



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Veterinarias

Lechiguana en bovinos: aspectos patogénicos de la enfermedad

Presentado por la Med. Vet. Sílvia Regina Leal Ladeira

Director: Dr. Enrique L. Portiansky
Codirector: Dr. Eduardo J. Gimeno

**Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de
Doctor en Ciencias Veterinarias**

Parcialmente realizado en las Cátedras de Patología, Bacteriología e Inmunología, Facultad de Veterinaria, Universidad Federal de Pelotas, Pelotas, Río Grande del Sur, Brasil y la Cátedra de Patología General Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Miembros del Jurado: Dra. Ma. Elisa Etcheverrigaray
Dr. Javier Blanco Viera
Dr. Jorge Pereira

2004

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dio por la vida que me dé.

A Humberto mi marido y Marcelo mi hijo por la comprensión y cariño durante la realización de este trabajo.

A mis padres Vladimir y Juracy por estarme siempre presentes ayudando.

A los profesores Dr. Enrique Leo Portiansky y Dr. Eduardo Gimeno pela orientación y amistad dispensada durante todo el curso de pos graduación.

Al profesor y amigo Dr. Franklin Riet-Correa que estuviera siempre presente en toda la mina carera veterinaria y participó de cada etapa de este trabajo.

A los colegas y amigos del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, en especial a los amigos Méd. Vet. Renata Shramm y Dr. Mario Meireles, por la amistad, colaboración y cariño.

A los funcionarios del laboratorio de Bacteriología, Fernando Lopes y Girlei Garcia por la limpieza de los materiales y elaboración de los medios.

A los colegas y amigos del Laboratorio Regional del Diagnostico y Patología, en especial Zuleica Rayné, João Luiz Montiel Ferreira, Margarida Buss Raffi, Ana Lúcia Schild, João Francisco Nunes, Mauro Pereira Soares, Rosária Azambuja y Simone Silva por tiñeren alguna participación en la elaboración de este trabajo.

A los colegas José Carlos Sandrini y Enilda Souza de Oliveira por la elaboración del material y medios de cultivo para la realización de los cultivos celulares.

A los estagiários y bolsitas que trabajaran en las diversas etapas de este proyecto y que sin ellos no seria posible a realización de este trabajo, en especial Daniela Brayer Pereira, Cléia Milheira Cardoso, Mara Rubia Romeu Pinto , Virgínia Santiago Silva, Bruna da Rosa Curcio, Dário Milanez de Melo y Dagoberto Brito.

A mis amigas y compañeras Fabiane Gomes y Lisiane Martins que muy trabajaran en este tema y mismo a la distancia siempre acreditaran en nuestro trabajo.

A los colegas Med. Vet. Luiz Filipe Schuch y Helen Coimbra pela amistad y persistencia en la elaboración del PCR.

A mi amiga Josiane Bonel Raposo que compartió todas las dificultades en la realización de este trabajo y siempre tuve una palabra de cariño.

A dirección de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Federal de Pelotas y al Departamento de Veterinaria Preventiva por el apoyo y atención.

Al Dr. Thomaz Lucia Júnior por los dados estadísticos.

A todos que de alguna forma participaron de la realización de esta tese.

