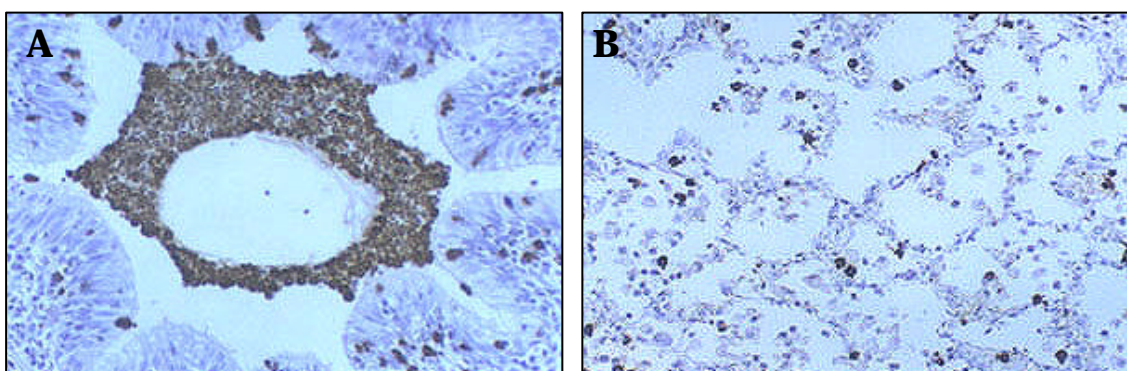


Fig. 28 PMN neutrófilos y macrófagos en la luz, intraepiteliales y en submucosa de las vías aéreas (A, caso n^o7); células distribuidas en los vasos sanguíneos de septos alveolares (B, caso n^o1). Anticuerpo anti-Ag Mieloide/Histiocítico. Método ABC **20x**.

Expresión del Ag CD2: Con el anticuerpo monoclonal anti-CD2 se observó inmunorreactividad en la membrana plasmática de células mononucleares con escaso citoplasma (linfocitos) distribuidos especialmente en las áreas perifoliculares del TLAB, en menor cantidad aparecieron dentro de los centros germinativos (Fig. 29). En los septos alveolares se detectó una escasa a moderada cantidad de células positivas distribuidas por el parénquima que fueron más numerosas en las porciones más próximas a las vías aéreas.

Las vías aéreas mostraron escasa cantidad de células positivas subepiteliales e intraepiteliales. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas del TLAB entre casos problema y control (Tabla 7_{a y b}).

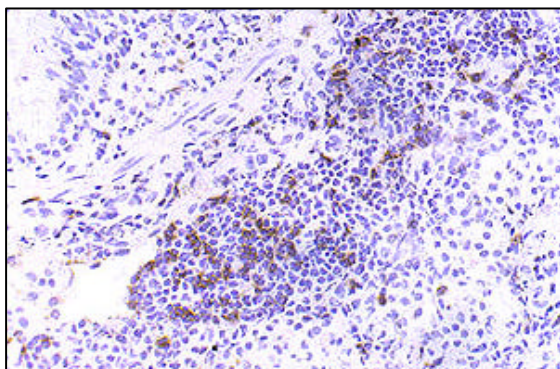


Fig. 29 Presencia de células CD2⁺ en el TLAB, caso n°25. Método ABC **20x**.

Expresión del Ag CD3: Con el anticuerpo policlonal anti-CD3, se detectó intensa inmunorreactividad en la membrana plasmática de linfocitos localizados en el TLAB principalmente en las áreas perifoliculares, también se observaron linfocitos infiltrados en los septos alveolares que fueron más numerosos en las áreas de parénquima circundante a los bronquios (Fig. 30 A y B). Las vías aéreas mostraron escasa cantidad de células positivas subepiteliales y algunas intraepiteliales (Fig. 30 B). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas del TLAB entre casos problema y control (Tabla 7_{a y b}).

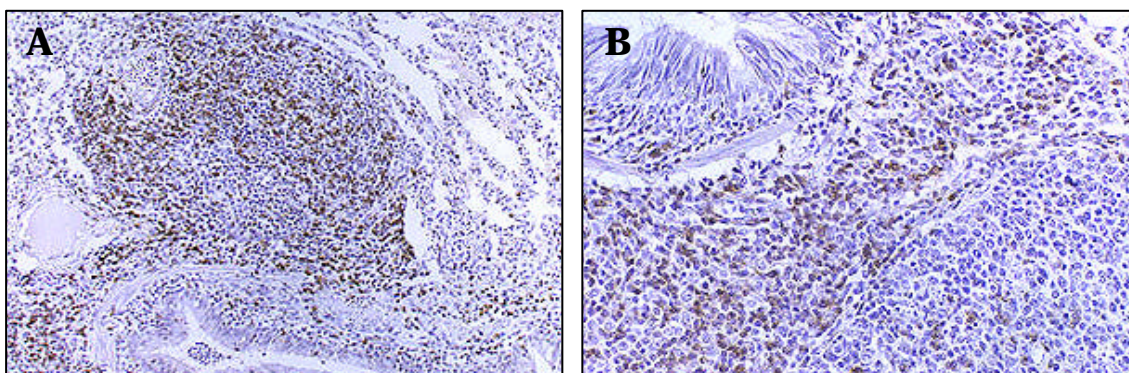


Fig. 30 Distribución de células CD3⁺ en el TLAB, caso n°25. Método ABC **10x** (A) y **20x** (B).

Expresión de Ags CD4 y CD8: Con el anticuerpo monoclonal anti-CD4, la subpoblación CD4⁺ del TLAB fue significativamente más numerosa que la inmunomarcada con el anticuerpo monoclonal anti-CD8⁺ en todos los casos problema, resultando la mediana de la relación CD4/CD8 de los casos problema de 4,55:1 siendo el valor menor de 2,90:1 (Gráfico 7 A, B y C; Tabla 7 a y b). Caso contrario ocurrió entre los casos control donde la mediana de la relación CD4/CD8 fue 0,46 (Gráfico 7 C y Tabla 7 a y b). Los linfocitos CD4⁺ se localizaron principalmente en las áreas perifoliculares y en los centros germinales del TLAB (Fig. 31 A y Fig. 32 C). Los linfocitos CD8⁺ se localizaron principalmente en las áreas perifoliculares, distribuidos difusamente en los folículos, así como subepiteliales e intraepiteliales en bronquios y bronquiolos (Fig. 31 B y C y Fig. 32

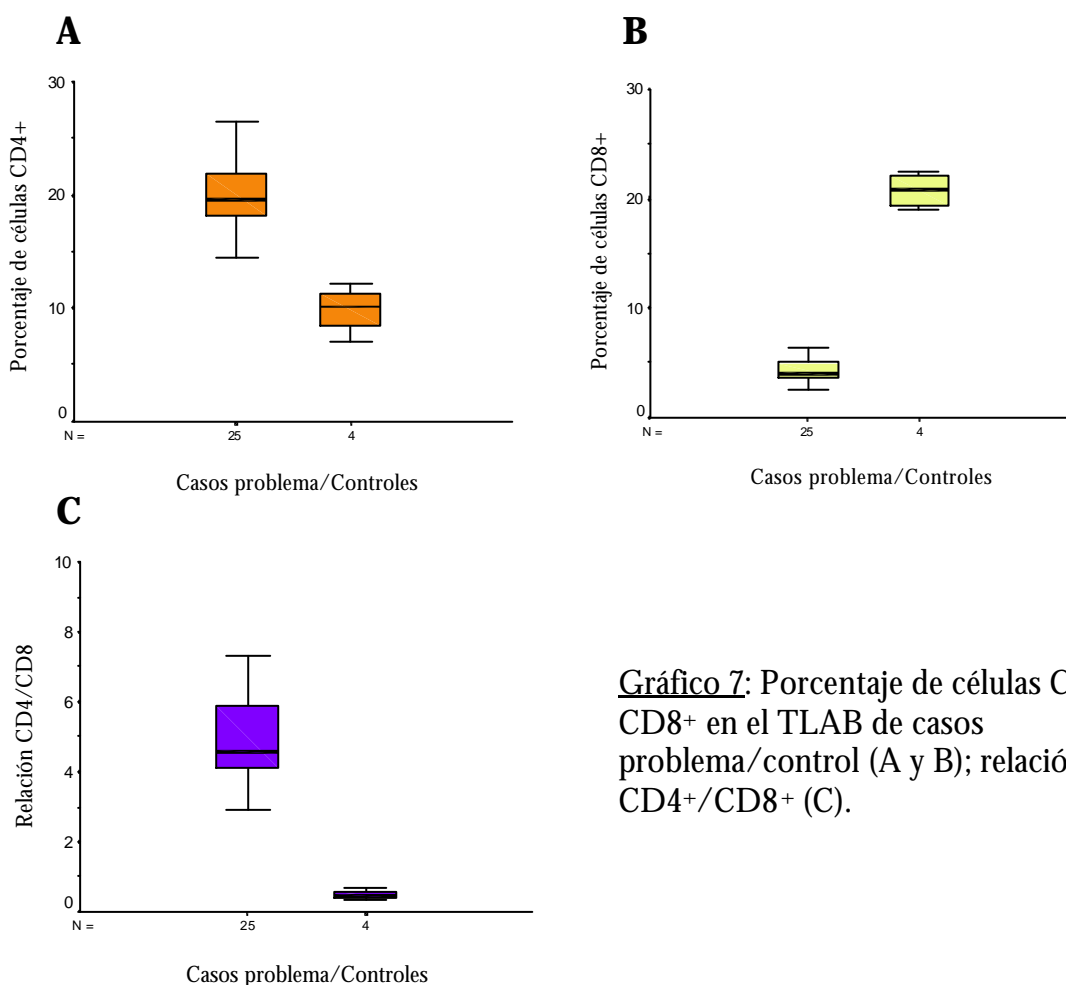


Gráfico 7: Porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ en el TLAB de casos problema/control (A y B); relación CD4⁺/CD8⁺ (C).

A y B). Se observó escasa cantidad de ambas poblaciones, CD4⁺ y CD8⁺, infiltrando los septos alveolares.

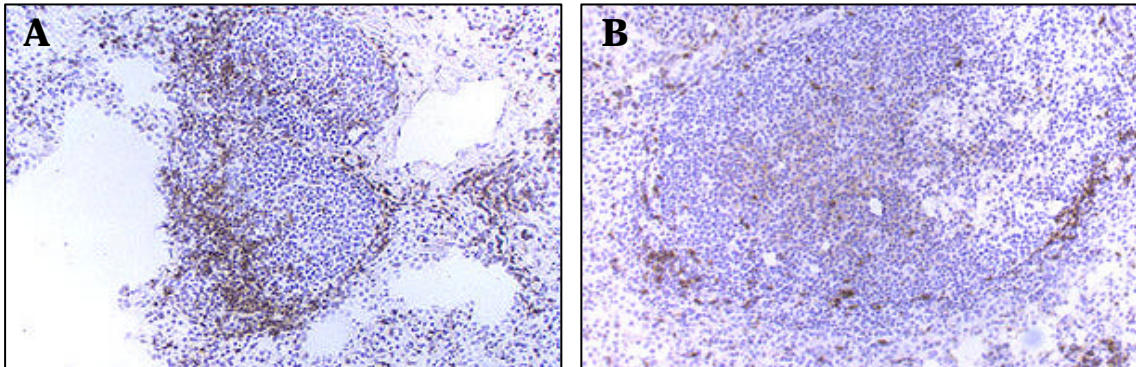


Fig. 31 Células CD4⁺ distribuidas en el TLAB del caso n°25, **10x** (A); células CD8⁺ en el TLAB del caso n°21, **10x** (B); células CD8⁺ intraepiteliales del caso n°25, **20x** (C). Método ABC.

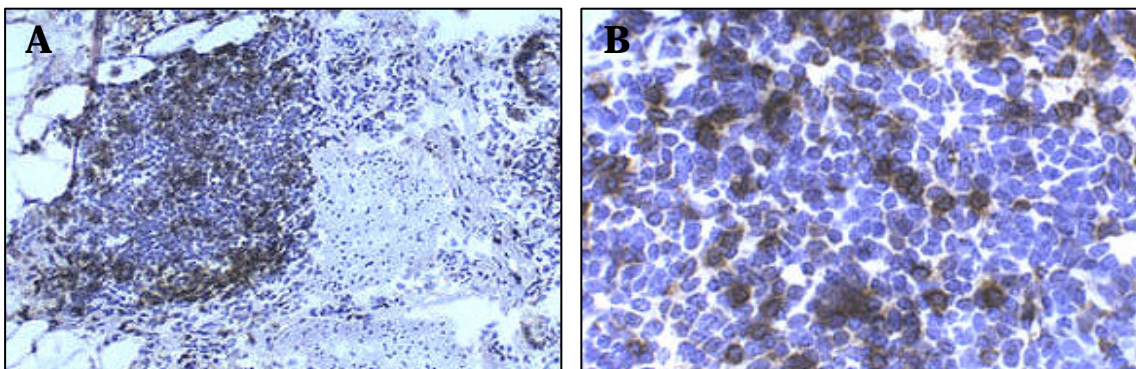
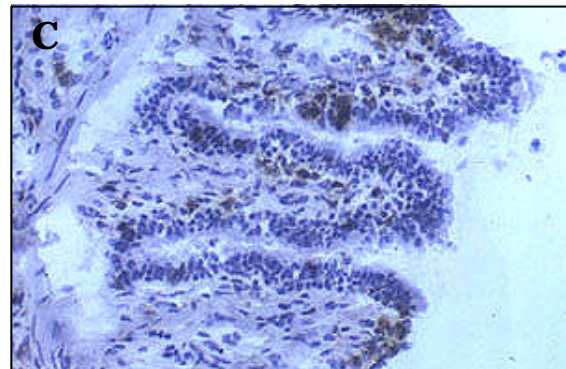
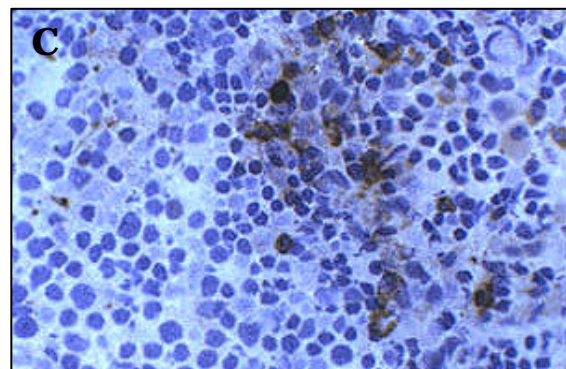


Fig. 32 Células CD8⁺ **10x** (A), **20x** (B) y CD4⁺, **20x** (C), distribuidas en el TLAB del caso control n°29, método ABC.



Expresión del Ag MHC II: El anticuerpo monoclonal anti-MHC II marcó, células de morfología irregular con prolongaciones citoplasmáticas y núcleo relativamente grande respecto de los linfocitos que los rodean. En el TLAB se las observó principalmente dentro de los centros germinales y debajo de la membrana basal de los epitelios (Fig. 33 A y B). Además se encontró gran cantidad de células de citoplasma abundante y núcleo arriñonado compatibles con macrófagos alveolares distribuidos principalmente dentro de la luz de los alvéolos y en menor cantidad en los septos de los mismos. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas del TLAB entre casos problema y control (Tabla 7_{a y b}).

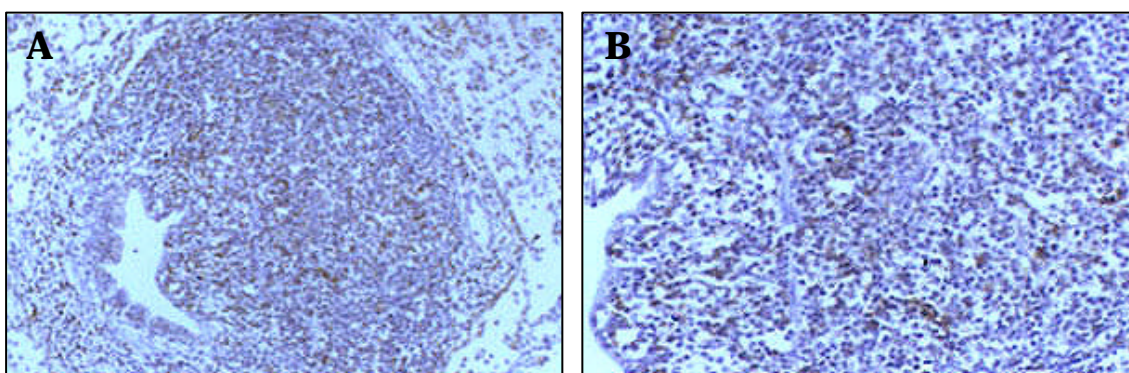


Fig. 33 Células MHC II⁺ en el TLAB, **10x** (A); y dispuestas en la submucosa de las vías aéreas, **20x** (B). Caso n°1, método ABC.

Expresión de IgG: Se detectó con el anticuerpo policlonal anti-IgG porcina inmunorreactividad en el citoplasma y membrana plasmática de un moderado número de células plasmáticas y en la membrana citoplasmática de algunos linfocitos localizados principalmente en el tejido perifolicular del TLAB y submucosa de las vías aéreas (Fig. 34 A y B). En algunas ocasiones, se detectó inmunorreactividad en células mononucleares en los septos alveolares y en la luz de los alvéolos. El porcentaje de células positivas fue

significativamente mayor en el TLAB de los casos problema (mediana 1,92%) que en los control (mediana 1,03%) (Gráfico 8 y Tabla 7 a y b).

Gráfico 8: Porcentaje de células IgG⁺ en el TLAB de casos problema/control.

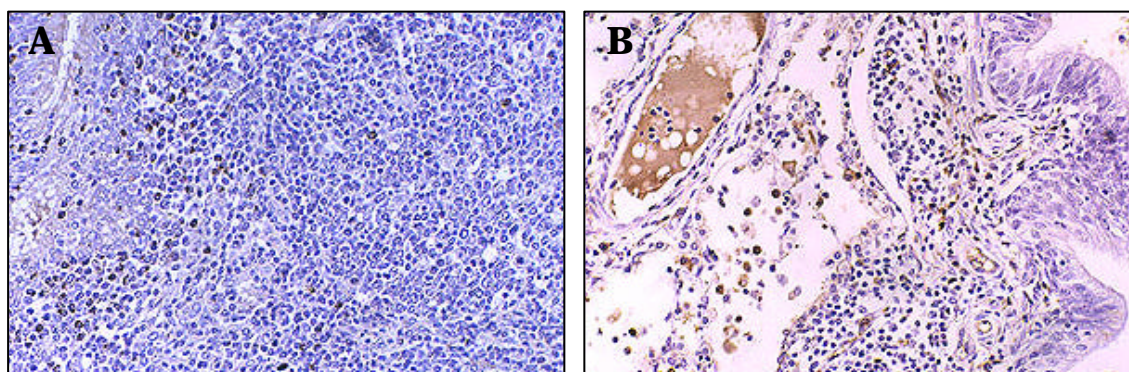
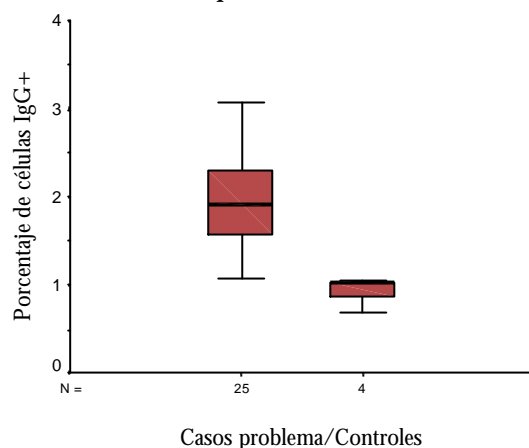


Fig. 34 Distribución de células IgG⁺ en el tejido perifolicular del TLAB, caso n°25, **20x** (A) y submucosa de las vías aéreas, caso n°18, **20x** (B). Método ABC.

