

ESTUDIO LECTINHISTOQUÍMICO DEL APARATO MUCOCILIAR DE POLLOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Mycoplasma gallisepticum* Y TRATADOS CON MUCOLÍTICO Y ANTIBIÓTICO

MA Petruccelli, MV Piscopo, MF Unzaga, RO Cerdá, FP Marino

Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: La micoplasmosis aviar es una enfermedad que produce importantes pérdidas económicas, no sólo por la mortandad sino también por sus efectos en la conversión alimenticia. Afecta principalmente el árbol respiratorio siendo estos exacerbados por la presencia de otros agentes. El mucus es una barrera natural de protección no solo física sino también inmunológica, cuya composición química son principalmente glicoconjugados, los que pueden determinarse a través de técnicas de lectinhistoquímica. El objetivo del presente trabajo fue el de determinar si la bromhexina y el Aivlosin™, solos o combinados modifican el tipo de glicoconjugados encontrados en la respuesta secretoria producidos por el aparato mucociliar extrapulmonar (AMEP) e intrapulmonar (AMIP). Se utilizaron 45 pollitos BB de un día de vida, los que se dividieron en 4 grupos, A) inoculado con *M. gallisepticum* B) inoculado con *M. gallisepticum* y medicado con bromhexina, C) inoculado con *M. gallisepticum* y medicado Aivlosin™ D) grupo inoculado con *M. gallisepticum* y con el mucolítico y el antibiótico. Los animales fueron sacrificados 10 días posinoculación y 5 y 15 días pos tratamiento. Tráqueas y pulmones fueron sometidos a la técnica de lectinhistoquímica, utilizando las lectinas WGA, DBA y UEA. Se detectó pérdida de reactividad de la lectina UEA en las células calcificiformes del AMEP y de todos los componentes del AMIP para la lectina DBA. La pérdida de reactividad para ambas lectinas fue observada a partir de los 5 días pos tratamiento en los tres grupos de animales medicados.

PALABRAS CLAVES: Lectinas, aparato respiratorio, pollos.

LECTINHISTOCHEMICAL STUDIES OF THE MUCOCILIAR APPARATUS OF BROILERS CHALLENGED BY *Mycoplasma gallisepticum* AND MEDICATED WITH A MUCOLYTIC AND ANTIBIOTIC

ABSTRACT: Avian Mycoplasmosis is an economically important disease that affects the respiratory tracts of broilers, particularly when present with other respiratory pathogens. Mucous epithelia, which are in contact with the environment, are covered with mucus that acts as a selective barrier. Mucus is composed mainly by glycoconjugates that could be detected by using lectinhistochemistry. To determine the detailed action of bromhexine and aivlosin, on the extrapulmonary and intrapulmonary mucociliar apparatus, we investigated lectinhistochemically the effect of each agent or a combination of both on the respiratory tract of broilers inoculated with *M. gallisepticum*. Forty five one day old broilers were divided in 4 groups; group A) inoculated with *M. gallisepticum*, group B) inoculated with *M. gallisepticum* and medicated with bromhexine, group C) inoculated with *M. gallisepticum* and medicated with aivlosin, and group D) inoculated with *M. gallisepticum* and medicated with both. Animals were killed 10 days post infection and 5 and 15 days post treatment. Trachea and lungs were stained by lectinhistochemistry using WGA, DBA and UEA lectins. We detected loss of reactivity of UEA on goblets cells presents in the extrapulmonary mucociliar apparatus. We also detected loss of reactivity to all the components of intrapulmonary mucociliar apparatus when using DBA. This loss of reactivity was observed after 5 days on the three groups of medicated animals.

KEY WORDS: Lectins, broilers, mucociliar apparatus.

Fecha de recepción: 10/10/03

Fecha de aprobación: 13/03/04

Dirección para correspondencia: Miguel A. Petruccelli, Casilla postal 296. (B1900AVW) La Plata, Argentina. Tel. (54- 221- 4834237).