A FAPERGS por el auxilio financiero.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS.....	6
A. RESUMEN.....	7
B. PALABRAS CLAVE.....	7
C. SUMMARY	8
D. KEY WORDS.....	8
E. INTRODUCCION.....	9
E.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD.....	9
E.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS LESIONES OBSERVADAS EN LA ENFERMEDAD	10
E.3. ETIOLOGÍA PRESUNTIVA.....	12
<i>E.3.1. Etiología bacteriana</i>	12
E.3.1.1. Características culturales de la bacteria.....	12
<i>E.3.2. Etiología parasitaria</i>	13
E.4. ESTUDIOS EXPERIMENTALES.....	15
E.5. TRATAMIENTO	18
F. OBJETIVOS	19
F.1. OBJETIVOS GENERALES	19
F.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
G. MATERIALES Y METODOS	20
G.1 ANIMALES.....	20
G.2. PRODUCCIÓN EXPERIMENTAL DE LARVAS DE <i>D. HOMINIS</i>	20
G.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE <i>M. GRANULOMATIS</i>	21
G.4. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	21
G.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	21
G.6. AMPLIFICACIÓN ALEATORIA DEL POLIMORFISMO DEL DNA (RAPD)	21
G.7. CULTIVO DE FIBROBLASTOS	23
G.8. ESTIMULACION MACROFAGICA DE FIBROBLASTOS CULTIVADOS	24
G.9. ESTUDIOS ESTADISTICOS	25
G.10. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	25
H. RESULTADOS	27
H.1. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE <i>M. GRANULOMATIS</i>	27
H.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>M. GRANULOMATIS</i>	33
H.3. EFECTO DE LA <i>M. GRANULOMATIS</i> SOBRE CULTIVO DE FIBROBLASTOS	33
I. DISCUSION.....	35
J. CONCLUSIONES.....	38

K. BIBLIOGRAFIA.....39

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
B1	Bovino experimental #1
B2	Bovino experimental #2
<i>D. hominis</i>	<i>Dermatobia hominis</i>
L1	Larva de primer estadio
L2	Larva de segundo estadio
L3	Larva de tercer estadio
<i>M. granulomatis</i>	<i>Mannheimia granulomatis</i>
PCR	Reacción de polimerasa en cadena
p.i.	Post infección
RAPD	Amplificación aleatoria del polimorfismo del DNA

A. RESUMEN

La lechiguana es una enfermedad de los bovinos definida como una paniculitis fibrogranulomatosa proliferativa. Se caracteriza por una tumoración subcutánea de crecimiento rápido, con marcada proliferación de tejido fibroso, que puede ocasionar la muerte del animal. Este trabajo tuvo como objetivo confirmar la hipótesis de que la lechiguana es una enfermedad causada por una asociación entre el parasitismo de la *Dermatobia hominis* (*D. hominis*) y la presencia de *Mannheimia granulomatis* (*M. granulomatis*). Dos bovinos fueron infectados con larvas de la mosca, mientras que sólo uno de ellos fue infectado con la bacteria. Las muestras biopsias de las lesiones fueron tomadas a los 7, 14, 21 y 28 días para su posterior estudio histopatológico, de inmunohistoquímica y de microscopía electrónica. En el animal infectado solo con larvas, las lesiones histológicas se caracterizaron por dermatitis con infiltración de eosinófilos, presencia de células mononucleares y proliferación de tejido conectivo. La inoculación simultánea de *D. hominis* y *M. granulomatis* provocó, además de las lesiones características de la parasitosis, linfangitis y microabcesos eosinofílicos, similares a los observados en casos espontáneos de la enfermedad. En las muestras tomadas a los 28 días posteriores a la infección bacteriana, se observó, tanto en la prueba inmunohistoquímica, como a través de la microscopía electrónica la presencia de cuerpos bacterianos aparentemente intactos en el interior de fagosomas macrofágicos, sugiriendo que la bacteria queda dentro de los macrófagos hasta que algún factor desconocido, desencadene el desarrollo de la enfermedad. La *M. granulomatis* fue aislada de larvas recolectadas a los 42 días después de la inoculación. Tal hecho demuestra que la bacteria puede sobrevivir dentro de la larva, actuando esta como un vector. La prueba de amplificación aleatoria del polimorfismo del DNA (RAPD) fue realizada en cepas aisladas de lesiones espontáneas de la enfermedad, no siendo observadas diferencias genómicas entre las muestras. Los cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo sirvieron para determinar que la *M. granulomatis* es capaz de estimular la proliferación de estas células, sólo cuando estuvieron presentes macrófagos activados previamente con la bacteria.

B. PALABRAS CLAVE

Mannheimia granulomatis, *Dermatobia hominis*, paniculitis fibrogranulomatosa proliferativa, lechiguana, bovinos.