Expresión de IgA: Se detectó con el anticuerpo policlonal anti-IgA porcina una inmunorreacción en el citoplasma y membrana plasmática y de un moderado número de células plasmáticas localizadas principalmente en el tejido perifolicular y en la región subepitelial de las vías aéreas (Fig. 35 A). También se observó una gran cantidad de células positivas rodeando las glándulas submucosas de los bronquios (Fig. 35 B). En algunas ocasiones, se detectó inmunorreactividad en células plasmáticas y linfocitos en los septos

alveolares. El porcentaje de células positivas fue significativamente mayor en el TLAB de los casos problema (mediana 1,91%) que en los control (mediana 0,99%) (Gráfico 9 y Tabla 7 a y b).

Gráfico 9: Porcentaje de células IgA⁺ en el TLAB de casos problema/control.

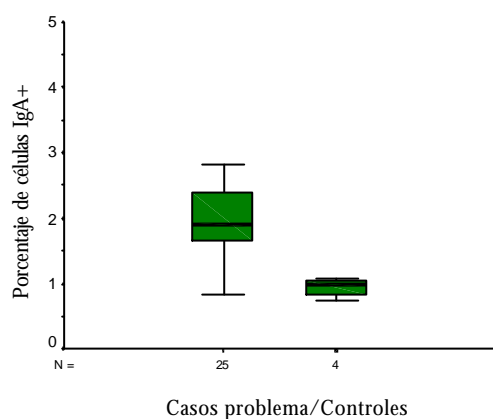
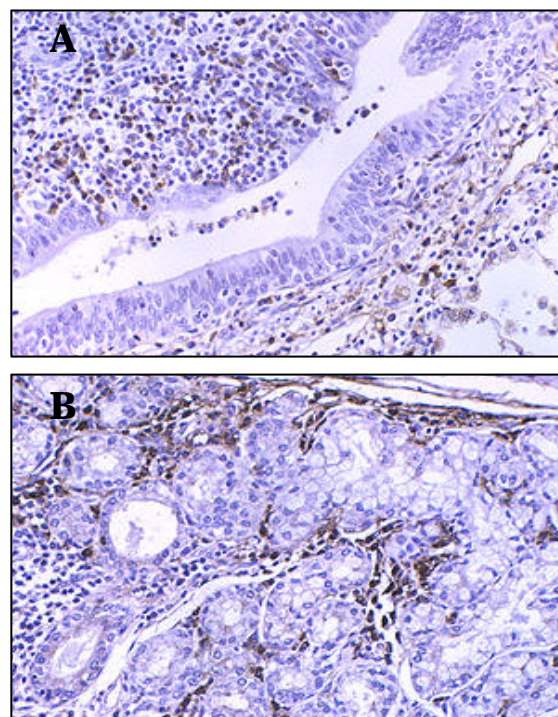


Fig. 35 Distribución de células IgA⁺ en el TLAB y submucosa, caso n°18, **20x** (A) y rodeando las glándulas submucosas de los bronquios, caso n°19, **20x** (B). Método ABC.



2.3. Microbiología

De acuerdo con el criterio de selección planteado en el material y métodos, todas las muestras problema seleccionadas para este estudio fueron positivas al aislamiento de *M. hyopneumoniae* y las utilizadas como control fueron negativas. Dichos resultados fueron contrastados con la técnica de inmunoperoxidasa indirecta sobre papel de nitrocelulosa.

2.4. Estudio ultraestructural

En el pulmón de cerdos con lesiones compatibles con NEP el estudio ultraestructural confirmó los resultados obtenidos mediante IHQ y los casos control negativo no mostraron cambios significativos (Fig. 36).

En las vías respiratorias del pulmón de los casos problema se observó la presencia de microorganismos compatibles con *M. hyopneumoniae* intercalados entre los cilios de las células del epitelio ciliado. En determinadas ocasiones se pudo observar la presencia de estructuras compatibles con pili de adhesión (Fig. 37). Estos datos confirman la inmunorreacción positiva observada mediante IHQ en la misma localización. Además, se observaron cambios epiteliales con vacuolización del citoplasma y pérdida de cilios, estadio previo a la descamación de las células (Fig. 38 A). La presencia de linfocitos intraepiteliales (Fig. 38 B) y la presencia de células plasmáticas en la submucosa de las vías respiratorias (Fig. 38 C) confirmó el infiltrado de distintas subpoblaciones linfocitarias inmunomarcadas con la técnica de IHQ en estas áreas.



Fig. 36 Epitelio pseudoestratificado ciliado de vías respiratorias de un cerdo control. Caso n°29 **1650x**.



Fig. 37 Microorganismos compatibles con *M. hyopneumoniae* (flecha). Estructura compatible con pili de adhesión (cabeza flecha). Caso n°25 **52000x**.

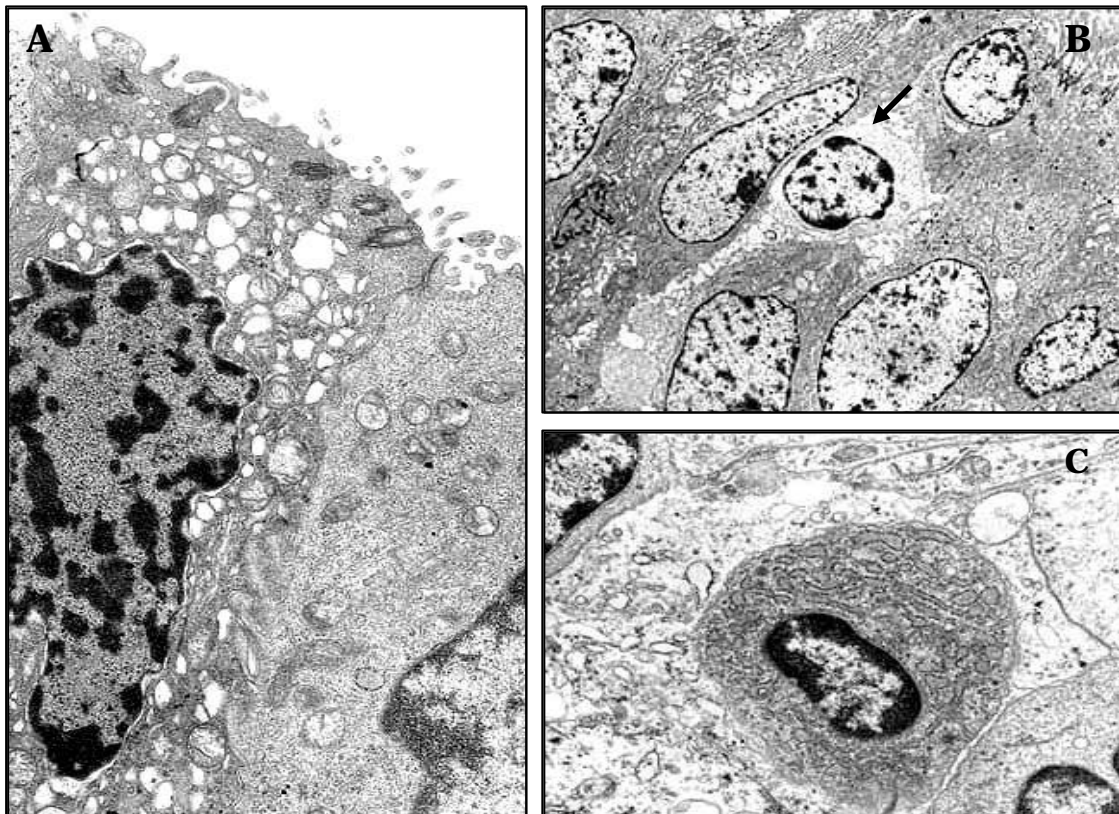
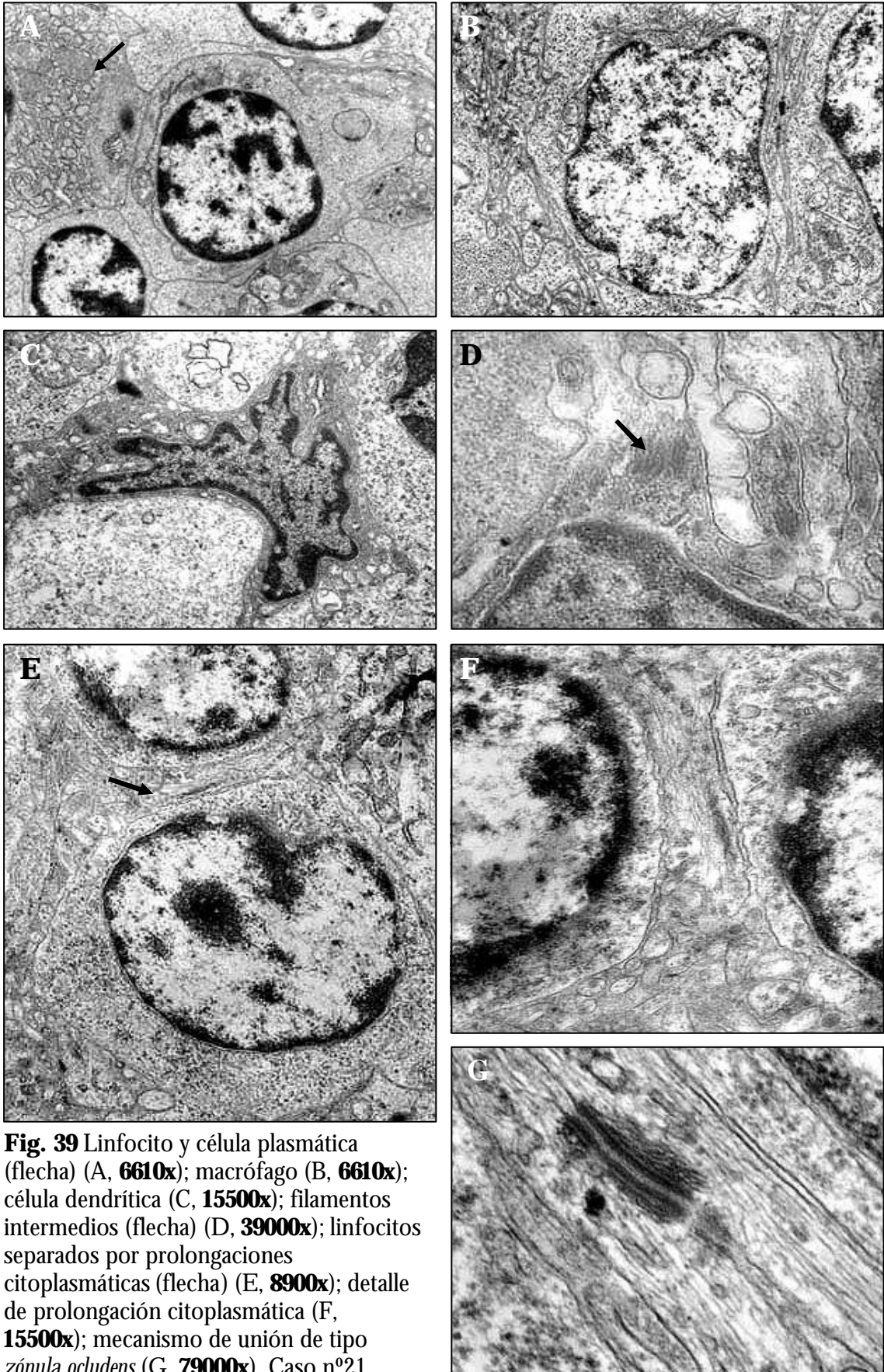


Fig. 38 A: Presencia de vacuolización y pérdida de cilios de una célula ciliada (caso n°25, **6610x**); B: linfocito intraepitelial (flecha) (caso n°21, **2950x**); C: célula plasmática en la submucosa de vías respiratorias de cerdos casos problema (caso n°25, **8900x**).

Las células que componen el TLAB no revelaron cambios ultraestructurales significativos, se observó la presencia de linfocitos (Fig. 39 A), células plasmáticas (Fig. 39), macrófagos (Fig. 39 B), células dendríticas (Fig. 39 C) diferenciadas por la presencia de filamentos intermedios (Fig. 39 D) así como prolongaciones citoplasmáticas separando linfocitos (Fig. 39 E y F), y mecanismos de unión de tipo estrecha o *zonula ocludens* (Fig. 39 G), mitosis (Fig. 40 B) y restos celulares, entre los que destaca un cuerpo apoptótico, fagocitados por un macrófago (Fig. 40 A).



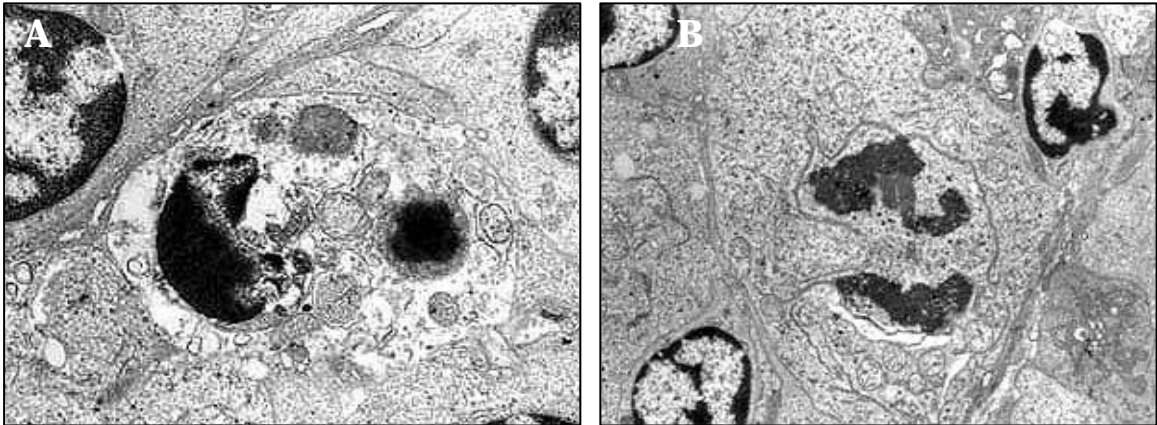


Fig. 40 Restos celulares y un cuerpo apoptótico, caso n°21, **8900x** (A); mitosis en un folículo linfoide, caso n°21, **3900x** (B).

El estudio ultraestructural de los alvéolos reveló, un aumento de neumocitos tipo II, en ocasiones exfoliados en la luz, así como exudados celulares en la luz alveolar compuestos por (Fig. 41 A y B), macrófagos con activación fagocítica (proliferación del equipo lisosomal), linfocitos, plasmocitos y PMN neutrófilos, abundantes restos celulares y sustancia surfactante (Fig. 42 A y B).

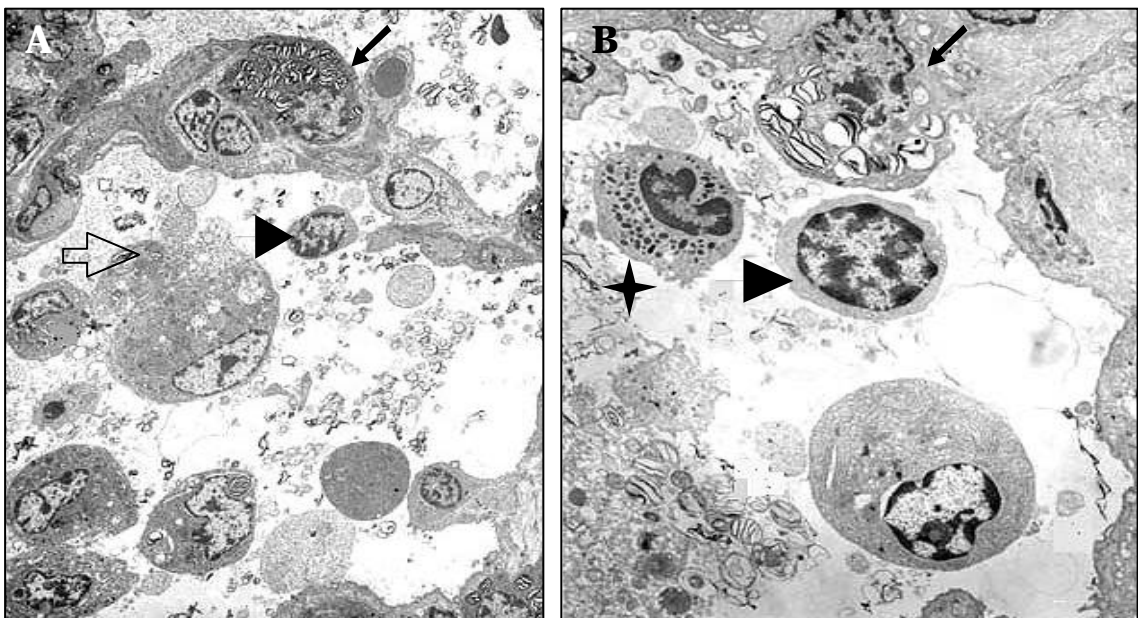


Fig. 41 (A, caso n°23 **1200x** y B, caso n°21 **2950x**): Alvéolos con neumocitos tipo II (flecha), macrófagos alveolares (flecha hueca), linfocito (cabeza flecha), plasmocito, y PMN neutrófilo junto a sustancia surfactante pulmonar en la luz de un alvéolo (estrella) (B).

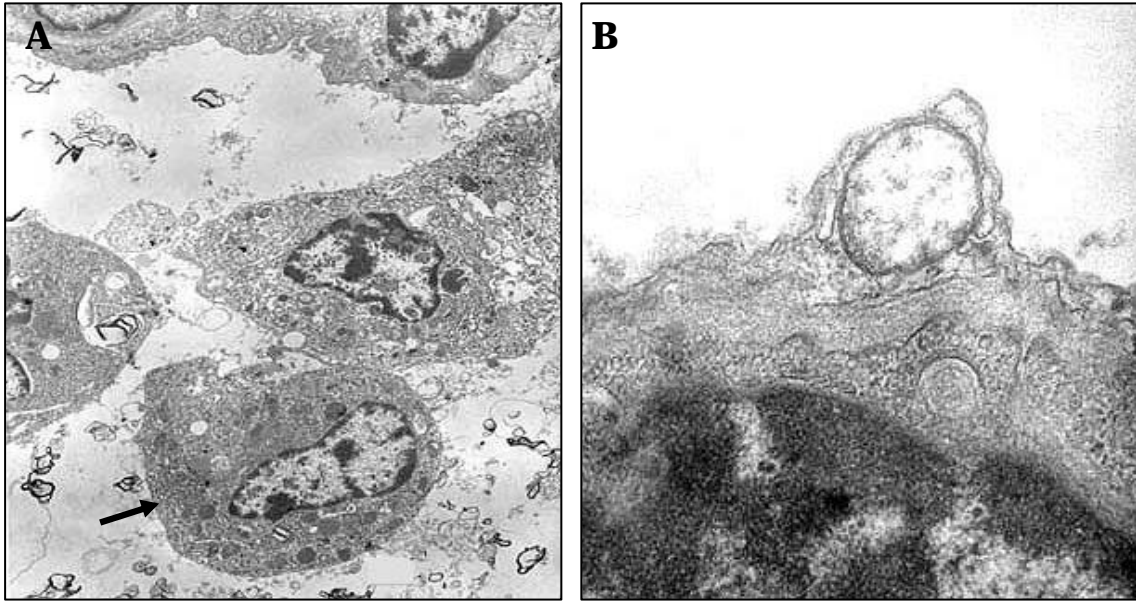


Fig. 42 Proliferación del equipo lisosomal en un macrófago alveolar (flecha) (A, caso nº23 **2950x**); presencia de un microorganismo compatible con *M. hyopneumoniae* en el citoplasma de un neumocito tipo I (B, caso nº23 **21000x**).

DISCUSIÓN

Los micoplasmas son organismos adaptados a las superficies mucosas de los animales a los que infectan. Las principales áreas de actuación corresponden a la mucosa del aparato respiratorio, genitourinario y mamario. Los principales micoplasmas aislados del tracto respiratorio de distintas especies animales, ya sean patógenos primarios, secundarios o comensales se encuentran adheridas al epitelio ciliar donde están adaptados para adherirse al mismo y evadir los mecanismos defensivos inespecíficos y específicos del hospedador. La invasión de partes profundas del parénquima pulmonar es más rara y generalmente asociada a la participación de otros agentes bacterianos y/o a la quiebra del estado inmunológico (**Howard y cols., 1987**). Las enfermedades pulmonares atribuidas a la acción de distintas especies de micoplasmas está adquiriendo una creciente importancia en rumiantes y en ganado porcino debido, en parte, a los sistemas de explotación intensivo y a la implicación sinérgica de distintos agentes bacterianos y/o víricos.