E-mail: petru@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La infección por *Mycoplasma gallisepticum* y la signología clínico-patológica por ella producida, conocida como enfermedad respiratoria crónica (ERC), se caracteriza en pollos de engorde, por estertores respiratorios, tos y secreciones nasales. Estos signos, en ciertos casos, se ven exacerbados por la presencia de otros agentes bacterianos como *Escherichia coli* o víricos como el virus de la bronquitis infecciosa (1, 2).

La mucosa de la tráquea, en contacto con el medio ambiente, está cubierta con un mucus protector que actúa como una barrera fisicoquímica inespecífica e inmunológica específica y que constituye, juntamente con el epitelio ciliar y glándulas tuboalveolares de la lámina propia, el aparato mucociliar. El mucus está constituido por 95 % de agua y 5 % de glicoproteínas llamadas mucinas.

Las mucinas son básicamente glicoproteínas caracterizadas por altos niveles de oligosacáridos unidos a radicales -O glucosídicos (3). Las propiedades reológicas del mucus, como viscosidad y elasticidad, están asociadas a las mucinas intactas. Sin embargo, bajo condiciones patológicas que afecten el tracto respiratorio superior, la respuesta inflamatoria producida, puede inducir diferencias en la composición química de las mucinas y al mismo tiempo en sus propiedades fisico-químicas (4).

Los mucolíticos son una de las armas terapéuticas con que cuenta la industria avícola para paliar o reducir las pérdidas económicas producidas por los cuadros mencionados. La acción y propiedades de los mucolíticos se encuentran en pleno análisis. Sumano y col. (5) discuten si los mucolíticos son capaces de incrementar los fluidos libres de sialoproteínas en las secreciones tráqueo-bronquiales. En cuanto al mecanismo de acción de los mucolíticos si bien se ha discutido sobre este punto, Takeda y col. (6) determinan que la bromhexina altera las propiedades histoquímicas de las glicoproteínas, así como que la acción mucolítica de este agente ocurre dentro de las células secretorias a través de la liberación de enzimas lisosomales, las cuales disuelven enzimáticamente las moléculas de glicoproteínas ácidas del mucus.

Existen referencias relacionadas a la afinidad de las mucinas del tracto respiratorio de tráqueas y pulmones de pavos normales y afectados por neumonía hacia las lectinas (7, 8). Sin embargo la información suministrada es escasa,

fragmentada y sólo referida a casos a campo, en donde las variables no pueden ser controladas. Los mucolíticos y los antibióticos solos o asociados constituyen armas terapéuticas con que cuenta la industria avícola para paliar o reducir las pérdidas económicas producidas por los cuadros respiratorios. La acción y propiedades de los primeros como la bromhexina se encuentran en pleno análisis (6). Dentro de los segundos, el de más reciente presentación es el 3-acetil, 4-isovaleril tartrato de tilosina (Aivlosin™ Vetanco S.A.), obtenido a partir de la tilosina, por técnicas de bioconversión mediante fermentación con *Streptomyces thermotolerans* (9). Sobre este marco teórico, el objetivo del presente trabajo fue el de determinar si la bromhexina y el Aivlosin™, solos o combinados modifican el tipo de glicoconjugados encontrados en la respuesta secretoria producidos por el aparato mucociliar extrapulmonar (AMEP) e intrapulmonar (AMIP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 45 pollitos BB de un día de vida, provenientes de una granja comercial libre de *M. gallisepticum*, los cuales fueron divididos en cuatro grupos, A) grupo control inoculado con *M. gallisepticum* (15 animales), B) grupo inoculado con *M. gallisepticum* y medicado con mucolítico bromhexina, (N-ciclohexil-N-metil (2-amino-3,5-dibromobencil amina, (Bromesol® Vetanco S.A.) (10 animales), C) grupo inoculado con *M. gallisepticum* y medicado con antibiótico, Aivlosin™ (10 animales) y D) grupo inoculado con *M. gallisepticum* y medicado con el mucolítico y el antibiótico (15 animales). Las dosis utilizadas fueron para la bromhexina de 10 mg de droga pura por litro de agua y para el Aivlosin de 0,25 g cada 2 litros de agua de bebida, de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Los animales de los cuatro grupos fueron inoculados simultáneamente con una cepa patógena de *M. gallisepticum* (cepa K-781) a una concentración no menor de 10^8 UFC/ml (unidades formadoras de colonias por ml).