C. SUMMARY

The lechiguana is a defined illness of cattle defined as a proliferating fibrogranulomatous panniculitis. It is characterized by a subcutaneous engrossment of quick growth, with marked proliferation of connective tissue that can cause the death of the animal if it is not treated. The goal of the present work was to confirm the hypothesis that the lechiguana is an illness caused by an association between the parasitism of *Dermatobia hominis* (*D. hominis*) and the presence of *Mannheimia granulomatis* (*M. granulomatis*).

Two bovine were infected with larvae of the fly, while only one of them was infected with the bacteria. The samples biopsies of the lesions were taken at the 7, 14, 21 and 28 days p.i. for their later histopathological, immunohistochemical and of electronic microscopy studies. In the animal just infected with larvas, dermatitis with eosinophilic infiltration, presence of mononuclear cells and proliferation of connective tissue characterized the histological lesions. The simultaneous inoculation of *D. hominis* and *M. granulomatis* caused, besides the characteristic lesions of the parasitosis, linfangitis and eosinophilic microabscesses, similar to those observed in spontaneous cases of the illness. In the samples taken after 28 days of the bacterial infection it was observed, immunohistochemically as well as through the electronic microscopy the presence of apparently intact bacterial bodies inside macrophages fagosomes, suggesting that the bacteria is inside the macrophages until some unknown factors can trigger the development of the illness. *M. granulomatis* was isolated from larvae gathered 42 days after inoculation. Such a fact demonstrates that the bacteria can survive inside the larva that acts as a vector. The random amplification polymorphism of the DNA test (RAPD) was carried out in isolated stumps of spontaneous lesions of the illness, not being observed genomic differences among the samples. The tissue culture of embryo chicken fibroblasts were appropriate enough to determine that the *M. granulomatis* is able to stimulate the proliferation of these cells but only when macrophages activated previously with the bacteria were present.

D. KEY WORDS

Mannheimia granulomatis, *Dermatobia hominis*, proliferating fibrogranulomatous panniculitis, lechiguana, bovine.

E. INTRODUCCION

E.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

La lechiguana es una enfermedad de los bovinos definida como una paniculitis fibrogranulomatosa proliferativa. Se caracteriza por una tumoración subcutánea de crecimiento rápido, con marcada proliferación de tejido fibroso que, cuando no es tratada, ocasiona la muerte del animal en un período de 3 a 8 meses.

La enfermedad fue observada por primera vez en un área de sierra y montes nativos de aproximadamente 500.000 hectáreas, próxima al municipio de Pelotas, en Rio Grande do Sul (24). Posteriormente Pereira *et al.* (19) describieron un caso proveniente del municipio de Cachoeira do Sul, localizado en otra región de Rio Grande do Sul, y otros casos provenientes de los Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo (6) y Minas Gerais (31). Más recientemente constataron el aislamiento de la bacteria en Australia (7) y Dinamarca. (4).

Todos los casos de lechiguana fueron observados en animales geográficamente localizados en áreas donde el parasitismo por *Dermatobia hominis* (*D. hominis*) es frecuente. Afecta animales de todas las edades, razas y sexos. (24).

Clínicamente, la enfermedad se caracteriza por el desarrollo de grandes masas tumorales de consistencia dura localizadas, generalmente, en la región de la escápula aunque también pueden tener otras localizaciones. En un estudio de la enfermedad, la lesión estaba localizada en la región de la escápula y sus proximidades en 14 de los 18 casos. Dos casos presentaron la lesión en la región glútea, uno en la región dorso-lumbar y otro en la región pectoral (14, 24). Posteriormente Pereira (18) al estudiar casos espontáneos de la enfermedad, encontraron lesiones localizadas en la región de la escápula y sus proximidades en 15 de los 18 animales analizados. Los otros 3 casos se localizaban en la pared del abdomen, la región lumbar y en la región glútea.

Una característica marcada de esta enfermedad es el rápido aumento de tejido fibroso durante el desarrollo de la misma, así como la rápida regresión de la lesión después del tratamiento con antibióticos. Los mecanismos patogénicos que determinan este rápido crecimiento y reabsorción de tejido fibroso, así como otros aspectos de la patogenia de la enfermedad son desconocidos.