M. bovis es primariamente un agente causal de neumonías en bovinos, siendo un agente de importancia a nivel mundial. Histológicamente, causa bronconeumonía purulenta con hiperplasia linfoide peribronquiolar y focos de necrosis por coagulación rodeados de macrófagos, células plasmáticas y PMN neutrófilos. También se ha aislado en casos de neumonías y mamitis en ganado caprino (**DaMassa y cols., 1992; Ojo y Ikede, 1976**). *M. agalactiae* se ha asociado a casos de neumonía en animales de corta edad, seguido de artritis y queratitis (**Bergonier y cols., 1997**). Las lesiones pleuroneumónicas sólo han sido descritas en algunos casos (**Cottew, 1984**). Bajo las condiciones del actual experimento, *M. agalactiae* y *M. bovis* no indujeron enfermedad respiratoria lo bastante severa para causar la muerte.

Un hallazgo común en las neumonías micoplásmicas en distintas especies animales es el incremento de las células mononucleares en el pulmón, como ocurre durante la infección por *M. pulmonis* en ratones, *M. bovis* en bovinos, *M. gallisepticum* en gallinas y *M. hyopneumoniae* en cerdos (**Fernald, 1979; Howard y cols., 1987**). Esto conduce a la producción de cúmulos peribronquiolares y perivasculares de este tipo de células, muchas de las cuales son capaces de sintetizar anticuerpos (**Cassell y cols., 1974; Gourlay y Howard, 1982; Howard y cols., 1987**) como parte de la respuesta inmune frente a la infección. Los animales inoculados experimentalmente presentaron pequeñas áreas de consolidación en relación a vías respiratorias. Histológicamente, se observaron neumonías broncointersticiales de distinto grado de intensidad. El principal cambio consistió en una hiperplasia linfoide peribronquiolar y perivascular con una moderada a intensa acumulación de linfocitos y, en menor número, de células plasmáticas. Esto causó la oclusión de la luz de algunos bronquiolos y la atelectasia de las regiones alveolares distales al bronquiolo ocluido.

La persistencia de organismos y/o Ags en la superficie mucosa puede ser responsable de la formación de acumulaciones linfoides alrededor de las vías aéreas (**Howard y cols., 1987**). Aunque la severidad de las lesiones producidas bajo condiciones experimentales pudo ser influenciada por el grado de colonización o virulencia (o ambas) de la cepa de micoplasma usada, los cabritos inoculados con *M. agalactiae* o *M. bovis* vía respiratoria mostraron similares acumulaciones de leucocitos. Los cambios fueron más prominentes en el pulmón de los animales sacrificados a los 21 días posteriores a la infección lo que apoyaría esta afirmación debido a la mayor hiperplasia linfoide asociada a la estimulación antigénica durante un período de tiempo más largo.

La alveolitis con presencia de células inflamatorias en alvéolos y la acumulación peribronquiolar de células mononucleares son típicas de una neumonía broncointersticial **(Gourlay y Howard, 1982)** característica de varias micoplasmosis respiratorias. En nuestro caso, los septos alveolares aparecieron engrosados por la acumulación de macrófagos, linfocitos de tamaño variable y células plasmáticas. El exudado presente dentro de los alvéolos consistió predominantemente en macrófagos y un pequeño número de linfocitos, células plasmáticas y PMN neutrófilos.

En nuestro estudio no observamos diferencias significativas en las lesiones desarrolladas en los animales vacunados vía parenteral con *M. agalactiae* o *M. bovis* previo a la infección experimental. Estos datos sugirieron que la vacunación vía parenteral por sí sola no ejerce un papel protector significativo en el aparato respiratorio durante estas infecciones. Los resultados obtenidos apoyan los obtenidos por otros investigadores en el control y erradicación de neumonías en terneros producidas por *M. bovis*, en los que se concluye la necesidad de combinar la vacunación parenteral y la vía intranasal para asegurar un mayor grado de protección del tracto respiratorio frente a la infección **(Stott y cols., 1987)**.

M. hyopneumoniae es el agente etiológico primario de la NEP **(Maré y Switzer, 1966; Switzer, 1967)**. Esta es una enfermedad muy contagiosa que se manifiesta clínicamente por signos respiratorios moderados y por una disminución en el índice de crecimiento y engorde. Histopatológicamente, la lesión se corresponde con una neumonía broncointersticial crónica. En la mayoría de los casos, una vez superada la fase aguda y salvo complicaciones bacterianas secundarias o afección de amplias áreas del parénquima pulmonar, el proceso permanece latente no apareciendo signos respiratorios llamativos.

Los cerdos de matadero con lesiones indicativas de NEP mostraron en el examen macro y microscópico lesiones neumónicas características de NEP previamente descritas **(Strasser y cols., 1992, Dungworth, 1993, Maes y cols., 1996)**. Se observó neumonía broncointersticial con linfoproliferación peribronquial, peribronquiolar y perivascular. Los centros germinales eran muy amplios en algunas ocasiones y hacían prominencia sobre la muscular de la mucosa, ocasionando un estrechamiento de la luz de las vías aéreas y atelectasia y/o enfisema del parénquima pulmonar correspondiente. En el epitelio de las vías aéreas se observó pérdida de cilios y exfoliación de células ciliadas, hiperplasia de células caliciformes en bronquios, bronquiolos y de las glándulas submucosas de los bronquios.

Otro componente de la neumonía broncointersticial en la NEP es la alveolitis que se observa especialmente alrededor de las vías aéreas **(Strasser y cols., 1992, Dungworth, 1993, Maes y cols., 1996)**. En los cerdos de nuestro estudio se observó un engrosamiento de los septos interalveolares, especialmente alrededor de las vías aéreas, causado por la presencia de macrófagos, linfocitos de variado tamaño y escaso número de células plasmáticas. En la luz de los alvéolos se observó la presencia de exudado compuesto fundamentalmente por macrófagos y escaso número de células plasmáticas, linfocitos y PMN neutrófilos. La pared de los alvéolos afectados presentó una moderada hiperplasia de neumocitos tipo II. El estudio ultraestructural de los alvéolos reveló, un aumento de neumocitos tipo II, en ocasiones exfoliados en la luz, así como exudados celulares en la luz alveolar compuestos por macrófagos con activación fagocítica (proliferación del equipo lisosomal), linfocitos, plasmocitos y PMN neutrófilos, abundantes restos celulares y sustancia surfactante.

A pesar de que los anticuerpos poli y monoclonales dirigidos frente a Ags de micoplasmas se consideran una herramienta potencial de diagnóstico potencial (**Howard y cols., 1987; Adegboye y cols. 1995a; Rodríguez y cols., 1996a**), los anticuerpos monoclonal 5A10 y policlonal 295, usados en este estudio, no pudieron demostrar Ags de *M. agalactiae* o *M. bovis* en el tejido pulmonar, aunque fue demostrada la infección por métodos microbiológicos. Ultraestructuralmente se observó la presencia de microorganismos compatibles con micoplasmas adheridos a la superficie epitelial. La menor sensibilidad de los métodos inmunohistoquímicos en nuestros resultados pudo deberse a la escasa cantidad de organismos presentes en la superficie epitelial, probablemente debido a la eliminación de los mismos por células fagocíticas, movimiento mucociliar o por la acción de la inmunidad de base humoral y/o celular. Esta misma técnica IHQ se ha utilizado en el diagnóstico de neumonías agudas en terneros infectados con *M. bovis* y en casos de mamitis del ganado caprino infectado con *M. agalactiae* (**Rodríguez y cols., 1996b**).

Cuando se utilizó el anticuerpo policlonal anti-*M. hyopneumoniae* los cerdos incluidos en el estudio manifestaron una reacción de tipo granular, presente en el ápex de los cilios o en el espacio interciliar de bronquios y bronquiolos. Estos datos son similares a los obtenidos por **Doster y cols.** (1988), **Andrada y cols.** (1998a y 1998b) mediante técnicas de inmunoperoxidasa indirecta e IHQ usando anticuerpos monoclonales y policlonales respectivamente. Además, **Kwon y Chae** (1999) detectaron DNA de *M. hyopneumoniae* mediante hibridación “*in situ*” en el epitelio de bronquios y bronquiolos y, en menor medida, en macrófagos alveolares e intersticiales. Lo expresado anteriormente es de mayor importancia debido a que la adherencia a las células ciliadas de la tráquea,

bronquios y bronquiolos es el prerrequisito para la iniciación de la NEP y sólo algunos micoplasmas profundizan hasta los alvéolos. *M. hyopneumoniae* no penetra el epitelio de las vías aéreas, se sitúa en el ápex de los cilios o en el espacio interciliar (**Blanchard y cols., 1992**), hechos corroborados en este estudio. Finalmente, cuando se realizó el estudio ultraestructural se confirmó la presencia en las vías respiratorias del pulmón de los casos problema de microorganismos compatibles con *M. hyopneumoniae* intercalados entre los cilios de las células epiteliales.

Zielinski y Ross (1993) demostraron que es necesaria la existencia de receptores de *M. hyopneumoniae* para la adherencia a las células ciliadas del epitelio respiratorio. **DeBey y Ross** (1994) y **Young y cols.** (2000) evaluaron “*in vitro*” las interacciones que se producen entre *M. hyopneumoniae* y las células ciliadas del epitelio de anillos traqueales, observando que se producía ciliostasis y pérdida de los cilios cuando utilizaron cepas con escaso número de pases en cultivo y alta virulencia. Cuando incorporaron un filtro de 0,1 µm, el daño del epitelio no se produjo, demostrando que el daño celular y la ciliostasis se produce sólo cuando *M. hyopneumoniae* se adhiere a las células. Cuando se realizó el estudio ultraestructural se pudo observar la presencia de estructuras compatibles con pili de adhesión. Recientemente se ha purificado una proteína de 97 kDa de *M. hyopneumoniae* que los estudios moleculares han demostrado su comportamiento como adhesina. Actualmente se conocen 6 adhesinas más con capacidad para facilitar la interrelación entre *M. hyopneumoniae* y el epitelio de las vías respiratorias (**Ross y Young, 1993; Zhang y cols., 1995; Hsu y cols., 1997; Wilton y cols., 1998**).

A medida que la infección progresa, hay una reducción en la actividad ciliar, una pérdida gradual de los cilios, formación de microcolonias, finalmente se observa una pérdida total de los cilios con descamación y exfoliación de las células epiteliales **(Maes y cols., 1996)**. Una proteína citotóxica y otras sustancias nocivas tales como peróxido de hidrógeno pueden estar involucrados en la destrucción de los cilios y células epiteliales. La presencia de mucus en las vías aéreas puede ser explicada por la reducción de la actividad ciliar y la hipersecreción de las células caliciformes y glándulas mucosas **(DeBey y cols., 1992)**. Esto concuerda con lo observado ultraestructuralmente, cambios epiteliales con vacuolización del citoplasma y pérdida de cilios, todos ellos estadios previos a la descamación de las células.

Los estudios del sistema inmune se han incrementado durante los últimos años, en particular las metodologías de purificación protéica y el uso de anticuerpos monoclonales desarrollados frente a moléculas de la superficie de los leucocitos, ha generado información de las poblaciones leucocitarias y sus interacciones. Estos anticuerpos monoclonales específicos han cambiado la forma de estudiar el sistema inmune, como resultado estas células pueden ser clasificadas, aisladas y estudiadas por sus propiedades funcionales **(Lunney, 1993; Saalmüller, 1996)**. El conocimiento de las poblaciones del sistema inmune ha facilitado la realización de estudios para la comprensión de la influencia de los agentes infecciosos en el sistema inmune y las interacciones de dichos agentes con las diferentes poblaciones leucocitarias. El conocimiento de las interacciones entre las partes inmunógenas de los agentes infecciosos y las poblaciones del sistema inmune es importante para el desarrollo de nuevas vacunas y estudios de la patogenia de las mismas **(Saalmüller, 1998)**.

Aunque no se considera como un órgano linfoide, un gran número de células inmunológicamente activas se encuentran presentes en el pulmón, esto provee una defensa primaria del hospedador frente a los patógenos inhalados. Una substancial proporción de células inmunológicamente activas, incluyendo macrófagos, linfocitos B y T se encuentran distribuidos a través del parénquima pulmonar. El pulmón puede ser dividido en distintos compartimentos linfoides, el parénquima pulmonar, los espacios broncoalveolares, la lámina propia, los espacios vasculares y el TLAB (**Pabst, 1995**). El TLAB se ha identificado en la mayoría de los mamíferos incluyendo los bovinos, conejos, ratones, cerdos y humanos, encontrándose asociado a los bronquios y bronquiolos a lo largo del tracto respiratorio. Se cree que se encuentra involucrado en el muestreo de antígenos que entran al pulmón porque se ha descrito un epitelio modificado en su superficie, después del reconocimiento inicial de los antígenos los macrófagos migran hacia los ganglios linfáticos regionales donde se inician las respuestas inmunes. Existe poca información referente a la reactividad del sistema inmune celular del pulmón en el porcino y caprino frente a los antígenos infecciosos.

Ha sido motivo de controversia durante mucho tiempo el papel de la hiperplasia linfoide del TLAB en la respuesta frente los micoplasmas. En el caso de *M. hyopneumoniae* se postuló que la presencia de una proteína mitogénica localizada en la membrana del microorganismo sería la responsable de la masiva hiperplasia linfoide alrededor de las vías aéreas y vasos sanguíneos (**Meisser y Ross, 1991**). También se ha investigado la supresión en la respuesta inmune humoral causada por la reducción en la actividad de los linfocitos, la inhibición de la inmunidad celular por la disminución de la fagocitosis por parte de los macrófagos y el aumento de PGE₂ presente en los lavados bronquiales la cual

reduce la actividad microbicida de los PMN. Estos efectos supresores son más pronunciados en las etapas tempranas de la infección pero pueden continuar durante varias semanas (**Gourlay y Howard, 1982; Caruso y Ross, 1990; Asai y cols., 1996; Maes y cols., 1996**).

En todo caso, se necesita la interacción de tres células para que ocurra una respuesta inmunitaria efectiva: una célula presentadora de Ag, un linfocito T efector (la célula que en realidad regula la respuesta) y un linfocito Th CD4⁺. Las células efectoras pueden ser linfocitos B, si se dispara la formación de anticuerpos, o linfocito Tc CD8⁺, si se dispara la inmunidad mediada por células. Aunque en el caso especial de los linfocitos B pueden reconocer el Ag en su forma nativa a través de sus Igs de superficie. Posteriormente el Ag es internalizado, fragmentado, asociado al MHC II y expresado en la membrana del propio linfocito B, si se encuentra el estímulo adecuado de un linfocito Th CD4⁺, se podrá iniciar la producción de Igs (**Sánchez-Vizcaíno, 2000; Tizard, 2000**).

A continuación discutiremos los cambios observados durante el presente estudio en las principales células que participan en el sistema inmune pulmonar dentro del TLAB (macrófagos, células presentadoras de Ags, linfocitos T y B), de los cabritos inoculados experimentalmente con *M. agalactiae* y *M. bovis* o de los cerdos procedentes de matadero con lesiones típicas de NEP.

La célula fagocitaria predominante que infiltró el pulmón después de la infección por *M. agalactiae* o *M. bovis* en los cabritos de este estudio fue el macrófago, observación que fue confirmada por el uso del anticuerpo policlonal anti-lisozima. Esto concuerda con

la descripción de este tipo de célula como mecanismo efector importante y primario durante las infecciones por micoplasmas (**Howard y cols., 1987; Rodríguez y cols., 1996a**).

Los macrófagos poseen receptores para la fracción Fc de la IgG y para diversos factores del complemento. Intervienen en la respuesta inmune captando el Ag, procesándolo y presentándolo a los linfocitos T específicos. Además liberan diversos factores solubles (IL-1, IL-6, TNF) que modulan esta respuesta inmune. Por último, median también funciones efectoras, como la lisis de microorganismos y de células tumorales de forma directa o a través de sus receptores para Igs y factores del complemento (**Suter, 1990; Álvarez y cols., 1997**). La síntesis de IL-1 y TNF- α puede dar lugar también a la secreción de las proteínas de fase aguda, estimulando la producción de prostaglandinas y enzimas proteolíticas, y realzando la infiltración celular por quimiotaxis y mitosis. La IL-1 también desempeña un papel importante en las respuestas inmunes específicas de Ag, actuando como señal temprana en la activación de los linfocitos T, y participando en la red de citocinas que regula la diferenciación de los linfocitos B (**Mossman y Coffman, 1989; Nash y cols., 1992**).

Los macrófagos son las células presentadoras de Ag mejor estudiadas, pero no son las únicas, las células dendríticas y los linfocitos B, juegan un papel importante. Aunque todos los macrófagos fagocitan Ags, sólo algunos pueden procesar Ags exógenos de manera que puedan provocar una respuesta inmunitaria adecuada. El MHC II es una proteína de transporte que fija fragmentos de Ag y los conducen hasta la superficie celular, una vez en ella, presenta el Ag a los linfocitos Th, estas células reconocen el Ag

sólo cuando está unido físicamente a un Ag MHC II. Pero la presentación de un Ag unido al MHC II es insuficiente para activar una respuesta inmunitaria, la célula T debe ser expuesta a proteínas “coestimuladoras” secretadas por el macrófago, entre las más importantes se encuentra la IL-1 (**Marrack y Kappler, 1986; Suter, 1990; Álvarez y cols., 1997; Banchereau y Steinman, 1998; Howard y cols., 1999**).

Las citocinas juegan un papel dominante en la regulación de la capacidad funcional del macrófago durante respuestas inmunes específicas de Ag y no específicas, en primer lugar como moléculas que influyen directamente en el nivel funcional de los macrófagos, y en segundo lugar, como las moléculas efectoras de macrófagos activados (**Cao y cols., 1989**). Las citocinas pueden regular también la expresión del Ag de MHC II en los macrófagos (**Nash y cols., 1992**) y, puesto que los receptores de los linfocitos T reconocen el Ag en el contexto del MHC I o II, esta activación de los receptores de macrófagos tiene implicaciones importantes para el comienzo y desarrollo de la respuesta inmune.

En el caso de los cabritos inoculados, el anticuerpo anti-MHC II marcó células de morfología irregular con prolongaciones citoplasmáticas que se encontraron entre linfocitos del TLAB y debajo de la membrana basal del epitelio bronquial y bronquiolar. El porcentaje de células positivas fue significativamente mayor en los animales inoculados respecto de los controles. Tal activación pudo participar en la regulación de la señal de células presentadoras de Ags para el desarrollo de la inmunidad humoral y celular.

Por otra parte, en el estudio de cerdos con lesiones características de NEP el anticuerpo monoclonal anti-MHC II marcó células de morfología irregular con

prolongaciones citoplasmáticas y núcleo relativamente grande respecto de los linfocitos que los rodean. En el TLAB se las observó principalmente dentro de los centros germinales y debajo de la membrana basal de los epitelios. Además se encontró gran cantidad de células de citoplasma abundante y núcleo arriñonado compatibles con macrófagos alveolares distribuidos principalmente dentro de la luz de los alvéolos y, en menor cantidad, en los septos interalveolares. Aunque no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas del TLAB entre casos problema y control. Este hecho pudo deberse a la notable hiperplasia observada en el TLAB de los animales problema, lo cual determinó una disminución relativa de las células dendríticas frente a las poblaciones linfoides.