La descarga del inóculo en los pollitos BB se realizó vía aerosol mediante el empleo de un nebulizador de medicina humana. La copita plástica fue cargada con 5 ml del cultivo y colocada en forma vertical dentro de una caja de cartón conteniendo los animales a inocular. El tiempo de exposición fue de 5 min a fin de asegurarse una correcta descarga. Los animales fueron alojados en el mismo ambiente en jaulones separados, con una temperatura media de 31 °C en reducción según normas de manejo, con renovación periódica de

aire. El alimento y agua fueron suministrados "ad libitum" y se inspeccionaron 2 veces al día.

El día 10 posinoculación (dpi) y, previo al comienzo de los diferentes tratamientos, fueron sacrificados 5 animales del grupo A con el objeto de evaluar el efecto del inóculo de *M. gallisepticum*, con posterioridad, se sacrificaron 5 animales por grupo a los 5 y 15 días postratamiento (dpt).

Realizadas las necropsias, se extrajeron tráqueas y pulmones, los que fueron fijados en formol neutro al 10 % y procesados para estudios lectinhistoquímicos de acuerdo a procedimientos anteriormente descritos. En la Tabla 1 se indican las lectinas aplicadas (DAKO Lab. Ca, USA), sus abreviaturas, sus afinidades por los hidratos de carbono y concentraciones utilizadas. Las observaciones de las distintas estructuras del aparato mucociliar de los 4 grupos de animales fueron realizadas por dos operadores, siendo la evaluación cualitativa, positiva o negativa.

RESULTADOS

En la Tabla 2, se indican los resultados obtenidos con las 3 lectinas utilizadas.

Los cambios encontrados en la reactividad hacia las lectinas se observaron a partir de los 5 dpt no modificándose a lo largo de la experiencia.

DISCUSIÓN

Coincidiendo con estudios preliminares, a partir de los 5 dpt, tanto en el grupo control como en los tres grupos medicados, se observó una marcada reactividad de todos los componentes del AMEP y el AMIP a los residuos del ácido siálico por la lectina WGA, estos residuos son importantes receptores para diferentes patógenos, por ejemplo *E. coli* y *Bordetella avium* (7, 8, 10). A partir de los 5 dpt, se encontró una pérdida de reactividad a los residuos de a L-fucosa detectados por la lectina UEA en los tres lotes tratados en las células caliciformes del AMEP, permaneciendo positivo el grupo control inoculado. En nuestro trabajo pre-

Tabla 1. Lectinas utilizadas, abreviatura más usada, afinidad por los carbohidratos y concentración de trabajo.

Table 1: Lectins used in this study COMPLETAR

Lectinas	Abreviatura	Especificidad (a) por los carbohidratos	Concentración (µg/ml)
<i>Ulex europaeus 1</i>	UEA-1	α L-Fuc	30
<i>Dolichus biflorus</i>	DBA	α D-GalNAc	30
<i>Triticum vulgaris</i>	WGA	α D-GlcNAc, NANA	10

(a) Fuc= fucosa, GalNAc= N-acetil galactosamina, GlcNAc= N-acetil glucosamina, NANA= ácido N-acetil neuramínico (ácido siálico).

Tabla 2. Patrón lectinhistoquímico del aparato mucociliar extra e intrapulmonar.

Table 2: Lectins with remarkable changes in the mucociliar apparatus.

Lectinas	WGA				DBA				UEA			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Estructuras/ grupos												
AMEP												
cilias	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Epitelio	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Células caliciformes	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
AMIP												
Epitelio ciliar	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Células caliciformes	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Células del atrio	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Grupos: A: control; B: mucolítico sólo; C: antibiótico sólo D: mucolítico + antibiótico

vio (10) esta lectina fue negativa en los animales controles sin inocular y se incrementó considerablemente en los animales inoculados con *M. gallisepticum*.