La evolución clínica es rápida y en la mayoría de los casos descritos varía de 2 a 12 meses. Las masas subcutáneas desarrollan dimensiones máximas de 45 a 50 cm de diámetro, sobresaliendo de 5 a 25 cm sobre la superficie de la piel. La piel que cubre

el abultamiento se presenta engrosada, escamosa y la mayoría de los casos, con alopecia, pudiendo también estar ulcerada, presentando nódulos de *D. hominis*. La presencia de lesiones se ve siempre acompañada de un aumento del tamaño de los linfonódulos regionales y emaciación progresiva, llevando a la muerte del animal si la enfermedad no es tratada (24).

E.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS LESIONES OBSERVADAS EN LA ENFERMEDAD

Macroscópicamente, la lesión se caracteriza por proliferación de tejido fibroso muy consistente, blanco, con formaciones amarillas de hasta 1 mm de diámetro dispersas en el tejido conjuntivo. La lesión es altamente vascularizada y esta envuelta por una cápsula de aproximadamente 3 cm de espesor Fig.1.

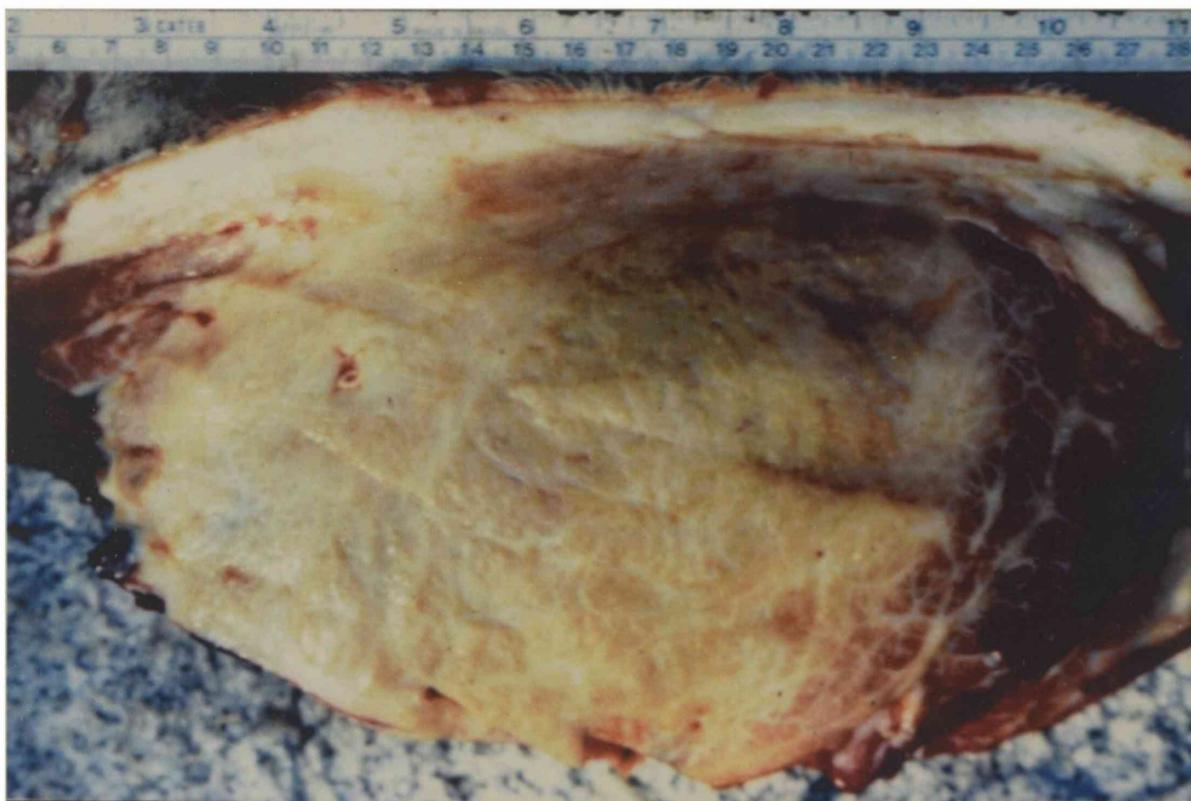


Fig.1. Aspecto macroscópico de la lesión en la lechiguana.