La lisozima es un enzima que se encuentra en altas concentraciones en los lisosomas de los macrófagos y PMN neutrófilos, en el aparato respiratorio se encuentra en el moco bronquial, entre otras actividades escinde peptidoglicanos de la pared de las bacterias y es una potente opsonina (**Tizard, 2000**); esta enzima constituye un marcador para determinar mediante IHQ la presencia de macrófagos y PMN neutrófilos. En el TLAB de los cabritos y en los cerdos estudiados, la inmunorreactividad frente al anticuerpo policlonal anti-lisozima se observó en el citoplasma de los macrófagos principalmente localizados en las áreas perifoliculares del TLAB. Asimismo, se observaron numerosos macrófagos inmunorreactivos en los espacios alveolares y en la luz de los bronquiolos. En los cabritos, algunos PMN neutrófilos intravasculares resultaron en ocasiones inmunomarcados. Aunque no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas con este anticuerpo en el TLAB entre animales infectados y controles, el aumento de éstas células en áreas perifoliculares en bronquiolos y en

alvéolos indican el papel de los macrófagos y, en menor medida, de los PMN neutrófilos en la fagocitosis y eliminación de micoplasmas durante la infección respiratoria.

Las células dendríticas se cree que derivan de los monocitos sanguíneos, son células mononucleares con un núcleo arriñonado y citoplasma claro; se localizan en todos los tejidos, pero se concentran de manera especial en los órganos linfoides. Forman una extensa membrana interdigitante compuesta de protuberancias citoplasmáticas (dendritas), que permite un fuerte atrapamiento del Ag (mucho más eficientemente que el macrófago). Funcionan de dos formas, en un animal que no tuvo contacto previo con el Ag, simplemente proporcionan una superficie sobre la cual puede ser presentado el Ag junto al MHC II y en los animales con complejos Ag-anticuerpo circulantes, las células dendríticas son capaces de retener al Ag en su superficie durante más de tres meses **(Algarra y Garrido, 1998; Banchereau y Steinman, 1998; Howard y cols., 1999)**. En el caso de los cerdos se observó en el TLAB la presencia de células dendríticas diferenciadas por la presencia de filamentos intermedios así como prolongaciones citoplasmáticas separando linfocitos, y mecanismos de unión de tipo estrecha o *zonula ocludens*.

En los cabritos inoculados y en los cerdos procedentes de matadero con NEP, el anticuerpo policlonal anti-S-100 detectó en el TLAB una población de morfología similar, con presencia de inmunorreactividad difusa en el núcleo y citoplasma de células con el citoplasma estrellado y largos procesos citoplasmáticos (células dendríticas). Se las encontró distribuidas especialmente dentro de los centros germinales y en la periferia de los folículos linfoides donde se observó una moderada cantidad de linfocitos positivos.

Los linfocitos T, a diferencia de los B, que reconocen el Ag en su conformación nativa a través de las Igs de superficie, reconocen el Ag una vez procesado y asociado a los Ags propios del MHC. Pueden dividirse en Th, Tc y Ts, de acuerdo con su función y la expresión de ciertas moléculas de superficie celular (Ags de diferenciación) **(Marrack y Kappler, 1986; Suter, 1990; Álvarez y cols., 1997; Sánchez-Vizcaíno, 2000)**.

Todos los timocitos expresan el Ag CD2, que es un péptido cuya función es la de molécula de adhesión primaria que contribuye a potenciar la afinidad de unión del linfocito T a las células presentadoras de Ag. Además es utilizado para diferenciar linfocitos T de los B, dado que en cerdos produce la adhesión de hematíes de oveja formando rosetas **(Saalmüller y Bryant, 1994; Arnaiz y cols., 1998; Sánchez-Vizcaíno, 2000)**. Con el anticuerpo monoclonal anti-CD2 se observó, en los cerdos, inmunorreactividad en células mononucleares con escaso citoplasma (linfocitos) distribuidos especialmente en las áreas perifoliculares del TLAB y, en menor cantidad, dentro de los centros germinativos. En los septos alveolares se detectó una escasa a moderada cantidad de células positivas, distribuidas por el parénquima que fueron más numerosas en las porciones más próximas a las vías aéreas. Las vías aéreas mostraron escasa cantidad de células positivas subepiteliales e intraepiteliales. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas entre casos problema y control. Este hecho puede indicar que aunque se produzca un incremento significativo de las poblaciones linfoideas en el TLAB, la proporción de células T respecto a las demás poblaciones del TLAB se mantiene.

La mayoría de los linfocitos T periféricos son CD3⁺, es el término colectivo que se da a un complejo de siete cadenas peptídicas que forman una parte integral del complejo

TcR y está presente en todos los linfocitos maduros y cuya función es transmitir la señal de activación a través de la membrana a causa del reconocimiento antigénico. Además, los linfocitos T portan otros receptores asociados al complejo CD3 que permiten diferenciarlos entre dos poblaciones principales: CD4 y CD8 (**Suter, 1990; Amaiz y cols., 1998; Tizard, 2000**). Estudios realizados por **Ramos-Vara** (1992 y 1994) demostraron, mediante IHQ sobre tejidos fijados en formol, que un anticuerpo policlonal anti-CD3 puede reconocer específicamente a poblaciones linfoides de tipo T de diferentes especies animales, entre ellas la caprina y porcina.

El papel de la inmunidad mediada por células en los animales con neumonías micoplásmicas es ambiguo. En ratones, hamsters y cerdos, la supresión de la inmunidad mediante timectomía o la inyección de un suero anti-timocitos antes de la infección con micoplasmas, capaces de producir neumonías, dió como resultado el desarrollo de lesiones microscópicas menos severas que en los animales inmunocompetentes (**Denny y cols., 1972; Tajima y cols., 1984; Taylor y cols., 1974**), aunque la cantidad de micoplasmas presentes en el tracto respiratorio fue mayor en los animales inmunosuprimidos (**Denny y cols., 1972; Tajima y cols., 1984; Taylor y cols., 1974**) y la diseminación hacia otros órganos fue más frecuente en los ratones inmunosuprimidos (**Denny y cols., 1972**).

En los cabritos, con el anticuerpo policlonal anti-CD3 se detectó una intensa inmunorreactividad en linfocitos del TLAB localizados principalmente en áreas perifoliculares y también en linfocitos infiltrados en los septos alveolares. La diferencia en porcentaje de células positivas entre inoculados y controles en el TLAB fue estadísticamente significativa por lo tanto, en la hiperplasia linforreticular, el tipo celular

más comprometido fue el linfocito T CD3⁺, lo que indica un importante papel de la inmunidad de base celular. En los cerdos con el mismo anticuerpo se detectó similar inmunorreactividad en linfocitos localizados en el TLAB, principalmente en las áreas perifoliculares, en las que también se observaron linfocitos infiltrados en los septos alveolares, más numerosos en las áreas del parénquima circundante a los bronquios.

El CD4 es una única cadena proteica de superficie celular que se encuentra asociada al TcR y el CD3, característica de los Th. En los linfocitos T, CD4 es la molécula que se une a las moléculas MHC II en la superficie de las células presentadoras de Ag **(Suter, 1990; Saalmüller y Bryant, 1994; Arnaiz y cols., 1998)**. Center y cols. en **1996**, observaron que la IL-16 es el ligando para el CD4, este hecho puede ayudar a un mayor conocimiento de la actividad de este receptor. En cambio, CD8 consiste de dos cadenas peptídicas de superficie celular unidas por puentes disulfuro que forman un solo receptor asociado al TcR y al CD3, y se consideran linfocitos T con función **supresora/citotóxica**. Estos se unen a los Ags MHC clase I, y hacen posible que los linfocitos T se unan a casi todas las demás células nucleadas del organismo. También las células NK expresan una escasa cantidad de CD8 **(Suter, 1990; Saalmüller y Bryant, 1994; Saalmüller y cols., 1994; Arnaiz y cols., 1998)**.

En los cabritos infectados experimentalmente, las células CD4⁺ fueron significativamente más numerosas que las CD8⁺ y se localizaron principalmente en las áreas perifoliculares del TLAB; en el caso de las células CD8⁺ se localizaron debajo del epitelio de los bronquiolos, intraepiteliales distribuidas de forma difusa en los folículos del TLAB. El resultando fue una relación CD4/CD8 mayor a 1 en todos los cabritos inoculados, con una diferencia significativa entre inoculados y controles.

Por otra parte, en los cerdos procedentes de matadero con lesiones de NEP la subpoblación CD4⁺ fue significativamente más numerosa que la inmunomarcada con el anticuerpo monoclonal anti-CD8⁺ en todos los casos problema, resultando la mediana de la relación CD4/CD8 de los casos problema de 4,55:1 siendo el valor menor de 2,90:1. Caso contrario ocurrió en los casos control donde la mediana de la relación CD4/CD8 fue 0,46. Los linfocitos CD4⁺ se localizaron principalmente en las áreas perifoliculares y en los centros germinales del TLAB. Los linfocitos CD8⁺ se localizaron en las áreas perifoliculares, distribuidos difusamente en los folículos, así como en zonas subepiteliales e intraepiteliales de bronquios y bronquiolos.

Ultraestructuralmente se confirmó la presencia de linfocitos intraepiteliales y la presencia de células plasmáticas en la submucosa de las vías respiratorias. Se observó escasa cantidad de linfocitos infiltrando los septos alveolares.

La expresión de Ags CD4 ó CD8 guarda relación con el reconocimiento del Ag en asociación con los Ags MHC II ó I respectivamente y se pueden distinguir dos subpoblaciones de linfocitos T con funciones reguladoras o efectoras distintas. En general, los linfocitos CD4⁺ cooperan (Th) con el resto de las células del sistema inmune (linfocitos T, B y macrófagos) para facilitar su respuesta y son los responsables de las reacciones de hipersensibilidad retardada, mientras que los linfocitos CD8⁺ se encargan de la actividad citotóxica (Tc) y supresora (Ts), de manera que cuando desarrollan su actividad Tc al interactuar con el MHC I son capaces de actuar contra cualquier célula del organismo **(Mínguez y cols., 1988; Suter, 1990; Álvarez y cols., 1997).**

Los linfocitos T CD4⁺ representaron la subpoblación predominante responsable de la hiperplasia observada en el TLAB, estas células T son capaces de activar macrófagos, dando por resultado una capacidad de destruir micoplasmas de forma más eficiente (**Nash y cols., 1992**). Estos resultados están en concordancia con los hallazgos observados en otras infecciones respiratorias como cerdos infectados con *P. multocida* (**Berndt y Muller, 1995**) y bovinos con el Virus Respiratorio Sincitial Bovino (**Thomas y cols., 1996**) donde se encontraron altas concentraciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ activados en las regiones peribronquiales y perivasculares del pulmón. Los Th producen diferentes citocinas, esto determina que sean divididos en dos grupos principales, los Th1 y Th2. Los Th1 producen principalmente IL-2 e IFN- γ , la IL-2 activa principalmente a los linfocitos B, células NK y macrófagos; y el IFN- γ , inhibe la actividad de los Th2, estimula a los Th1, activa las células NK y macrófagos. Los Th2 producen principalmente IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. La IL-4 estimula el crecimiento y diferenciación de linfocitos B; la IL-5, estimula el crecimiento de los linfocitos B y eosinófilos; la IL-9 es un factor de crecimiento de linfocitos T; la IL-10 inhibe a los Th1 y suprime la funcionalidad de los macrófagos; y la IL-13, estimula el crecimiento de los linfocitos B e inhibe a los macrófagos. Pero además de las poblaciones anteriormente descritas existe otro Th, el Th0 el cual secreta una mezcla de citocinas que es representativa de ambos, Th1 y Th2. Estas células pueden ser precursores de ambos o células que se encuentran en transición entre ambas poblaciones. En etapas tempranas del proceso inflamatorio existe una población mixta de Th0, Th1 y Th2; pero si el Ag persiste se produce una polarización de la población hacia Th1 o Th2 (**Domínguez y Alonso, 1991; Brown y cols., 1994; Murtaugh, 1994; Banchereau y Steinman, 1998; Rissoan y cols., 1999**). Es probable

que los linfocitos Th1 CD4⁺, con la producción de citocinas tales como IFN- γ , desempeñen un papel importante en la eliminación de los micoplasmas del pulmón.

Un Tc CD8⁺ activado puede migrar de los órganos linfoides para unirse a la célula blanco que presente un Ag unido al MHC I y provocar su apoptosis mediante la acción de proteínas denominadas perforinas, que al polimerizarse pueden insertarse en las membranas de las células blanco y producir la lisis celular **(Carter y Dutton, 1995)** y granulinas que reducen la viabilidad de bacterias, hongos y parásitos “*in vitro*” mediante una alteración de la integridad de la membrana **(Stenger y cols., 1998)**. Se han propuesto un gran número de factores que colaboran en los mecanismos por los que los monocitos son capaces de matar microorganismos, se incluye la generación de óxido nítrico y la producción de radicales libres de oxígeno **(Tizard, 2000)**. Los linfocitos T CD8⁺ (memoria) se encuentran programados para responder rápidamente sin tener que realizar una expansión clonal y diferenciación, y reaccionan secretando principalmente IFN- γ e IL-2 en el caso de una estimulación antigénica **(Cho y cols., 1999)**. La inmunidad celular, mediada por linfocitos T, tiene dos efectos principales, aumentar la actividad fagocítica y citotóxica de macrófagos e iniciar la respuesta inflamatoria crónica.

En los porcinos existe un alto porcentaje de la población de linfocitos de sangre periférica que son CD4⁺ CD8⁺ (10-60%), aunque en las placas de Peyer se identifica una menor proporción (10% aproximadamente), al igual que en los folículos linfoides peribronquiales. Se sabe relativamente poco de esta población de linfocitos, aunque se conoce que aumentan con la edad del animal, son linfocitos maduros que expresan el MHC II y por lo tanto, son potencialmente células presentadoras de Ags. Hay muchas

evidencias que indican que pueden representar una población de linfocitos CD4 que han adquirido el CD8 después de una exposición antigénica. Se cree que son linfocitos de memoria debido a que responden más rápidamente que otros linfocitos al estímulo antigénico y se piensa que después de la estimulación antigénica en las mucosas migrarían por la circulación linfática hacia otros tejidos (**Pescovitz y cols., 1994; Thome y cols., 1994; Zuckermann y Gaskins, 1996; Zuckermann y Husmann, 1996; Davis y Hamilton, 1998; Zuckermann, 1999**).

La población doble positiva del estudio no se consideró significativa. Así, la suma de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ del TLAB prácticamente constituía la totalidad de linfocitos T (representado por linfocitos CD3⁺). Sin embargo para determinar el papel exacto de esta población doble positiva, sería necesario realizar cortes seriados y/o dobles marcajes con diferentes anticuerpos sobre una misma célula. En las muestras estudiadas no se observó un porcentaje significativo de linfocitos dobles positivos, tanto en los casos problema como en los control.

En este estudio se observó que los linfocitos TcR γ - δ del TLAB fueron escasos en los cabritos y aparecieron íntimamente asociados a la lámina propia de los bronquiolos. Los linfocitos con TcR γ - δ han sido identificados, en un principio, sólo en los rumiantes con alta proporción de los linfocitos T circulantes CD4⁻ CD8⁻ (**Clavers y cols., 1990**). En un trabajo realizado por Caro y cols. (**1998**) observaron en cabras de diferentes edades que el porcentaje de linfocitos TcR γ - δ disminuía con la edad (desde 20,6%=1 semana de edad, hasta 3,8%=3 meses de edad) en concordancia con lo observado en rumiantes por **Wyatt y cols.** (1994). Algunos autores relacionaron tales disminuciones con la capacidad

funcional de esta población de brindar una inmunidad celular temprana a los animales jóvenes que no poseen todavía un sistema inmunitario maduro de linfocitos TcR α - β (**Hein y Mackay, 1991**). Estos linfocitos se localizan preferentemente en piel e intestino, aunque se han observado en el bazo, nódulos linfáticos, TLAB, etc. (**Bonneville y cols., 1988; Itohara y cols., 1990; Carr y cols., 1994; Binns, 1994; Thome y cols., 1994; Mathy y cols., 1997; Caro y cols., 1998**). En nuestros resultados detectamos una población escasa, pero constante, de células inmunomarcadas frente a este antígeno. Estos resultados concuerdan con los referenciados en rumiantes jóvenes pudiendo en estas edades con falta de desarrollo de un sistema inmune, tener un papel de primera línea de defensa frente a antígenos absorbidos al estar localizados a nivel subepitelial.

Por último, los mecanismos de defensa de tipo inmunitarios en la zona respiratoria incluyen la inmunidad humoral, que tiene tres efectos principales, actividades biológicas mediadas por anticuerpos específicos, aumentar los mecanismos de fagocitosis mediada por anticuerpos e iniciación de la respuesta inflamatoria (**Huang y cols., 1990; Busse, 1991; Pabst y Binns, 1994; Tizard, 2000**).

Desde un punto de vista morfológico, los linfocitos B son indistinguibles de los T, ambos son células de tamaño pequeño (7-9 μ m) con un núcleo voluminoso, de cromatina condensada y escaso citoplasma. Sin embargo, existen diferentes marcadores que permiten diferenciar los linfocitos T de los B, el más conocido y utilizado es la inmunoglobulina de membrana, que constituye el receptor específico de Ag del linfocito B. Estas Igs se pueden poner de manifiesto con sueros anti-Igs mediante IHQ sobre cortes de tejidos. También, estas células presentan receptores para factores de

crecimiento, IL-4, y cuando están activados expresan receptores para IL-2 (**Suter, 1990; Álvarez y cols., 1997; Sánchez-Vizcaíno, 2000**).

Los microorganismos y Ags complejos, en este caso los micoplasmas, llegan principalmente hasta los nódulos linfáticos del TLAB (zonas inductoras) y son incluidos en desmosomas por las células especializadas de la superficie y transferidos intactos al tejido subyacente donde se encuentran las células linfoides que los procesarán y presentarán a los linfocitos B y T (**Inman y Cantey, 1983; Wolf y cols., 1981**). En las zonas efectoras también se produce captación de Ag, pero mediante mecanismos diferentes. En este caso el Ag puede entrar por endocitosis a través de las mismas células epiteliales o atravesando las llamadas uniones estrechas o *zonulas ocludens* (**Torres, 1997**). La estimulación antigénica en las zonas inductoras induce inmunidad sistémica mediante IgGs e IgAs circulantes.

En los cabritos inoculados experimentalmente, se detectó inmunorreacción anti-IgG en el citoplasma de un moderado número de células plasmáticas y en la superficie de algunos linfocitos localizados, principalmente, en el tejido perifolicular y subepitelial. En ocasiones, se marcaron en células plasmáticas y linfocitos de los septos alveolares.

En el caso de los cerdos se detectó IgG porcina en el citoplasma de un moderado número de células plasmáticas y en la membrana citoplasmática de algunos linfocitos localizados principalmente en el tejido perifolicular del TLAB y en la submucosa de las vías aéreas. En algunas ocasiones, se detectó inmunorreactividad en células mononucleares de los septos alveolares y en la luz de los alvéolos, lo que se confirmó ultraestructuralmente.

El pulmón posee una cantidad considerable de tejido linfoide que se distribuye de manera difusa en la lámina propia de las vías aéreas (zona efectora) o formando nódulos próximos a las vías aéreas donde forman el TLAB (zona inductora). En las zonas inductoras tiene lugar el contacto con el Ag y la inducción de respuestas iniciales. En las zonas efectoras se localizan las células plasmáticas productoras de IgA del isotipo secretor **(McGhee y cols., 1992)**.

Defensivamente es muy importante la inmunidad mediada por células, la secreción local de IgA que previene la adherencia de los micoplasmas al epitelio ciliado y la IgG que facilita la opsonización y posterior fagocitosis por parte de los macrófagos alveolares **(Sheldrake, 1990 y 1993, Walker y cols., 1996)**. Con el anticuerpo policlonal anti-IgA caprina se detectó inmunorreactividad en el citoplasma y en la membrana celular de un moderado número de células plasmáticas localizados principalmente en el tejido perifolicular y subepitelial. En algunas ocasiones, se observaron células plasmáticas y linfocitos en los septos alveolares. Cuando se utilizó el anticuerpo policlonal anti-IgA porcina se detectó similar inmunorreacción a la observada en los cabritos. También se observó una gran cantidad de células positivas rodeando las glándulas submucosas de los bronquios. En algunas ocasiones, se detectó inmunorreactividad en células plasmáticas y linfocitos de los septos alveolares.