La lectina DBA, que detecta residuos de a D-N-acetil galactosamina, no mostró diferencias con trabajos previos en su reactividad con el AMEP (10), sólo fue detectada en las células caliciformes tanto en el grupo control como en los medicados, no siendo posible detectarla en los grupos tratados con mucolítico y/o antibiótico, solos o combinados. Sin embargo en el AMIP, a partir de los 5 dpt, no se pudieron detectar estos residuos, siendo negativo en todas sus estructuras. Estas diferencias son importantes si la comparamos con los animales inoculados sin tratamiento (grupo A), en donde la detección de estos residuos fue muy marcada, incluso en zonas del pulmón con franca neumonía y epitelización alveolar, estos resultados son coincidentes con un estudio anterior en el cual 18 días posinoculación con *M. Gallisepticum*, todos los componentes del AMIP fueron francamente positivos (10). El estudio lectinhistoquímico preliminar, muestra diferencias en 2 residuos de hidratos de carbono entre el grupo sin tratar y los tratados con mucolítico y antibiótico. Es significativa la pérdida de reactividad de la lectina UEA en las células caliciformes del AMEP y de todos los componentes del AMIP para la lectina DBA, en los grupos de animales medicados. Sin embargo, son necesarios estudios con un mayor número de lectinas a los efectos de caracterizar las modificaciones bioquímicas de las mucinas así como el efecto de las drogas suministradas en el aparato mucociliar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fabricant J, Levine PP. Experimental production of complicated chronic respiratory disease infection (air sac disease). Avian Dis. 1963; 6: 13-23.
2. Gross WG. The development of air sac disease. Avian Dis. 1961; 5: 431-439.
3. Perfumo CJ, Mores N, Armocida AD, Piffer IA, Massone AR, Itagaki S. Histochemical and lectinhistochemical studies on nasal mucosa of pigs with or without respiratory diseases. J Vet Med Sci. 1998; 60: 1021-1023.
4. Jones R, Baskerville A, Reid L. Histochemical identification of glycoproteins in pig bronchial epithelium: a) Normal and b) Hypertrophied from enzootic pneumonia. J Pathol. 1974; 116: 1-11.
5. Sumano H, Gracia I, Capistran A, Meade G, Rivero A, Ruiz-Ramirez L. Use of ambroxol and bromhexine as mucolytic for enhanced diffusion of furaltadone into tracheobronchial secretions in broilers. British Poultry Science. 1995; 36: 503-507.
6. Takeda H, Misawa M, Yanaura S. A Role of Lysosomal Enzymes in the Mechanism of Mucolytic action of Bromhexine. Japan. J Pharmacol. 1983; 33: 455-461.
7. Ackerman MR, Cheville NF, Detilleux PG. Lectin histochemistry of trachea and lung of healthy turkeys (*Melleagridis gallopavo*) and turkeys with pneumonia. Vet Pathol. 1991; 28: 192-199.
8. Arp LH, Huffman EL, Hellwig DH. Glycoconjugates as components of receptors for *Bordetella avium* on the tracheal mucosa of turkeys. Am. J Vet Res. 1993; 54: 2027-30.
9. Okamoto R, Fukumoto T, Nomura H, Kiyoshima K. Physico-chemical properties of a new acyl derivatives of tylosin produced by microbial transformation. The journal of Antibiotics. 1980; Nov: 1300-1308.
10. Píscopo MV, Unzaga MF, Cerdá RO, Leotta G, Marino FP, Petruccelli MA. Reacción lectinhistoquímica del aparato mucociliar intra y extra pulmonar de pollos sanos y desafiados con *Mycoplasma gallisepticum*. Memorias 2º RAPAVE (Reunión Argentina de Patología Veterinaria). 27-29 de setiembre de 2000. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes. Argentina. p. 51-52.