Se observa un tejido fibroso blanco incrustado de pequeñas formaciones amarillentas.

Histológicamente, se observa una marcada proliferación de tejido fibroso muy vascularizado, formando haces entrelazados de colágeno, donde gran parte de las fibras están calcificadas. Aparentemente, la lesión primaria estaría representada por una linfangitis eosinofílica que induciría una oclusión linfática, la cual produciría la destrucción de la pared del vaso linfático con la formación de microabscesos conteniendo gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares (Fig.2).

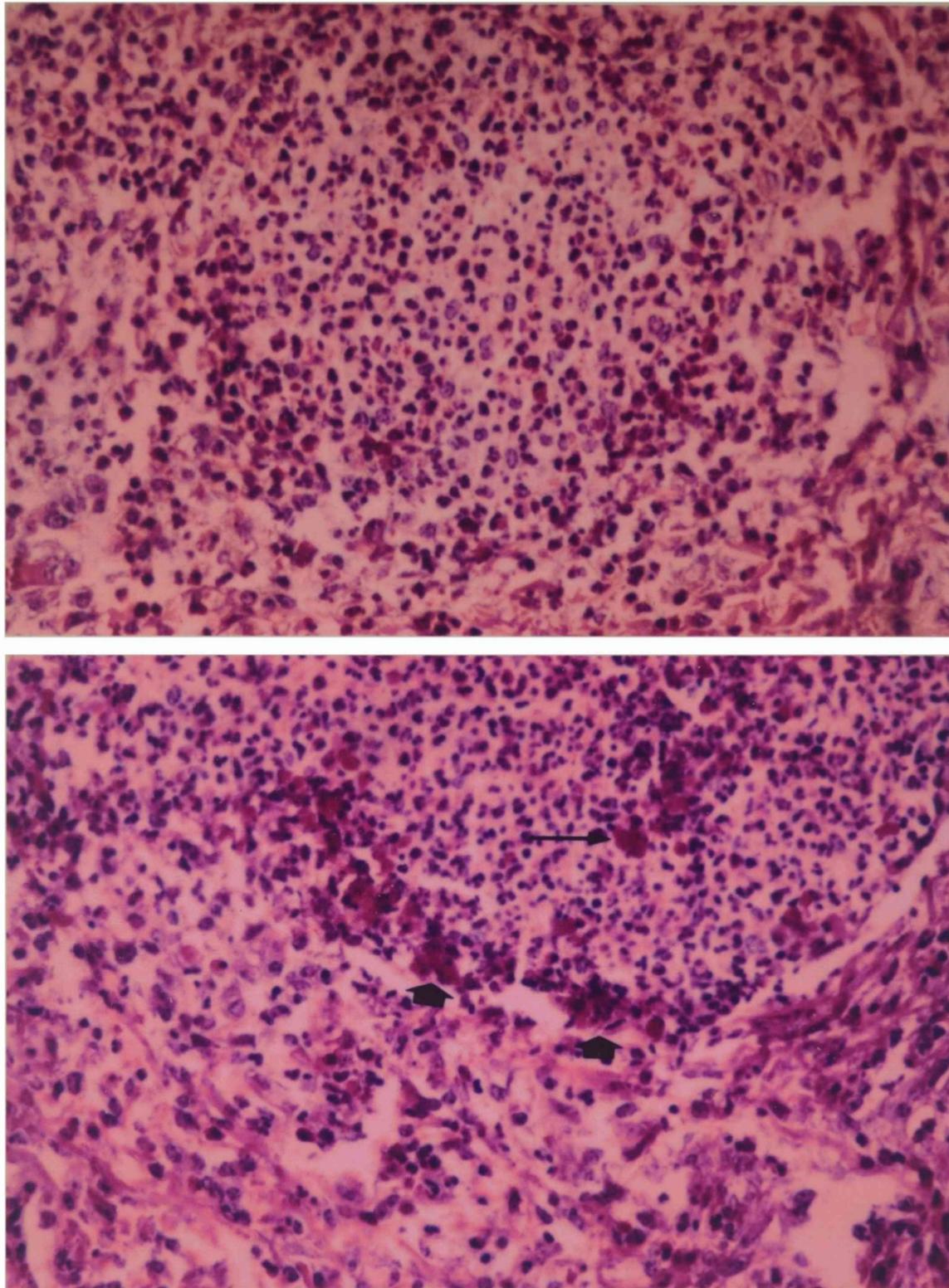


Fig. 2 Aspecto microscópico de la lesión de lechiguana.

A. Oclusión linfática inducida por la presencia de material eosinofílico. HE. x100.

B. Mayor detalle de la imagen A mostrando el material eosinofílico acumulado en la pared del vaso (punta de flecha) y la ruptura del mismo. Se observa, además, material eosinofílico semejante a corpúsculos de Splendore-Hoeppli (flecha). HE. 200X.

En algunos casos, se forman pequeños granulomas que ocasionalmente presentan rosetas con colonias de bacterias en el centro. Numerosos eosinófilos y menor número de linfocitos, plasmocitos y neutrófilos se encuentran entre el tejido fibroso (24).

E.3. ETIOLOGÍA PRESUNTIVA

E.3.1. Etiología bacteriana

La etiología de la enfermedad no ha sido totalmente establecida, pero algunos estudios sugieren una asociación entre el parasitismo de la *Dermatobia hominis* (*D. hominis*) y la presencia de una bacteria Gram negativa, primitivamente denominada *Pasteurella granulomatis*. Esta bacteria fue aislada en 30 de 40 casos de la enfermedad, mientras que en los 10 casos restantes, fue detectada mediante métodos inmunohistoquímicos (23).

A partir de un estudio realizado mediante hibridación de DNA-DNA y secuenciamiento de 16S de rRNA, la bacteria fue reclasificada dentro del género *Mannheimia*, siendo actualmente reconocida como *Mannheimia granulomatis* (*M. granulomatis*) (4).