En el presente estudio, existen cambios significativos en el porcentaje de células IgG⁺ e IgA⁺, tanto en los cabritos inoculados experimentalmente como en los cerdos con lesiones típicas de NEP. Asimismo en los cabritos se detectaron anticuerpos específicos frente a *M. agalactiae* o *M. bovis* en suero. Dichos cambios indican la importancia que posee la inmunidad humoral en la respuesta frente a los micoplasmas que

se encuentran en las vías aéreas. La producción de anticuerpos locales durante las neumonías micoplásmicas proporcionan algún tipo de protección en estas enfermedades. La importancia de esta respuesta inmune se evidenció por el hecho de que se produjo un incremento en el número de linfocitos B del pulmón en los animales infectados con *M. hyopneumoniae*, al igual que el número de células productoras de inmunoglobulinas en el tejido pulmonar y de los títulos de anticuerpos anti-*M. hyopneumoniae* presentes en las secreciones traqueobronquiales durante el curso de la enfermedad inducida experimentalmente (**Messier y cols. 1990**). La transferencia de inmunidad pasiva a partir de suero conteniendo anticuerpos anti-*M. hyopneumoniae* protege a los cerdos de la NEP (**Lam y cols.1971**), por lo tanto los anticuerpos circulantes aparecen como involucrados en los mecanismos protectores.

Existen mecanismos de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, donde células con receptores para las Fc de Igs (monocitos, PMN eosinófilos, neutrófilos, linfocitos B y células NK) se unen a células tapizadas por las Igs favoreciendo la fagocitosis y/o la degranulación enzimática. Finalmente, la respuesta inmune mediante anticuerpos se desencadena, como se detalló en apartados anteriores, mediante la colaboración entre los linfocitos B y los CD4⁺, dicha colaboración se produce al contactar ambas células gracias al MHC II y al Ag, así como a la liberación de linfocinas, sobre todo la IL-4; de esta forma se puede producir IgG, IgE o IgA, pero conservará sus regiones variables (las que se unen al Ag) originales (**Brown y cols., 1994, Sánchez-Vizcaino, 2000**). Esto es muy importante atendiendo a los resultados obtenidos con respecto a la relación CD4/CD8, donde tanto en las cabras inoculadas experimentalmente, como en los cerdos con lesiones de NEP se produjo un incremento significativo de las células

CD4⁺. Sobre esto datos podemos observar como se potencia la inmunidad celular con la humoral.

La inmunidad lactogénica a través de la administración oral de un Ag fue demostrada por vez primera por Montgomery y cols. **(1974)** en conejos. Posteriormente esto fue corroborado en muchas otras especies animales, incluyendo el cerdo **(Saif y Bohl, 1986)**. Esto se debe a que las células inducidas por un Ag en el pulmón abandonan el pulmón vía vasos linfáticos y alcanzan la circulación sistémica a través del conducto torácico. Finalmente migran hasta las diferentes zonas efectoras, como la lámina propia de glándulas mamarias, salivares y lacrimales, donde se produce su diferenciación. Esta puede ser una herramienta útil para la inducción de una inmunidad local a nivel del tracto respiratorio frente a los micoplasmas, mediante la inoculación vía oral de antígenos de micoplasmas, especialmente para los que poseen nula o escasa capacidad de penetración en el organismo, este puede ser el caso de los micoplasmas estudiados aquí.

La organización morfológica y de poblaciones celulares presente en el TLAB de los cabritos y de los cerdos ha mostrado en este estudio una alta especialización, semejante a la presente en órganos linforreticulares como bazo y ganglios linfáticos **(Huang y cols., 1990)**. Así, las poblaciones macrofágicas, células presentadoras de antígenos y linfocitos B se agrupaban en los centros germinales en tanto que los linfocitos T efectores se localizaron en las zonas perifoliculares y subepiteliales.

CONCLUSIONES

1. Las lesiones pulmonares asociadas a la infección experimental por *Mycoplasma agalactiae* y *Mycoplasma bovis* en cabritos lactantes se caracterizaron por una neumonía broncointersticial ligera, siendo la hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquios (TLAB) el hallazgo histológico (estructural) más significativo.
2. La vacunación por vía parenteral con *Mycoplasma agalactiae* o *Mycoplasma bovis* no evitó la aparición de lesiones histológicas compatibles con neumonía enzoótica en los cabritos inoculados experimentalmente.
3. El tejido linfoide asociado a los bronquios (TLAB) mostró en ambas especies animales una alta organización morfológica y celular con poblaciones macrofágicas y linfocitos B en los centros germinales, y linfocitos T en las áreas perifoliculares.

4. Las poblaciones celulares participantes en la hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquios (TLAB) de los cabritos y cerdos infectados con estas especies de micoplasmas estuvieron representadas por macrófagos y células presentadoras de antígenos, linfocitos T y linfocitos B. La subpoblación CD4⁺ constituyó la subpoblación celular predominante de la respuesta inmune de base celular en ambas infecciones con una relación CD4/CD8 de 2,21:1 en cabras y 4,55:1 en los cerdos.

5. La inmunidad humoral en el pulmón de ambas especies estuvo representada por linfocitos Inmunoglobulina (Ig) G⁺ e Inmunoglobulina A⁺ en el tejido linfoide asociado a los bronquios (TLAB) y en los septos alveolares. Esta respuesta parece jugar un papel importante en los mecanismos de activación de la fagocitosis y eliminación de micoplasmas del tracto respiratorio al asociarse a los macrófagos, células predominantes en el exudado inflamatorio.

RESUMEN

M. agalactiae representa el principal agente causal de la Agalaxia Contagiosa Caprina, una de las principales patologías que afecta la producción de este sector a nivel mundial. En todas las islas del archipiélago canario se han descrito importantes pérdidas en el ganado caprino causadas por *M. agalactiae*. *M. bovis*, que está estrechamente relacionado con *M. agalactiae*, es un patógeno primario en el ganado bovino a nivel mundial, que se asocia con neumonías, mamitis y artritis en animales de todas las edades. Este agente ha sido aislado en algunas ocasiones de mamitis y neumonías de cabras. En los porcinos las enfermedades respiratorias causan importantes pérdidas económicas.

La NEP, causada primariamente por *M. hyopneumoniae*, es de distribución mundial y se caracteriza por su alta morbilidad y baja mortalidad presentándose principalmente en sistemas de producción intensivos.

Un hallazgo común de las infecciones del tracto respiratorio es la persistencia de los organismos en la superficie mucosa. Se ha sugerido que esto contribuye a la formación de agrupaciones linfoides observadas en el pulmón de ratones, ratas, hamsters, terneros y cerdos infectados por micoplasmas. La respuesta inmune humoral local jugaría un papel importante en el reconocimiento de la infección y en la promoción de la inmunidad mediada por anticuerpos.

En este trabajo hemos analizado por una parte, la patogenicidad de *M. agalactiae* y *bovis*, a nivel pulmonar, en caprinos infectados experimentalmente, y en porcinos infectados naturalmente con *M. hyopneumoniae*. Adicionalmente, realizamos un estudio inmunohistoquímico para determinar las poblaciones celulares presentes en las vías

respiratorias y parénquima pulmonar y, en especial, del tejido linfoide asociado a los bronquios en animales infectados por estas especies de micoplasmas.

Para este fin se utilizaron anticuerpos policlonales y monoclonales que permiten diferenciar antígenos de micoplasmas, linfocitos T (CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺), linfocitos B, linfocitos TcR γ / δ , macrófagos, células dendríticas, PMN neutrófilos y linfocitos B IgG⁺ e IgA⁺. Finalmente, y de forma complementaria se realizó un estudio ultraestructural del tracto respiratorio.

Las lesiones pulmonares asociadas a la infección experimental por *M. agalactiae* y *M. bovis* en cabritos estuvieron caracterizadas por una neumonía broncointersticial, constituyendo la hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquios (TLAB) el hallazgo histológico más significativo. No se observó que la vacunación por vía parenteral con antígenos de estos micoplasmas disminuyera el desarrollo de estas lesiones.

El tejido linfoide asociado a los bronquios mostró en el ganado caprino y porcino infectado por micoplasmas, una alta organización morfológica y celular con poblaciones macrofágicas y de linfocitos B presentes mayoritariamente en centros germinales y linfocitos T en áreas perifoliculares. Estas poblaciones estuvieron representadas por macrófagos y células presentadoras de antígenos, linfocitos T y linfocitos B, constituyendo la subpoblación CD4⁺ el elemento predominante dentro de la inmunidad de base celular durante estas infecciones. La inmunidad humoral, caracterizada por el incremento de linfocitos IgG⁺ e IgA⁺ a nivel del tejido linfoide asociado a los bronquios y septos alveolares, parece asimismo jugar un importante papel en los mecanismos de activación de la fagocitosis y eliminación de micoplasmas del tracto respiratorio.

SUMMARY

M. agalactiae represents the main causal agent of caprine contagious agalactia, one of the main diseases that affect the caprine production with a world-wide distribution. In the Canary Islands it has been described important losses caused by *M. agalactiae*. *M. bovis* is closely related to *M. agalactiae* being a primary pathogen for cattle associated with pneumonia, mastitis and arthritis. The agent has also been isolated from cases of mastitis and pneumonia in goats. The porcine enzootic pneumonia, primarily caused by *M. hyopneumoniae*, has been described in all areas of pig production being characterized the process by its high morbidity and the low mortality appearing in intensive production systems.

A common finding of the infections of respiratory tract is the persistence of the organisms in the mucosal surface. This has been suggested to contribute to the formation of lymphoid accumulations observed in the lung of mice, rats, hamsters, calves and pigs infected by mycoplasma. This immune response has been demonstrated to have an important B-lymphocyte participation so the humoral response should play an important role during the infection.

In this work it has been analyzed the pathogenicity of *M. agalactiae* and *bovis* in experimentally infected goats and pigs infected naturally by *M. hyopneumoniae*. Secondly it has been carried out an immunohistochemical study to determine the cellular populations

present in the airways and pulmonary parenchyma and in special in the bronchus-associated lymphoid tissue in animals infected by these species of mycoplasmas. It was used polyclonal and monoclonal antibodies for the detection of antigens of mycoplasmas, T lymphocytes (CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺), B lymphocytes, TcR γ / δ lymphocytes, macrophages, dendritic cells, neutrophils and B lymphocytes IgG⁺ and IgA⁺. Finally, it was analyzed the ultrastructural changes of the respiratory tract.

The pulmonar findings associated to the experimental infection by *M. agalactiae* and *M. bovis* in goats were characterized by bronchointerstitial pneumonia, being the hyperplasia of the bronchus-associated lymphoid tissue the most significant histological change. The vaccination by the parenteral via with antigens of these mycoplasma species was not able to diminished the development of the respiratory lesions. The bronchus-associated lymphoid tissue showed in the goats and pigs infected by mycoplasmas, a high structural and cellular organization with macrophages and B lymphocytes present mainly in the germinal centers and T lymphocytes in perifollicular areas. The participant cellular populations in the hyperplasia of the bronchus-associated lymphoid tissue in animals infected with these mycoplasma species were represented by macrophages and antigen presenting cells, T lymphocytes and B lymphocytes constituting the CD4⁺ subset the predominant element within the cellular immunity during these infections. The humoral immunity, represented by the increase of IgG and IgA lymphocytes in the bronchus-associated lymphoid tissue, bronchiolar wall and alveolar septa also seems to play an important role in the mechanisms of activation of the phagocytosis and clearance of mycoplasmas from the respiratory tract.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas, compañeros y amigos, que de un modo u otro han hecho posible la realización de este trabajo y en especial a:

- Dr. D. Francisco Rodríguez Guisado y el Dr. D. Antonio J. Fernández Rodríguez por su apoyo y su guía para la realización de este trabajo.
- Los profesores del Área de Anatomía y Anatomía Patológicas Comparadas, Fac. de Veterinaria-ULPGC, por su amistad y colaboración para mi formación profesional.
- Licenciada Dña. Marisa Andrada Borzollino por su orientación desde mis comienzos como alumno interno en la Cátedra de Patología General-UNR (Argentina).
- Mis compañeros Becarios por su amistad y apoyo.
- Dña. Ana Afonso Almeda y D. Pedro Castro Alonso por su apoyo para la realización de todas las técnicas laboratoriales y su amistad.
- El Área de Epidemiología y Medicina Preventiva, Dpto. de Patología Animal, Fac. de Veterinaria-ULPGC y en especial a Dña. Ana S. Ramírez Corbera.
- Prof. Pedro Saavedra Santana por su ayuda para la realización del análisis estadístico de los resultados.
- Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba y en especial al Dr. José C. Gómez-Villamandos.
- El Programa de Becas FOMEC-UNR (Argentina) y sus autoridades por haberme financiado durante mis estudios.
- Mis amigos y miembros de la Facultad de Cs. Veterinarias-UNR (Argentina), y especialmente a mis compañeros de la Cátedra de Patología General-UNR (Argentina).

BIBLIOGRAFÍA

- **Adegboye, D.S., Rasberry, U., Halbur, P.G., Andrews, J.J. and Rosenbusch, R.F.** (1995a). Monoclonal antibody-based immunohistochemical technique for the detection of *Mycoplasma bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded calf lung tissues. J Vet Diagn Invest. **7:** 261-265.
- **Adegboye, D.S., Halbur, P.G., Cavanaugh, D.L., Werdin, R.E., Chase, C.C.L, Miskimins, D.W. and Rosenbusch, R.F.** (1995b). Immunohistochemical and pathological study of *Mycoplasma bovis*-associated lung abscesses in calves. J Vet Diagn Invest. **7:** 333-337.
- **Adler, H.E., DaMassa, A.J. and Brooks, D.L.** (1980). Caprine mycoplasmosis: *Mycoplasma putrefaciens*, a new cause of mastitis in goats. Am J Vet Res. **41**(10): 1677-1679.
- **Al-Darraj, A.M., Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Graham, D.L., Kluge, J.P. and Frank, G.H.** (1982). Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial virus and *Pasteurella haemolytica*: Clinical and microbiologic studies. Am J Vet Res. **42:** 236-240.
- **Algarra, I. y Garrido, F.** (1998) Citocinas. En Inmunología. (Martínez, J.P., ed.) Ediciones Pirámide, S.A. España. Capítulo 8, pp. 149-166.
- **Álvarez, B., López - Fuentes, L., Doménech, N. y Domínguez, J.** (1997). Células del sistema inmunitario porcino. Inmunología I. Ed. Luzán. Porci. **40:** 35-45.
- **Amass, S.F., Clarck, L.K., van Alstine, W.G., Bowersock, T.L., Murphy, D.A., Knox, K.E. and Albregts, S.R.** (1994). Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. J Am Vet Med Assoc **204**(1): 102-7.
- **Andrada, M., Sarradell, J., Poveda, B.J., André, M., Herráez, P. y Fernández, A.** (1998a). Utilización de Anticuerpos Poli y Monoclonales en la Detección Inmunohistoquímica de *Mycoplasma hyopneumoniae*. X Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. Lugo, España.
- **Andrada, M., Sarradell, J., Poveda, B., Pérez, A., Herráez, P. y Fernández, A.** (1998b). Detección Inmunohistoquímica de *Mycoplasma hyopneumoniae* en Cortes en Parafina. I Congreso Rioplatense de Producción Porcina, I Congreso Uruguayo de Producción Porcina y VI CAPP. Punta del Este, Uruguay.
- **Arnaiz, A., Corell, A., Pacheco, A., Allende, L.M. y Regueiro, J.R.** (1998) Receptor antígeno célula T. En Inmunología. (Martínez, J.P. ed.) Ediciones Pirámide, S.A. España Capítulo 7, pp. 131-147.

- **Asai, T., Okada, M., Ono, M., Irisawa, T., Mori, Y., Yokomizo, Y. and Sato, S.** (1993). Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Immunol Immunopathol. **38**: 253-260.
- **Asai, T., Okada, M., Ono, M., Mori, Y., Yokomizo, Y. and Sato, S.** (1994). Detection of Interleukin-6 and Prostaglandin E₂ in bronchoalveolar lavage fluids of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Immunol Immunopathol. **44**: 97-102.
- **Asai, T., Okada, M., Yokomizo, Y., Sato, S. and Mori, Y.** (1996). Suppressive effect of bronchoalveolar fluid from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* on chemiluminescence of porcine peripheral neutrophils. Vet Immunol Immunopathol. **51**: 325-331.
- **Athamna, A., Rosengarten, R., Levisohn, S., Kahane, I. and Yogev, D.** (1997) Adherence of *Mycoplasma gallisepticum* involves variable surface membrane proteins. Infect Immun. **65**: 2468-2471.
- **Atwal, O.S.** (1988). Ultrastructural study of the alveolar-capillary membrane and the tubular endoplasmic reticulum in alveolar type I cells of the caprine lung. Am J Anat. **182**: 42-58.
- **Babin, M.** (1991). Inmunidad frente a bacterias. Porci. **3**: 9-15.
- **Ball, H.J., Finlay, D., Rodríguez, F. and Mackie, D.** (1997). Monoclonal antibody detection of mycoplasma antigen as a diagnostic tool. In *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, (Frey, J. and Sarris, K. eds). European Cooperation on Scientific and Technical Research, Luxemburg, pp. 78-80.
- **Banchereau, J. and Steinman, R.M.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature. **392**: 245-252.
- **Banks, W.J.** (1986). Aparato Respiratorio. En *Histología Veterinaria Aplicada*. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. Capítulo 21, pp: 549-567.
- **Barile, M.F.** (1981). Mycoplasma infection of cell cultures. Isr. J. Med. Sci. **17**: 555-558.
- **Barman, N.N., Bhattacharyya, R., Upadhyaya, T.N. and Baishya, G.** (1996). Development of bronchus-associated lymphoid tissue in goats. Lung. **174**(2): 127-131.
- **Bar-Moshe, B. and Rapaport, E.** (1979). An outbreak of contagious caprine pleuropneumonia caused by *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (ovine/caprine serogroup 8). Refuati Veterinarith. **36**: 53-54.

- **Bar-Moshe, B. and Rapapport, E.** (1981). Observations on *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* infection in Saanen goats. Isr J Med Sci. **17**: 537-539.
- **Bascunana, C.R., Mattsson, J.G., Bölske, G. and Johansson, K.E.** (1994). Characterization of the 16rRNA genes from *Mycoplasma* sp. Strain F-38 and development of an identification system based on PCR. J Bacteriol. **176**(9): 2577-2586.
- **Bashiruddin, J.B., Nicholas, R.A.J., Santini, F.G., Ready, R.A., Woodward, M.J. and Taylor, T.K.** (1994). Use of the Polymerase Chain Reaction to detect *Mycoplasma* DNA in cattle with Contagious Bovine Pleuropneumonia. Vet Rec. **134**: 240-241.
- **Belton, D., Leach, R.H., Mitchelmore, D.L. and Rurangirwa, F.R.** (1994). Serological specificity of a monoclonal antibody to *Mycoplasma capricolum* strain F-38, the agent of contagious caprine pleuropneumonia. Vet Rec. **134**(25): 643-646.
- **Bergemann, A.D., Whitley, J.C. and Fichh, L.R.** (1990). Taxonomic significance of differences in DNA methylation within the *Mycoplasma mycoides* cluster detected with restriction endonucleases MboI and DpnI. Letters in Applied Microbiology **11**: 48-51.
- **Bergonier, D., Berthelot, X. and Poumarat, F.** (1997) Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. Rev sci tech Off int Eiz. **16**(3): 848-873.
- **Berndt, A. and Muller, G.** (1995). Occurrence of T lymphocytes in perivascular regions of the lung after intratracheal infection of swine with *Pasteurella multocida*. Vet Immunol Immunopathol. **49**(1-2): 143-59.
- **Binns, R.M.** (1994). The null/ $\gamma\delta$ TCR⁺ T cell family in the pig. Vet Immunol Immunopathol. **43**: 69-77.
- **Blanchard, B., Vena, M.M., Cavalier, A., Lannic, J.L., Gouranton, J., Kobisch, M. and Lannic, J.** (1992). Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Microbiol. **30**: 329-341.
- **Blood, D.C., Radostitis, O.M. and Henderson, J.A.** (1988). Enfermedades causadas por especies de *Mycoplasma*. Medicina Veterinaria. 756-771.
- **Bölske, G., Wierup, M., Renstrom, L.A., Humlesio N.E. and Hammarberg K.** (1982). Utbrott i Sverige av elakartad lungsjuka hos get. (Outbreak in Sweden of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). Svensk Veterinartidning. **34**(15): 673-676.

-
- **Bölske, G., Msami, H., Humlesjö, N.E., Erno, H. and Jönsson, L.** (1988). *Mycoplasma capricolum* in an Outbreak of Polyarthritis and Pneumonia in Goats. Acta vet. scand. **29**: 331-338.
 - **Bölske, G., Engvall, A., Renström, L.H.M. and Wierup, M.** (1989). Experimental infections of goats with *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*, LC type. Research in Veterinary Science. **46**: 247-252.
 - **Bonnet, F., Saillard, C., Bove, J.M., Leach, R.H., Rose, D.L., Cottew, G.S. and Tully, J.G.** (1993). DNA relatedness between field isolates of *Mycoplasma* F38 group, the agent of contagious caprine pleuropneumonia, and strains of *Mycoplasma capricolum*. Int J Syst Bacteriol. **43** (3): 597-602.
 - **Bonneville, M., Janeway, C.A. Jr, Ito, K., Haser, W., Ishida, I., Nakanishi, N. and Tonegawa, S.** (1988) Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of gamma delta T cells. Nature. **336**(6198): 479-81.
 - **Brandao, E., Botelho, A., Bashiruddin, J., Nicholas, R.** (1994). Use of Polymerase Chain Reaction for identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* S.C. isolated from sheep and goats. IOM Letters **3**, 24 (Abstract).
 - **Bredt, W.** (1979). Motility. In *The Mycoplasmas*. Vol. I: Cell Biology, (Barile and Razin, eds.). Academic Press, New York, pp. 141-156.
 - **Brooks, D.L., DaMassa, A.J. and Adler, H.E.** (1981). Caprine mycoplasmosis: immune response in goats to *Mycoplasma putrefaciens* after intramammary inoculation. American Vet Med Assoc. **42**(11): 1898-1900.
 - **Brooks, D.L., DaMassa, A.J. and Adler, H.E.** (1984). Caprine *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* infections. 3rd International Conference on Goat Production and Disease 1371, Jan 10-15, Tucson, Arizona.
 - **Brown, W.C., Woods, V.M., Chitko-McKown, C.G., Hash, S.M. and Rice-Ficht, A.C.** (1994). Interleukin-10 is expressed by bovine Type 1 Helper, Type 2 Helper, and unrestricted parasite-specific T-cell clones and inhibits proliferation of all three subsets in an accessory-cell-dependent manner. Infect Immun. **62**(11): 4697-4708.
 - **Brunner, M., Feldner, J. and Bredt, W.** (1985). Effect of monoclonal antibodies to the attachment on experimental *Mycoplasma pneumoniae* infection of hamsters: A preliminary report. Isr J Med Sci. **17**: 599-603.
 - **Buddle, B.M., Hecceg, M. and Davies.** (1984). Experimental infection of sheep with *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Pasteurella haemolytica*. Vet Microbiol. **9**: 543-548.

-
- **Busse, W.W.** (1991). Pathogenesis and sequelae of respiratory infections. Review of Infectious Diseases, **13**, 477-485.
 - **Cao, H., Wolf, R.G., Mreltzer, M.S and Crawford, R.M.** (1989). Differential regulation of Class II MHC determinants on macrophages by IFN- γ and IL-4. J Immunol, **143**: 3524-3531.
 - **Caro, M.R., Gallego, M.C., Buendía, A.J. and Navarro, E.** (1998). Postnatal evolution of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and lymphoid organs in the goat. Research in Veterinary Science, **65**: 145-148.
 - **Carr, M.M., Howard, C.J., Sopp, P., Manser, J.M and Parsons, K.R.** (1994). Expression on porcine $\gamma\delta$ lymphocytes of a phylogenetically conserved surface antigen previously restricted in expression to ruminant $\gamma\delta$ T lymphocytes. Immunology, **81**: 36-40.
 - **Carson, J.L., Collien, A.M. and Clyde, W.A.** (1979). Ciliary membrana alterations occurring in experimental *Mycoplasma pneumoniae* infection. Science, **206**: 34951.
 - **Carter, G.R.** (1967). Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. In Advances in Veterinary Science. (Brandly, C.A. and Cornelius, C. eds.) Academis Press, New York, **11**: 321-379.
 - **Carter, L.L. and Dutton, R.W.** (1995). Relative perforin- and Fas-mediated lysis in T1 and T2 CD8 effector populations. J Immunol, **155**: 1028-1031.
 - **Caruso, J.P. and Ross, R.F.** (1990). Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. Am J Vet Res, **51**(2): 227-231.
 - **Cassell, G.H., Lindsey, J.R. and Baker, H.J.** (1974). Immune response of pathogen-free mice inoculated intranasally with *Mycoplasma pulmonis*. J Immunol, **112**: 124-136.
 - **Center, D.M., Kornfeld, H. and Cruikshank, W.W.** (1996). Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. Immunol Today, **17**: 476-481.
 - **Cho, B.K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H.N. and Chen, J.** (1999). Functional differences between memory and naive CD8 T cells. Proc. Natl. Acad. Sci, **96**: 2976-2981
 - **Christiansen, C. and Erno, H.** (1982). Classification of the F38 group of caprine mycoplasma strains by DNA hybridization. J Gen Microbiol, **128**: 2523-2526.

- **Citti, C., Poumarat, F., Le Grand, D., Bergonier, D., Beier, T., Brank, M., Glew, M.D. and Rosengarten, R.** (1999). Antigenic variation in mycoplasmas: past, present and future. In *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics* (Frey, J. and Sarris, K. eds). COST, European Commission. European Communities Official Publications Office, Luxembourg. Vol. 3, pp. 1.
- **Clavers, H., MacHugh, N.D., Bensaid, A., Dunlap, S., Baldwin, C.L., Kaushal, A., Iams, K., Howard, C.J. and Morrison, W.I.** (1990). Identification of a bovine surface antigen uniquely expressed on CD4⁺ CD8⁻ T cell receptor $\gamma\delta^+$ T lymphocytes. Eur J Immunol. **20**: 809.
- **Cordy, D.R.** (1984). Septicaemia and pneumonia in *Mycoplasma capricolum* infections of young goats. Aust Vet J. **61**(6): 201-202.
- **Costas, M., Leach R.H. and Mitchelmore, D.L.** (1987). Numerical analysis of PAGE protein patterns and the taxonomic relationships within the "*Mycoplasma mycoides* cluster". J Gen Microbiol. **133**: 3319-3329.
- **Cottew, G.S. and Yeats, F.R.** (1978). Subdivision of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from cattle and goats into two types. Aust Vet J. **54**: 293-296.
- **Cottew, G.S.** (1979). Pathogenicity of the subspecies *mycoides* of *Mycoplasma mycoides* for cattle, sheep and goats. Zbl Bakt Hyg. I Abt Orig A. **245**: 164-170.
- **Cottew, G.S.** (1982). Significance of mycoplasmoses in goats. Proc. 3^d Int. Conference on Goat Production and Diseases, Tucson (Arizona). 221-225.
- **Cottew, G.S. and Yeats F.R.** (1982). Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats. Aust Vet J. **59**: 77-81.
- **Cottew, G.S.** (1984). Overview of mycoplasmoses in sheep and goats. Isr J Med Sci. **20**: 962-964.
- **Cottew, G.S., Bréard, A., DaMassa, A.J., Erno, H., Leach, R.H., Lefèvre, P.C., Rodwell, A.W. and Smith, G.R.** (1987). Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. Isr J Med Sci. **23**: 632-635.
- **DaMassa, A.J., Brooks, D.L. and Adler, H.E.** (1983a). Caprine mycoplasmosis: Widespread infection in goats with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large-colony type). Am J Vet Res. **44**(2): 322-325.
- **DaMassa, A.J., Brooks, D.L., Adler, H.E. and Watt, D.E.** (1983b). Caprine mycoplasmosis: acute pulmonary disease in newborn kids given *Mycoplasma capricolum* orally. Aust Vet J. **60**: 125-126.

-
- **DaMassa, A.J., Brooks, D.L. and Holmberg, C.A.** (1984). Pathogenicity of *Mycoplasma capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*. Isr J M S. **20**(10): 975-978.
 - **DaMassa, A.J., Brooks, D.L. and Holmberg, C.A.** (1986). Induction of mycoplasmosis in goats kids by oral inoculation with *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*. Am J Vet Res. **47**(9): 2084-2089.
 - **DaMassa, A.J., Brooks, D.L., Holmberg, C.A. and Moe, A.I.** (1987a). Caprine mycoplasmosis: An outbreak of mastitis and arthritis requiring the destruction of 700 goats. Vet Rec **120**: 409-413.
 - **DaMassa, A.J., Holmberg, C.A. and Brooks, D.L.** (1987b). Comparison of caprine mycoplasmosis caused by *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, and *Mycoplasma putrefaciens*. Isr J Med Sci. **23**: 636-640.
 - **DaMassa, A.J., Wakenell, P.S. and Brooks, D.L.** (1992). Mycoplasmas of goats and sheep. Review Article. J Vet Diagn Invest. **4**: 101-113.
 - **Davies, D.H., Dungworth, D.L., Humphreys, S. and Johnson, A.J.** (1977). Concurrent infection of lambs with *Parainfluenza virus* type 3 and *Pasteurella haemolytica*. N Z Vet J. **25**: 262-265.
 - **Davies, D.H., Jones, B.A.H. and Thurley, D.C.** (1981). Infection of specific pathogen-free lambs with *Parainfluenza virus* type 3, *Pasteurella haemolytica* and *Mycoplasma ovipneumoniae*. Vet Microbiol. **6**: 295-308.
 - **Davies, D.H., Hecceg, M. and Thurley, D.C.** (1982). Experimental infection of lambs with an adenovirus followed by *Pasteurella haemolytica*. Vet Microbiol. **7**: 369-381.
 - **Davis, W.C. and Hamilton, M.J.** (1998). Comparison of the unique characteristics of the immune system in different species of mammals. Vet Immunol Immunopathol. **63**: 7-13.
 - **DeBey, M.C., Jacobson, C.D. and Ross, R.F.** (1992). Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am J of Vet Res. **53**: 1705-10.
 - **DeBey, M.C. and Ross, R.F.** (1994). Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. Infect Immun. **62**(12): 5312-18.
 - **Dedieu, L., Breard, A. and Lefèvre, P.C.** (1992). Development of a species-specific DNA probe for *Mycoplasma capricolum*. Vet Microbiol. **32**: 189-197.
 - **Dedieu, L., Mady, V. and Lefèvre, P.C.** (1994a). Development of a selective Polymerase Chain Reaction Assay for the detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* S.C. IOM Letters **3**, 17 (Abstract).

-
- **Dedieu, L., Mady, V. and Lefèvre, P.C.** (1994b). Development of two Polymerase Chain Reaction Assays for the identification of Contagious Agalactia related Mycoplasmas. IOM Letters 3, 31 (Abstract).
 - **Déniz, M.S.** (1996). Estudio de la Agalaxia Contagiosa Caprina en Las Islas Canarias. Tesis Doctoral. Las Palmas de Gran Canaria, España.
 - **Denny, F.W., Taylor-Robinson, D. and Allison, A.C.** (1972). The role of thymus-dependent immunity in *Mycoplasma pulmonis* infections of mice. J Med Microbiol. 5(3): 327-36.
 - **Dellmann, H.D.** (1980) Sistema Respiratorio. En Histología Veterinaria. Editorial Acribia, Capítulo 9, pp. 201-222.
 - **Domínguez, J. y Alonso, F.** (1991). Mediadores celulares de la respuesta inmune: interleuquinas. Porci. 2: 51-63.
 - **Doster, A.R. and Lin, B.C.** (1988). Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. Am J Vet. Res. 49: 1719-1721.
 - **Doutre, M.P. and Perreau, P.** (1983a). Le portage de *Pasteurella* sp. et de *Mycoplasma arginini* chez la chèvre au Sénégal. Rev Elev Med Vét Pays Trop. 36(1): 11-14.
 - **Doutre, M.P. and Perreau, P.** (1983b). Le portage de *Pasteurella* sp. et de *Mycoplasma arginini* chez les moutons sains au Sénégal. Rev Elev Med Vét Pays Trop. 34(4): 365-368.
 - **Dungworth, D.L.** (1993). The Respiratory System. In Pathology of Domestic Animals. (Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N. eds.). Fourth Edition. Academic Press, Inc. U.S.A. Vol II, Chapter 6, pp. 539-699.
 - **Edward, D.G. ff. and Freundt, E.A.** (1956). The classification and nomenclature of organisms of the Pleuropneumonia group. J Gen Microbiol. 14: 197-207.
 - **Egwu, G.O.** (1992). Outbreak of ovine infectious kerato-conjunctivitis caused by *Mycoplasma conjunctivae*. Small Rumin Res. 9(2): 189-196.
 - **Egwu, G.O., Ameh, J.A, Aliyu, M.M. and Mohammed, F.D.** (2001). Caprine mycoplasmal mastitis in Nigeria. Small Rumin Res. 39(1): 87-91.

-
- **Erno, H., Al-Aubaidi, J.M., Ojo, M.O., Minga, U.M. and Sikdar, A.** (1978). Classification and identification of ovine and caprine mycoplasmas. Acta Vet Scand. **19**: 392-406.
 - **Erno, H., Leach, R.H., Salih, M.M. and MacOwan, K.J.** (1983). The F38-like group, a new group of caprine mycoplasmas?. Acta Vet Scand. **24**: 275-286.
 - **Erno, H.** (1987). Mycoplasmosis of ruminants: a general introduction. Rev Sci Tech Off Int Epiz. **6**: 553-563.
 - **Falk, K. and Liam, B.M.** (1991). An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds: III. Serological findings and their relationship to pathomorphological and microbiological findings. Acta Vet Scand. **32**: 79-88.
 - **Fawcett, D.W.** (1995). Sistema respiratorio. En Tratado de Histología. (Fawcett, Don W. ed.). Interamericana McGraw-Hill. 12ª Edición. Capítulo 29, pp. 765-790.
 - **Fernald, G.W.** (1979). Humoral and cellular immune responses to mycoplasmas. In The Mycoplasmas, (Tully, J.G. and Whitcomb, R.F. eds.). Academic Press, New York. Vol. 2, pp. 399-423.
 - **Firke, Y.** (1984). La pathologie des caprins en Ethiopie, In "Colloque de l'INRA". Les maladies de la chèvre. Ed. Yvore et perrin. **28**: 674-676.
 - **Freundt, E.A., Andrews, B.E., Erno, H., Kunze, M. and Black, F.T.** (1973). The sensitivity of *Mycoplasma* to sodium-polyanethol-sulfonate and digitonin. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 1 Abt. orig. A 225: 104-112.
 - **Friis, N.F. and Feenstra, A.A.** (1994). *Mycoplasma hyorhinis* in the etiology of serositis among piglets. Acta Vet Scand. **35**(1): 93-8.
 - **Gaillard-Perrin, G., Picavet, D.P. et Perrin, G.** (1985). Isolement de *Mycoplasma putrefaciens* dans deux troupeaux de chèvres présentant des Symptômes D'agalactiae. Revue Méd. Vét. **137**(1): 67-70.
 - **Garrido, F., León, J.L., Ladero, L, Cuéllar, L. and Díaz, M.A.** (1987). Contagious agalactia in Spain. In Contagious agalactia and other mycoplasmal diseases of small ruminants. (Lambert and Jones, eds.). Luxembourg, Commission of the European Community. pp: 1-5.
 - **Gilmour, N.J.L.** (1980). *Pasteurella haemolytica* infections in sheep. Vet. Quart. 2: 191-198.

-
- **Gilmour, N.J.L., Jones, G.E. and Rae, A.G.** (1982). Long-term pathological and microbiological progress in sheep of experimental disease resembling atypical pneumonia. J Comp Pathol. **92**: 229-238.
 - **Gois, M. and Kuksa, F.** (1974). Intranasal infection of gnotobiotic piglets with *Mycoplasma hyorhinis*: differences in virulence of the strains and influence of age and the development of infection. Zentralbl. Veterinärmed. B. **21**: 352-361.
 - **Goltz, J.P., Rosendal, S., McCraw, B.M. and Ruhnke, H.L.** (1986). Experimental studies on the pathogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* for the respiratory tract of goats. Can J Vet Res. **50**: 59-67.
 - **Goncer Coca, A. and Rodríguez Ferri, E.F.** (1990). Neumonías por mycoplasmas en ovejas y cabras. Medicina Veterinaria. **7**(11): 619-624.
 - **Goodwin, R.F.W.** (1985). Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: Search for possible causes. Vet Rec. **116**: 690-4.
 - **Gourlay, R.N.** (1981). Mycoplasmosis in cattle, sheep and goats. Isr J Med Sci. **17**(7): 531-536.
 - **Gourlay, R.N. and Howard, C.J.** (1982). Respiratory mycoplasmosis. Advances in veterinary science and comparative medicine. **26**: 289-332.
 - **Guerin, C., Thiaucourt, F., Mady, V., Breard, A. and Lefèvre, P.C.** (1993). Rapid diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia in pleural fluids by immunobinding assay. Small Rumin Res. **12**(2): 193-200.
 - **Guha, C. and Verma, B.B.** (1987). Contagious caprine pleuropneumonia: experimental infection of kids with local strain of *Mycoplasma agalactiae*. Indian J Vet Med. **7**(1): 10-13.
 - **Gupta, M.M., Verma, B.R. and Chauhan, H.V.S.** (1984). Contagious caprine pleuropneumonia: studies on etiopathology. Indian Vet J. **61**: 733-737.
 - **Harbi, M.S.M.A., El Tahir, M.S., MacOwan, K.J. and Nayil, A.A.** (1981). *Mycoplasma* strain F38 and contagious pleuropneumonia in the Sudan. Vet Rec. **108**: 261.
 - **Hare, W.C.D.** (1982a) Sistema Respiratorio de los rumiantes. En Anatomía de los animales domésticos. (Sisson, S. y Grossman, J.D. eds.). 5ª Edición. Salvat Editores, S.A. Tomo II, Capítulo 30, pp. 1017-1039.

-
- **Harding, J.C., Baarsch, M.J. and Murtaugh.** (1997). Association of Tumour Necrosis Factor and acute phase reactant changes with post arrival disease in swine. J Vet Med. **B44**: 405-413.
 - **Hare, W.C.D.** (1982b) Sistema Respiratorio de los porcinos. En Anatomía de los animales domésticos. (Sisson, S. y Grossman, J.D. eds.). 5ª Edición. Salvat Editores, S.A. Tomo II, Capítulo 41, pp. 1414-1429.
 - **Hayashidani, H., Honda, E., Nakamura, T., Mori, Y., Sawada, T. and Ogawa, M.** (1988) Outbreak of pneumonia caused by *Pasteurella haemolytica* infection in Shiba goats in Japan, Jpn J Vet Sci. 50: 960-962.
 - **Hazell, S.L., Carrigan, M.J. and Cockram, F.A.** (1985). *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in the ears of goats associated with an outbreak of systemic mycoplasmosis. Aust Vet J. **62**(12): 421-422.
 - **Hein, W.R. and Mackay, C.R.** (1991). Other surface antigens identified on sheep leukocytes. Vet Immunol Immunopathol. **27**: 115-118.
 - **Hotzel, H., Sachse, K. and Pfützner, H.** (1994). Differentiation of the members of the "Mycoides Cluster" using PCR. IOM Letters 3, 28 (Abstract).
 - **Howard, C.J. and Gourlay, R.N.** (1974). An electron-microscopic examination of certain bovine mycoplasmas stained with ruthenium red and the demonstration of a capsule on *M. dispar*. J Gen Microbiol. **83**: 393-398.
 - **Howard, C.J. and Gourlay, R.N.** (1978). Mycoplasmas of animals. Sci Prog Oxf. **65**: 313-329.
 - **Howard, C.J. and Taylor, G.** (1985). Immune responses to *Mycoplasma* infections of the respiratory tract. Vet Immunol Immunopathol. **10**: 3-32.
 - **Howard, C.J., Thomas, L.H. and Parsons, K.R.** (1987). Immune response of cattle to respiratory mycoplasmas. Vet Immunol Immunopathol. **17**: 401-412.
 - **Howard, C.J., Brooke, G.P., Werling, D., Sopp, P., Hope, J.C., Parsons, K.R. and Collins, R.A.** (1999). Dendritic cells in cattle: phenotype and function. Vet Immunol Immunopathol. **72**: 119-124.
 - **Hsu, T., Artiushin, S. and Minion, F.C.** (1997). Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J Bacteriol. **179**(4): 1317-23.
 - **Huang, Y.T., Chu, R.M., Liu, R.S. and Weng, C.N.** (1990). Morphologic studies of intrapulmonary airway mucosa-associated lymphoid tissues in swine. Vet Immunol Immunopathol. **25**: 13-22.