Ha sido sugerido que tanto la *M. granulomatis*, como agente causal primario y la *D. hominis*, que actuaría en la transmisión de la enfermedad y/o en el desarrollo de la lesión serían los agentes responsables de la patogenia de la enfermedad.

La participación de la bacteria *M. granulomatis* estaría fuertemente sustentada por las lesiones histológicas con presencia de rosetas conteniendo bacterias en el centro de la lesión; la recuperación de todos los animales tratados con cloranfenicol, al cual la bacteria es sensible; el aislamiento de *M. granulomatis* en 24 de 31 casos en que fueron realizadas biopsias profundas del abultamiento escapular y en 2 casos en los que el material fue obtenido mediante necropsia; y por la reproducción experimental, en 3 animales, de una lesión similar a las observadas en los casos espontáneos (14, 18, 24).

E.3.1.1. Características culturales de la bacteria

La *M. granulomatis* es un cocobacilo o bacilo Gram negativo, aeróbico, que presenta un buen crecimiento en agar sangre ovino en 24 horas a 37°C, produciendo colonias grises, redondas y de 1 a 2 mm de diámetro. Sus principales características bioquímicas incluyen: reacción positiva para oxidasa, catalasa, reducción de nitrato, β -glucuronidasa (PGUA) y β -galactosidasa (ONPG). Se obtiene ácido, pero no gas, a partir de glucosa, galactosa, sacarosa, lactosa (7 días), maltosa (7 días), celobiosa (7 días), sorbitol, manitol (7 días), salicina y esculina. No hay formación de ácido o gas a

partir de arabinosa, xilosa, ramnosa, manosa, trealosa, melobiosa, adonitol, dulcitol e inositol. Se observan reacciones negativas para indol, reducción de nitrito, ureasa, H₂S (triple sugar iron), gelatinasa, β-xilosidasa (PNPX), fenilalanina desaminasa, lisina descarboxilasa, arginina descarboxilasa-dihidrolasa y ornitina descarboxilasa (21).