-
- **Hutcheon, D.** (1881). Contagious pleuropneumonia in Angora goats. Veterinary Journal. **13**: 171-180.
 - **Inman, L. y Cantey, J.** (1983). Specific adherence of *Escherichia coli* (strain REDEC-1) to membranous M cells of the Peyer's patch in *Escherichia coli* diarrhea in the rabbit. J Clin Invest. **71**(1): 1-8..
 - **Itohara, S., Farr, A.G., Lafaille, J.J., Bonneville, M., Takagaki, Y., Haas, W. and Tonegawa, S.** (1990). Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. Nature. **343**(6260): 754-7.
 - **Johansson, K. E., Mattsson, J. G., Ros Bascuñana, C. and Bölske, G.** (1994). Detection of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* and diagnosis of Contagious Caprine Pleuropneumonia by PCR and restriction enzyme analysis of the 16S rRNA gene. IOM Letters 3, 26 (Abstract).
 - **Jonas, A.M. and Barber, T.L.** (1969). *Mycoplasma mycoides* var. *capri* isolated from a goat in Connecticut. J Infect Dis. **119**: 126-131.
 - **Jones, G.E., Gilmour, J.S. and Rae, A.** (1978). Endobronchial inoculation of sheep with pneumonic lung-tissue suspensions and with the bacteria and mycoplasma isolated from them. J Comp Pathol. **88**: 85-96.
 - **Jones, G.E., Gilmour, J.S. and Rae, A.** (1982). The effect of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Pasteurella haemolytica* on specific pathogen-free lambs. J Comp Pathol. **92**: 261-271.
 - **Jones, G.E.** (1983). Mycoplasmas of sheep and goats: A synopsis. Vet Rec. **113**: 619-620.
 - **Jones, G.E. and Wood, A.R.** (1988). Microbiological and serological studies on caprine pneumonias in Oman. Res Vet Sci. **44**: 125-131.
 - **Jones, G.E.** (1989). Pleuroneumonia contagiosa caprina. Office International des Épizooties. Serie Técnica N° 9.
 - **Kahane, I.** (1984). In vitro studies on the mechanism of adherence and pathogenicity of mycoplasma. Isr J Med Sci. **9**: 210-216.
 - **Kahwa, C.K.B., Atwal, O.S. and Purton, M.** (1997). Transmission electron microscopy of the epithelium of distal airways and pulmonary parenchyma of the goat lung. Research in Veterinary Science. **63**: 49-56.
 - **Kaliner, G. and MacOwan, K.J.** (1976). The pathology of experimental and natural contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. Zbl Vet Med B. **23**: 652-661.

- **Kasali, D.B. and Ojo, M.O.** (1981). Pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* for goats. International Goats and Sheep Research. **1**: 269-273.
- **Kenny, G.E.** (1979). Antigenic determinants. In *The mycoplasmas*. (Barile and Razin, eds.). Academic Press, Inc, New York. Vol. I, pp. 351-384.
- **Kirchhoff, H. and Rosengarten, R.** (1984). Isolation of a motile mycoplasma from fish. J Gen Microbiol. **130**: 2439-2445.
- **Kobisch, M., Blanchard, B. and Le-Potier, M.F.** (1993) *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. Vet Res. **24**: 67-77.
- **Kobzik, L.** (2000). El pulmón. En Robbins: Tratado de Patología Estructural y Funcional. (Cotran, R.S., Kumar, V. and Collins, T. eds.). Interamericana Mc Graw-Hill. 6ª Edición. Capítulo 16, pp. 727-789.
- **Korolev, E.V., Nikonov, A.V., Brudnaya, M.S., Snigirevskaya, E.S., Sabini, G.V., Komissarchick, Y.Y., Ivanov, P.I. and Borchsenius, S.N.** (1994). Tubular structures of *Mycoplasma gallisepticum* and their possible participation in cell motility. Microbiol. **140**: 671-681.
- **Kwon, D. and Chae, C.** (1999). Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in Lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a Digoxigenin-labeled probe. Vet Pathol. **36**: 308-313.
- **Lambert, M.** (1987). Contagious agalactia of sheep and goats. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. **6**(3): 699-711.
- **Larsen, G. L., McCarthy, K., Webster, R.O., Henson, J. and Henson, P.** (1980). A differential effect of C5a des Arg in the induction of pulmonary inflammation. Am J Pathol. **100**: 179-92.
- **Leach, R.H., Erno, H. and MacOwan, K.J.** (1993). Proposal for designation of F-38 Type caprine Mycoplasmas as *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* subsp. nov. and consequent obligatory relegation of strains currently classified as *M. capricolum* (Tully, Barille, Edward, Theodore, and Erno 1974) to an additional new subspecies, *M. capricolum* subsp. *capricolum* subsp. nov. Int J Syst Bact. **43**(3): 603-605.
- **Lefèvre, P.C., Bréard, A., Al Farouk, I. and Buron, S.** (1987a). *Mycoplasma* species F38 isolated in Chad. Vet Rec **121**: 575-576.
- **Lefèvre, P.C., Jones, G.E. and Ojo, M.O.** (1987b). Pulmonary mycoplasmoses of small ruminants. Revis. Science Technique. Office International Epizootiology. **6**(3): 759-799.

-
- **Leman, A.D.; Stein, T.; Straw, B. and Hilley H.D.** (1982). Pneumonia of swine; its cost and value of control. Mod Vet Pract. **63**: 195-8.
 - **Lemcke RM.** (1974). The relationship of a caprine mycoplasma to PG3, the type strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Res Vet Sci. **16**(1): 119-21.
 - **Litamoi, J.K., Wanyangu, S.W. and Simam, P.K.** (1990). Isolation of *Mycoplasma* biotype F38 from sheep in Kenya. Trop Anim Health Prod. **22**(4): 260-2.
 - **Little-Johns, I.R. and Cottew, G.S.** (1977). The isolation and identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Aust Vet J. **53**: 297-298.
 - **Lium, B.M. and Falk, K.** (1991). An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds: I. prevalence and morphological description of gross lung lesions. Acta Vet Scand. **32**: 55-65.
 - **Livingston, D.W., Stair, E.L., Underdahl, N.R. and Mebus, C.A.** (1972). Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. Am J Vet Res. **33**: 265-75.
 - **Longley, H.O.** (1951). Contagious caprine pleuropneumonia: a study of the disease in Nigeria. HMSO, London (England). **7**: 4.
 - **López, A.** (1995) Defense Mechanisms of the Respiratory System. In Thompson's: Special Veterinary Pathology. (Carlton, W.W. and McGavin, M.D., eds.) Second Edition. Mosby-Year Book, Inc. U.S.A. Chapter 3, pp. 117-121.
 - **Luna, L.G.** (1968). Methods for Bacteria, Fungi and Inclusion bodies. In Manual of Histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third edition. McGraw-Hill Book Company. pp. 238-240.
 - **Lunney, J.K.** (1993). Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. Immunol Today. **14**(4): 147-8.
 - **Lunney, J.K.** (1998). Cytokines orchestrating the immune response. Rev sci tech Off int Eiz. **17**(1): 84-94.
 - **Lysnyansky, I., Rosengarten, R. and Yogeve, D.** (1996) Phenotypic switching of variable surface lipoproteins in *Mycoplasma bovis* involves high-frequency chromosomal rearrangements. J Bacteriol. **178**: 5395-5401.
 - **Lloyd, L.C., Buttery, S.H. and Hudson J.R.** (1971). The effect of the galactan and other antigens of *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* on experimental infection with that organism in cattle. J Med Mic. **4**: 425-439.

- **MacOwan, K.J.** (1976). A Mycoplasma from chronic caprine pleuropneumonia in Kenya. Trop. Anim. Hlth. Prod. **8**: 28-36.
- **MacOwan, K.J. and Minette, J.E.** (1977). Contact transmission of experimental contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). Trop Anim Hlth Prod. **9**: 185-188.
- **MacOwan, K.J.** (1984). Infections in ruminants: the current situation. Isr J Med Sci. **20**: 854-858.
- **Maes, D.; Verdonck, M.; Deluyker, H. and de Kruif, A.** (1996). Enzootic pneumonia in pigs. Vet Quart. **18**: 104-9.
- **Maré, C.J. and Switzer, W.P.** (1966). Virus pneumonia of pigs: Propagation and characterization of a causative agent. Am J Vet Res. **27**(121): 1687-93.
- **Marrack, P. y Kappler, J.** (1986) La célula T y su receptor. Investigación y Ciencia. **11**: 16-26.
- **Mathy, N.L., Walker, J. and Lee, R.P.** (1997). Characterization of cytokine profiles and double-positive lymphocyte subpopulations in normal bovine lungs. AJVR. **58**(9): 969-975.
- **McGhee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M. and Kiyono, H.** (1992). The mucosal immune system from fundamental concepts to vaccine development. Vaccine. **10**(2): 75-88.
- **McMartin, D.A., McOwan, K.J. and Swift, L.L.** (1980). A century of classical contagious caprine pleuropneumonia: from original description to aetiology. British Veterinary Journal. **136**: 507-515.
- **Messier, S., Ross, R.F. and Paul, P.S.** (1990). Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am J Vet Res. **51**: 52-8.
- **Messier, S. and Ross, R.F.** (1991). Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. Am J Vet Sci. **52**(9): 1497-502.
- **Mínguez, I., Rueda, A., Domínguez, J. And Sánchez-Vizcaino, J.M.** (1988). Double Labeling Immunohistological study of African Swine Fever Virus-infected Spleen and Lymph Nodes. Vet Pathol. **25**: 193-198.
- **Mohan, K. and Obwolo, M.J.** (1990). *Mycoplasma ovipneumoniae* pathogenesis in experimentally infected sheep and goats. IOM Letters, Program and Abstracts, 8th Int. Congr. IOM, July 8-12, Istambul, Turkey. **1**: 355-356.

-
- **Montgomery, P.C., Cohon, J. and Lally, E.T.** (1974). The induction and characterization of secretory antibodies. Adv Exp Med Biol. **45**(0): 453-62.
 - **Moore, B.W.** (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. Biochem Biophys Res Comm. **19**(6): 739-744.
 - **Morin, P.** (1987). Les pleuropneumonies contagieuses caprines á Mycoplasmes. Revue bibliographique. Thèse méd. Vét.: Nantes, N° 67.
 - **Morris, C.R., Gardner, I.A., Hietala, S.K. Carpenter, T.E., Anderson, R.J. and Parker, K.M.** (1994). Persistence of passively acquired antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. Prev Vet Med **21**: 29-41.
 - **Morrison, R.B., Pijoan, C. and Leman, A.D.** (1986). Association between enzootic pneumonia and performance. Pig News and Information. **7**: 23-30.
 - **Mossmann, T.R. and Coffman R.L.** (1989). Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology. **7**: 145-173.
 - **Mugera, G.M. and Kramer, T.T.** (1967). Pasteurellosis in Kenya goats due to *Pasteurella haemolytica*. Bull epizoot Dis Afr. **15**: 125-131.
 - **Murtaugh, M.P.** (1994). Porcine cytokines. Vet Immunol Immunopathol. **43**: 37-44.
 - **Nash, A.D., Barcham, G.J., Andrews, A. E. and Brandon, M.R.** (1992). Characterisation of ovine alveolar macrophages: regulation of surface antigen expression and cytokine production. Vet Immunol Immunopathol. **31**: 77-94.
 - **Navarro, J.A., Caro, M.R., Seva, J., Rosillo, M.C., Gómez, M.A. and Gallego, M.C.** (1996). Study of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and secondary lymphoid organs in the goat using monoclonal antibodies to surface markers of bovine lymphocytes. Vet Immunol Immunopathol. **51**: 147-156.
 - **Ngatia, T.A., Kimberling, C.V., Johnson, L.W., Whiteman, C.E. and Laueremann, L.H., Jr.** (1986). Pneumonia in goats following administration of live and heat-killed *Pasteurella haemolytica*. J Comp Pathol. **96**: 557-564.
 - **Nicholas, R.A.J., Bashiruddin, J.B., Santini, F.G., Regalla, J. and Taylor, T.K.** (1994). Evaluation of a Polymerase Chain Reaction for Contagious Bovine Pleuropneumonia in naturally infected cattle. IOM Letters **3**: 15 (Abstract).

- **Nicholas, R.** (1998). The veterinary significance of mycoplasmas. In *Mycoplasma protocols*. Vol. 104: Methods in Molecular Biology. (Miles and Nicholas, eds.). Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 17-23.
- **Nicolet, J.** (1996). Animal mycoplasmoses: a general introduction. Rev Sci Tech Off Int Epiz. **15**(4), 1233-1240.
- **OIE** (1994). Resoluciones adoptadas el 20 de Mayo de 1994 por el Comité Internacional de la OIE durante la 62ª Sesión General (París, 16-20 de Mayo de 1994). Resolución N° XI. Infecciones por micoplasmas en los bovinos, ovinos y caprinos: métodos de diagnóstico y control sanitario. OIE Bulletin Mayo 1994, Vol 106, n° **5**: 367-368.
- **Ojo, M.O.** (1975). Caprine pneumonia. III. Biochemical characterization and serological types of pasteurellae. Nigerian J. Anim. prod. **2**: 216-221.
- **Ojo, M.O.** (1976). Caprine pneumonia IV: Pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* and caprine strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* for goats. J Comp Pathol. **86**: 519-529.
- **Ojo, M.O. and Ikede, B.O.** (1976). Pathogenicity of *Mycoplasma agalactiae* subsp *bovis* in goat mammary gland. Vet Microbiol. **1**: 19-22.
- **Okada, M., Asai, T., Ono, M., Sakano, T. and Sato, S.** (2000). Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs immunized with *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine prepared from broth culture supernate. Vaccine **18**: 2825-2831.
- **Okoh, A.E. and Ocholi, R.A.** (1986). Disease associated with *Mycoplasma mycoides*, subspecies *mycoides* in sheep in Nigeria. Vet Rec **118**: 212.
- **Osterrieder, N. and Wolf, E.** (1998). Lessons from gene knockouts. Rev sci tech Off int Eiz. **17**(1): 351-364.
- **Pabst, R. and Binns, R.M.** (1994). The immune system of the respiratory tract in pigs. Vet Immunol Immunopathol. **43**: 151-156.
- **Pabst, R.** (1995). Mucosa-associated lymphoid tissue. Only one part of the dynamic lung lymphoid system. In *Asthma and rhinitis*. (Holtage, S.T. and Busse, W.W.). Cambridge, Mass: Blackwell. pp. 415-425.
- **Pankow, W. and Wichert, P.** (1988). M cell in the immune system of the lung. Respiration. **54**(4): 209-19.
- **Pegram, R.G.** (1974). Serological types of *Pasteurella haemolytica* isolates from sheep and goats in the Somali Democratic Republic. Trop Anim Hlth Prod. **6**: 189-191.

- **Perreau, P., Cuong, T. and Vallée, A.** (1972). Isolement d'un mycoplasme du groupe *Mycoplasma mycoides* var. *capri* à partir d'un lait de mammite chez la chèvre. (Isolation of a mycoplasma strain of the group *Mycoplasma mycoides* var. *capri* from mastitic goat milk). Bull Acad Vet France. **45**: 109-116.
- **Perreau, P.** (1979a). Mycoplasmoses caprine à *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* en France. Bull Acad Vét Fr. **52**: 575-581.
- **Perreau, P.** (1979b). Les mycoplasmoses de la chèvre. Cah Méd Vét. **48**: 71-85.
- **Perreau, P. and Bind, J.L.** (1981). Infection naturelle du veau par *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (biotype cheure). Bulletin Academie Veterinaire France. **54**: 491-496.
- **Perreau, P.** (1980-1982). Rapports de mission de consultation dans le Sud Tunisien: 1. Sur une épidémie de pleuropneumonie contagieuse caprine. 2. Pleuropneumonie contagieuse de la chèvre et programme d'enquête sanitaire globale. IEMVT. Maisons-Alfort, Francia.
- **Perreau, P.** (1984). Les mycoplasmoses de la chèvre in "Les maladies de la chèvre", Niort (France). Colloque de l'INRA N° 28. Uvpre et érom Ed. 245-256.
- **Perreau, P., Breard, A. and Goff C.** (1984). Infection Expérimentale de la chèvre par les souches de mycoplasmes de type F38. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). **135** A: 119-124.
- **Pescovitz, M.D., Sakopoulos, A.G., Gaddy, J.A., Husmann, R.J. and Zuckermann, F.A.** (1994). Porcine peripheral blood CD4⁺/CD8⁺ dual expressing T-cells. Vet Immunol Immunopathol. **43**: 53-62.
- **Picavet, D.P.** (1991). La pleuropneumonie contagieuse de la chèvre (PPCC). Revue Méd. Vét. **142**(5): 377-387.
- **Pijoan, C.** (1999). Interacciones y epidemiología en enfermedades respiratorias del cerdo. XXXII Semana Nacional del Ganado Porcino (SEPOR '99). Murcia, España. pp. 7-14.
- **Plopper, C.G., Haisiek, J.G., Weir, A.J., St. George, J.A. and Hyde, D.M.** (1989). Tracheobronchial epithelium in the adult Rhesus Monkey: A quantitative histochemical and ultrastructural study. Am J Anat. **184**: 31-40.
- **Poveda, J.B.** (1998). Biochemical Characteristics in Mycoplasma Identification. In Methods in Molecular Biology, vol. 104: Mycoplasma Protocols, (Miles and Nicholas, eds.). Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 69-78.

- **Ramírez, A.S., González, M., Déniz, S., Fernández, A. And Poveda, J.B.** (1998). Evaluation of a modified SP-4 medium in the replication of *Mycoplasma spp.* In Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics (Edited by Leori, G., Santini, F., Scanziani, E. and Frey J.). EUR 18018, COST, European Commission. European Communities Official Publications Office, Luxembourg. Vol. 2, pp. 36-39.
- **Ramos-Vara, J.A., Domingo, M., Miller, E., et al.** (1992). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS, SIRS): experimental infection of pregnant sows (abstr 43), in Proceedings 43rd Annu Meet Am Coll Vet Pathol **29**: 432.
- **Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., López, E., Prats, N. and Brevik, L.** (1994). Reactivity of polyclonal human CD3 antiserum in lymphoid tissues of cattle, sheep, goats, rats and mice. AJ Vet Res. **55**(1): 63-66.
- **Rapapport, E. and Bar-Moshe, B.** (1984). *Mycoplasma mycoides* in goats in Israël: clinical epidemiology and preventive aspects. Les maladies de la chèvre. Niort (France), 9-11 octobre. Ed. INRA Publ.. (Les Colloques de l'INRA, N° 28. 257-262.
- **Rapapport, E. and Levinshon, S.** (1993). Mycoplasmas udder pathogens. Symposium de ordeño mecánico, Budapest.
- **Razin, S.** (1969). The Mycoplasma membrane. In The Mycoplasmataceae and the L-phase of bacteria, (Hayflick, ed.). New York, Meredith Corporation. pp. 317-348.
- **Razin, S.** (1978). The mycoplasmas. Microbiol. Rev. **42**(2): 414-470.
- **Razin, S.** (1979). Isolation and characterization of micoplasma membranes. In The Mycoplasmas, vol. I: Cell Biology, (Barile and Razin, eds.). Academic Press. pp.337-343.
- **Razin, S. and Freundt, E.A.** (1984). The mycoplasmas. In Bergeys's manual of systemetic bacteriology, vol I, 9ª edición, (Krieg and Holt, eds.). The Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 740-793.
- **Razin, S. and Barile, M.F.** (1985). The Mycoplasmas. In Mycoplasma Pathogenicity. ACADEMIC PRESS, INC. Vol IV, pp. 69-70.
- **Real, F., Deniz, S., Acosta, B., Ferrer, O. and Poveda, J.B.** (1994). Caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* in the Canary Islands. Vet Rec. **135**(1): 15-16.

-
- **Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Melefyf, R. and Liu, Y.J.** (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. Science. **283**: 1183-1186.
 - **Rodríguez, F., Bryson, D.G., Ball, H.J. and Forster, F.** (1996a). Pathological and immunohistological studies of natural and experimental *Mycoplasma bovis* pneumonia in calves. J Comp Path. **115**: 151-162.
 - **Rodríguez, F., Kennedy, S., Bryson, T.D., Fernandez, A., Rodriguez, J.L. and Ball, H.J.** (1996b). An immunohistochemical method of detecting Mycoplasma species antigens by use of monoclonal antibodies on paraffin sections of pneumonic bovine and caprine lungs. J Vet Med. **43**(7): 429-38.
 - **Rodríguez, J.L.** (1993). Estudio estructural y ultraestructural de las lesiones pulmonares inducidas por la infección natural y experimental de micoplasmas del grupo "*M. mycoides*" (Aislados en Gran Canaria). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
 - **Rodríguez, J.L., Poveda, J.B., Gutiérrez, C., Acosta, B. and Fernández, A.** (1994). Polyarthrititis in kids associated with *Mycoplasma putrefaciens*. Vet Rec. **135**: 406-407.
 - **Rodríguez, J.L., DaMassa, A.J. and Brooks, D.L.** (1996c) Caprine abortion following exposure to *Mycoplasma capricolum* subspecies *capricolum*. J Vet Diag Invest. **8**: 492-494.
 - **Rodríguez, J.L., Poveda, J.B., Rodríguez, F., Espinosa de los Monteros, A., Ramírez A.S. and Fernández, A.** (1996d). Ovine infectious keratoconjunctivitis caused by *Mycoplasma agalactiae*. Small Rumin Res. **22**: 93-96.
 - **Rodwell, A.W., Peterson, J.E. and Rodwell, E.S.** (1972). Pathogenic mycoplasmas. Ciba Foundation Symposium, Elsevier, Amsterdam and London, p: 123.
 - **Rosati, S., Robino, P., Fadda, M., Pozzi, S., Mannelli, A. and Pittau, M.** (2000). Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. Vet Microbiol. **71**: 201-210.
 - **Rosendal, S., Erno, H. and Wyand, D.S.** (1979). *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* as a cause of polyarthrititis in goats. J Am Vet Med Assoc **175** (4): 378-380.
 - **Rosendal, S.** (1981). Experimental infection of goats, sheep and calves with the large colony type of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. Vet Pathol. **18**: 71-81.
 - **Rosendal, S.** (1983). Susceptibility of goats and calves after experimental inoculation or contact exposure to a canadian strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* isolated from a goat. Can J Comp Med. **47**: 484-490.

-
- **Rosendal, S.** (1984a). Effect of the caprine variant of *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* on endothelium, monocytes, and complement of guinea pig, calf, sheep and goat serum. Am J Vet Res. **45**: 2396-2402.
 - **Rosendal, S.** (1984b). Pathogenetic mechanisms of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* septicemia in goats. Isr J Med Sci. **20**: 970-971.
 - **Rosendal, S.** (1988). Mycoplasma. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 205-215.
 - **Rosendal, S.** (1994). Ovine and Caprine Mycoplasmas. In Mycoplasmosis in Animals. Laboratory diagnosis. (Whitford, H.W., Rosenbusch, R.F. and Laueran, L., eds.). Iowa University Press. pp. 84-96.
 - **Rosengarten, R. and Wise, K.S.** (1990). Phenotypic switching in mycoplasmas: phase variation of diverse surface lipoproteins. Science. **247**: 315-318.
 - **Rosengarten, R., Behrens, A., Stetefeld, A., Heller, M., Ahrens, M., Sachse, K. Yogeve, D. and Kirchhoff, H.** (1994). Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrane surface proteins. Infect Immun. **62**: 5066-5074.
 - **Rosengarten, R. and Yogeve, D.** (1996). Variant colony surface antigenic phenotypes within mycoplasma populations: implications for species identification and strain standardization. J Clin Microbiol. **34**: 149-158.
 - **Ross, R.F., and Young, T.F.** (1993). The nature and detection of mycoplasmal immunogens. Vet Microbiol. **37**: 369-380.
 - **Ruhnke, H.L., Rosendal, S., Goltz, J. and Blackwell, T.E.** (1983). Isolation of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* from polyarthritis and mastitis of goats in Canada. Canadian Veterinary Journal. **24**: 54-56.
 - **Saalmüller, A. and Bryant, J.** (1994). Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines. Vet Immunol Immunopathol. **43**: 45-52.
 - **Saalmüller, A., Hirt, W., Maurer, S. and Weiland, E.** (1994). Discrimination between two subsets of porcine CD8⁺ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen. Immunology. **81**(4): 578-83.
 - **Saalmüller, A.** (1996). Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. Immunol Today. **17**(8): 352-4.
 - **Saalmüller, A.** (1998). Antigen-specific immune response of porcine T lymphocytes to various pathogens. Rev sci tech Off int Eiz. **17**(1): 71-83.

- **Sabatini, D.D., Bensch, K. and Barnett, R.J.** (1963). Cytochemistry and electronmicroscopy: The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. J Cell Biol. **17**: 19-58.
- **Saif, L.J. and Bohl E.H.** (1986). Transmissible gastroenteritis. In Diseases of Swine (Leman, A.D., Straw, B., Glock, R.D., Mengeling, W.L., Penny, R.H.C. and Scholl, E. eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa pp. 255-274.
- **Sánchez-Vizcaíno, J.M.** (2000). Curso de Introducción a la Inmunología Porcina. En <http://www.3tres3.com>.
- **Sharp, J.M., Gilmuor, N.J.L., Thompson, D.A. and Rushton, B.** (1978). Experimental infection of specific pathogen-free lambs with *Parainfluenza virus* type 3 and *Pasteurella haemolytica*. J Comp Pathol. **88**: 237- 243.
- **Sheldrake, R.F.** (1990). IgA Immune responses in the respiratory tract of pigs. Res Vet Sci. **49**: 98-103.
- **Sheldrake, R.F., Romalis, L.F. and Saunders, M.M.** (1993). Serum and mucosal antibody responses against *Mycoplasma hyopneumoniae* following intraperitoneal vaccination. Res Vet Sci. **55**: 371-6.
- **Simionescu, M. and Simionescu, N.** (1991). Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. Cell Biology Reviews. **25**: 1-78.
- **Singh, N., Rajya, B.S. and Mohanty, G.C.** (1974). Granular vulvovaginitis (GVV) in goats associated with *Mycoplasmas agalactiae*. Cornell Vet. **64**: 435-442.
- **Sorensen, V., Ahrens, P., Barford, K., Feenestra, A.A., Feld, N.C., Friis, N.F., Bille-Hansen, V., Jensen, N.E. and Pedersen, M.W.** (1997). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. Vet Microbiol. **54**: 23-34.
- **Stanbridge, E. and Reff, M.E.** (1979). The molecular biology of Mycoplasma. In The Mycoplasma. vol. I: Cell Biology (Barile and Razin, eds.). Academic Press. pp. 157-186.
- **Stenger, S., Hanson, D.A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K.R., Froelich, C.J., Ganz, T., Thomas-Uszynski, S., Melian, A., Bogdan, C., Porcelli, S.A., Bloom, B.R., Krensky, A.M. and Modlin, R.L.** (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science. **282**(5386): 121-5.
- **Stott, E.J., Thomas, L.H., Howard, C.J. and Gourlay, R.N.** (1987). Field trial of a quadrivalent vaccine against calf respiratory disease. Vet Rec. **121**(15): 342-7.

-
- **Strasser, M.; Abiven, P.; Kobisch, M. and Nicolet, J** (1992). Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*. Vet Immunol Immunopathol. **31**: 141-53.
 - **Sugimura, M., Shirogane, D., Atoji, Y., Suzuki, Y., Ohshima, K., Kon, Y. and Hashimoto, Y.** (1990). A comparative study on S-100 protein-immunoreactive cells in lymph nodes. Jpn J Vet Sci. **52**(5): 1015-1021.
 - **Suter, M.M.** (1990). Immunopathology. In Mechanisms of Disease: A Textbook of Comparative General Pathology. (Slauson, D.O. and Cooper, B.J., eds.) Second Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A. Chapter 5, pp. 302-376.
 - **Swanepoel, R., Efstratiou, S. and Blackburn, N.K.** (1977) *Mycoplasma capricolum* associated with arthritis in sheep. Vet Rec **101**(22):446-7.
 - **Switzer, W.P.** (1955). Studies on infectious atrophic rhinitis: IV Characterization of a pleuropneumonia-like organism isolate from the nasal cavities of swine. Am J Vet Res. **16**: 540-544.
 - **Switzer, W.P.** (1967). Swine mycoplasma. J Am Vet Med Assoc **151**: 1656-1661.
 - **Tajima M, Yagihashi T, Nunoya T, Takeuchi A, Ohashi F.** (1984). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs immunosuppressed by thymectomy and treatment with antithymocyte serum. Am J Vet Res. **45**(10): 1928-32.
 - **Taylor, G, Taylor-Robinson, D. and Fernald, G.W.** (1974). Reduction in the severity of *Mycoplasma pneumoniae*-induced pneumonia in hamsters by immunosuppressive treatment with antithymocyte sera. J Med Microbiol. **7**(3): 343-8.
 - **Taylor, T.K., Bashiruddin, J.B. and Gould, A.R.** (1992). Relationships between members of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by DNA probes and sequence analysis. Int J Syst Bacteriol. **42**(4): 593-601.
 - **Taylor-Robinson, D., Furr, P.M., Davies, H.A., Manchee, R.J. Mouches, C. and Bove, J.M.** (1981). Mycoplasma adherence with particular reference to the pathogenicity of *Mycoplasma pulmonis*. Isr J Med Sci. **17**: 599-603.
 - **Taylor-Robinson, D.** (1989). The *Mycoplasmatales*: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Spiroplasma* and *Anaeroplasmata*. In The Prokaryotes. (Balows, Truper, Dworkin, Harder and Schleifer, eds.). Springer-Verlag, New York. pp. 664-681.

-
- **Ter Laak, E.A. and Noordergraaf, J.H.** (1987). An improved method for the identification of *Mycoplasma dispar*. Vet Microbiol. **14**(1): 25-31.
 - **Thiaucourt, F., Breard, A., Lefèvre, P.C. and Mebratu, G.Y.** (1992). Contagious caprine pleuropneumonia in Ethiopia. Vet Rec. **131**(25-26): 585.
 - **Thiaucourt, F., Bölske, G., Libeau, G., Le Goff, C. and Lefèvre, P.C.** (1994). The use of monoclonal antibodies in the diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). Vet Microbiol. **41**: 191-203.
 - **Thomas, L.H., Cook, R.S., Howard, C.J., Gaddum, R.M. and Taylor, G.** (1996). Influence of selective T-lymphocyte depletion on the lung pathology of gnotobiotic calves and the distribution of different T-lymphocyte subsets following challenge with bovine respiratory syncytial virus. Research in Veterinary Science. **61**: 38-44.
 - **Thome, M., Hirt, W., Pfaff, E., Reddehase, M.J. and Saalmüller, A.** (1994). Porcine T-cell receptor: molecular and biochemical characterization. Vet Immunol Immunopathol. **43**: 13-18.
 - **Thompsen, B.L., Jorsal, S.E., Andersen, S. and Willeberg, P.** (1992). The Cox regression model applied to risk factor analysis of infections in the breeding and multiplying herds in the Danish SPF system. Prev Vet Med. **12**: 287-97.
 - **Tizard, I.** (2000) Veterinary Immunology: An Introduction. Sixth Edition. (Saunders, W.B. ed.). A Harcourt Health Sciences Company, U.S.A. Chapters: 4, 6, 7, 9, 10, 11 and 12.
 - **Topley and Wilson's.** (1990). The Mycoplasmatales: Mycoplasma, Ureaplasma, Acholeplasma, Spiroplasma and Anaeroplasmata. In Principles of bacteriology, virology and immunity. Eighth Edition. (Ton Parker, M. and Duerden B.I. eds.). **2**: 663-681.
 - **Torres, J.M.** (1997). Inmunidad en mucosas. Porci. **42**: 13-23.
 - **Truscott, R.B. and Finley, G.G.** (1984) Studies on *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC) in Lambs and Calves. Can J Comp Med. **49**: 233-234.
 - **Tully, J.G., Barile, M.F., Edward, D.G., Theodore, T.S. and Erno, H.** (1974). Characterization of some caprine mycoplasmas, with proposals for new species, *Mycoplasma capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*. J Gen Microbiol. **85**: 102-120.

-
- **Tully, J.G.** (1992). Mollicutes (Mycoplasmas). In Encyclopedia of Microbiology. (Lederberg ed.), Rockefeller University, Academic Press, Inc., New York. Vol. III, pp. 181-191.
 - **Valdivieso-García, A., Rosendal, S. and Maxie, M.G.** (1982). Biological effects of sonicated suspension and phenol-water extract of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in goats. Can J Comp Med. **46**: 190-197.
 - **Varsano, S., Basbaum, C.B., Forsberg, L.S., Borson, D.G., Caughey, G. and Nadel, J.A.** (1987). Dog tracheal epithelial cells in culture synthesise sulfated macromolecular glycoconjugates and release them from the cell surface upon exposure to extracellular proteinases. Experimental Lung Research. **13**: 157-184.
 - **Villalba, E., Poveda, J.B., Fernández, A., Rodríguez, J.L., Gutiérrez, C. and Gómez-Villamandos, J.C.** (1992). An outbreak caused by *Mycoplasma mycoides* species in goats in the Canary Islands. Vet Rec. **130**: 330-331.
 - **Walker, J., Lee, R., Mathy, N., Doughty, S. and Conlon, J.** (1996). Restricted B-cell responses to microbial challenge of the respiratory tract. Vet Immunol Immunopathol. **54**: 197-204.
 - **Wallgren, P., Bölske, G. and Fossum, C.** (1992). In vitro stimulation of antibody production to *Mycoplasma hyopneumoniae* by porcine peripheral blood mononuclear cell. Vet Microbiol. **32**: 363-374.
 - **Wallgren, P., Wilén, I. and Fossum, C.** (1994). Influence of experimentally induced endogenous production of cortisol on the immune capacity of swine. Vet Immunol Immunopathol. **42**: 301-316.
 - **Wilton, J.L., Scarman, L.A., Walker, M.J. and Djordjevic, S.P.** (1998). Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Microbiology. **144**: 1931-1943.
 - **Winkler, G.C. and Cheville, N.F.** (1985). Monocytic origin and postnatal mitosis of intravascular macrophages in the porcine lung. J Leukoc Biol. **38**(4): 471-80.
 - **Winkler, G.C.** (1988). Pulmonary Intravascular Macrophages in domestic animal species: Review of structural and functional properties. Am J Anat. **181**: 217-234.
 - **Wolf, J.L., Rubin, D.H., Finberg, R., Kauffman, R.S., Sharpe, A.H., Trier, J.S. and Fields, B.N.** (1981). Intestinal M cells: a pathway for entry of reovirus into the host. Science. **212**(4493):471-2.
 - **Wyatt, C.R., Madruga, C., Cluff, C., Parish, S., Hamilton, M.J., Goff, W. And Davis, W.C.** (1994). Differential distribution of γ - δ T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. Vet Immunol Immunopathol. **40**: 187-199.

-
- **Young, T.F., Thacker, E.L., Erickson, B.Z. and Ross, R.F.** (2000). A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. Vet Microbiol. **71**: 269-279.
 - **Zhang, Q., Young, T. and Ross, R.F.** (1995). Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. Infect Immun. **63**(3): 1013-19.
 - **Zielinski, G. and Ross, R.F.** (1993). Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. Am J Vet Res. **54**: 1262-1269.
 - **Zuckermann, F.A. and Gaskins, H.R.** (1996). Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. Immunology. **87**: 493-499.
 - **Zuckermann, F.A. and Husmann, R. J.** (1996). Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cell. Immunology. **87**: 500-512.
 - **Zuckermann, F.A.** (1999). Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. Vet Immunol Immunopathol. **72** (1-2): 55-66.

ANEXO

Anexo: Tabla resumen de las citocinas citadas en la revisión bibliográfica, sus células blanco y actividad.

Citocina	Abreviaturas	Célula Blanco	Actividad
Interferón-g	IFN- γ	- Fagocitos mononucleares, células endoteliales y células NK	- Activación, regulación de la expresión de MHC I y MHC II
Factor de Necrosis Tumoral-a	TNF- α	- Hipotálamo - Células hepáticas - Neutrófilos, células endoteliales, timocitos - Músculo y grasa	- Fiebre - Liberación de proteínas de fase aguda - Activación, proliferación, cofactor en la estimulación del sistema inmune - Catabolismo (caquexia)
Interleucina-1	IL-1	- Células hepáticas - Células endoteliales, linfocitos - Músculo y grasa	- Liberación de proteínas de fase aguda - Activación, proliferación, cofactor en la estimulación del sistema inmune - Catabolismo (caquexia)
Interleucina-2	IL-2	- Linfocitos T - Linfocitos B, células NK	- Factor de crecimiento, producción de citocinas - Crecimiento y activación
Interleucina-4	IL-4	- Linfocitos B - Fagocitos mononucleares	- Estimulante de Th2, estimulante de la producción de IgG e IgE - Activación e inhibición
Interleucina-5	IL-5	- Eosinófilos - Células B	- Activación - Crecimiento, diferenciación, secreción de IgM, activación para la secreción de IgG
Interleucina-6	IL-6	- Timocitos - Células hepáticas - Linfocitos B maduros - Progenitores hematopoyéticos	- Cofactor para la estimulación del sistema inmune - Liberación de proteínas de fase aguda - Factor de crecimiento - Proliferación y diferenciación
Interleucina-8	IL-8	- Monocitos, linfocitos - Células progenitoras	- Factor quimiotáctico - Modulación del crecimiento
Interleucina-9	IL-9	- Th2 - Células eritroides, mastocitos	- Mantiene el crecimiento - Señal coestimuladora con otras citocinas
Interleucina-10	IL-10	- Th1 - Monocitos, neutrófilos - Mastocitos, eosinófilos	- Inhibición de la síntesis de citocinas - Inhibición de la síntesis de citocinas - Inhibición de la diferenciación
Interleucina-12	IL-12	- Macrófagos - Células NK - Linfocitos T	- Inducción de la producción de IFN- γ - Inducción de la producción de IFN- γ , activación - Estimula la diferenciación hacia tipo 1
Interleucina-13	IL-13	- Células premieloides - Monocitos, Linfocitos B - Monocitos activados	- Inducción de la proliferación - Inducción de la activación y proliferación - Inhibición de la producción de citocinas inflamatorias
Factor Estimulador de Colonias-Granulocitos y Macrófagos	GM-CSF	- Células progenitoras de la médula ósea	- Crecimiento y diferenciación hacia granulocitos y macrófagos.

(Domínguez y Alonso, 1991; Murtaugh, 1994; Lunney, 1998)