Veit *et al* (32), utilizaron la técnica de Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), con los inductores (primers) T₃/T₇, con el objetivo de establecer diferencias entre 13 cepas de *M. granulomatis* y a su vez, diferenciarlas de otras especies bacterianas, tales como: *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus lignierese*, logrando identificar las 13 cepas de *M. granulomatis* y pudiendo diferenciarlas de las otras 3 especies bacterianas. Se concluyó también que uno de los 13 aislamientos de *M. granulomatis* podía ser genéticamente diferente de los demás ya que presentó variabilidad en la intensidad de algunas bandas.

En un trabajo realizado en el Centro de Biotecnología de la Universidad Federal de Pelotas, se intentó extraer plásmidos en dos cepas de *M. granulomatis* utilizando diversas técnicas de biología molecular, aunque con resultados negativos en todas ellas, lo que llevó a la conclusión de que no hay evidencia de la presencia de plásmidos en esta bacteria.

En 9 cepas de *M. granulomatis* se utilizó la técnica de RAPD (Amplificación Aleatoria del Polimorfismo del DNA), que se basa en la amplificación de DNA a través de la técnica de PCR usando primers al azar, para diferenciar cepas que presentan diferencias a nivel genómico. El resultado reveló que de las 9 cepas analizadas, 8 presentaron un perfil de bandas muy semejantes, mientras que una muestra presentó un perfil completamente diferente (Dellagostin & Ladeira, 1996 - datos no publicados), siendo clasificada posteriormente como *Pasteurella haemolytica* (Carter, GR; 1998, comunicación personal).

Al estudiar la actividad hemolítica y leucotóxica de algunas cepas de *M. granulomatis*, Veit *et al.* (33) observaron diferencias entre ellas, sugiriendo que las actividades hemolítica y leucotóxica podrían tener cierto efecto sobre la patogenicidad de la bacteria en bovinos susceptibles.

E.3.2. Etiología parasitaria

La participación de *D. hominis* en la transmisión de *M. granulomatis* y/o en el desarrollo de la lesión estaría indicada por la localización anatómica de las lesiones de ambas enfermedades (preferentemente en la región de la escápula y sus

proximidades); por la distribución geográfica de las dos enfermedades en la región sur de Rio Grande do Sul, y por la disminución de la frecuencia de los casos de lechiguana, concomitantemente con el aumento del uso de garrapaticidas piretroides a partir de 1985, que al controlar a los vectores de *D. hominis*, indujeron una disminución en la incidencia de esta parasitosis (14).

Las larvas de *D. hominis* producen una lesión en el tejido subcutáneo caracterizada, macroscópicamente, por un aumento en el volumen del tejido. Las lesiones se corresponden con la presencia de numerosos nódulos conteniendo un exudado seroso o purulento, que presentan orificios en la superficie de la piel.

El periodo larvario se desarrolla durante 39 a 50 días en los bovinos. En este periodo el parásito atraviesa tres etapas distintas. En las dos iniciales (L1 y L2), las larvas se caracterizan por ser dinámicas, muy activas, de rápido crecimiento, por comer en abundancia y causar gran malestar. En la tercera etapa (L3), el parásito se torna tranquilo, come poco y causa menos problema al animal. Su longitud definitiva es de 18 a 24 mm, el extremo anterior de la larva es ancho y esta provisto de hileras dobles de ganchos en forma de espinas, la porción posterior es más delgada, lisa y retráctil. Cuando se prepara para dejar al hospedador, el orificio respiratorio se agranda e inicia su recorrido hacia fuera por medio de las coronas de ganchos que rodean su cuerpo (9, 17, 30).

Histológicamente, la lesión presenta numerosos neutrófilos y eosinófilos necrosados alrededor de la larva rodeados, en la periferia, por edema e infiltración de eosinófilos, mastocitos y células mononucleares indiferenciadas. En la dermis se produce una dermatitis, preferencialmente perivascular, con infiltrado de células mononucleares y eosinófilos. La epidermis se presenta ulcerada en la superficie de los nódulos y con acantosis en las áreas próximas a la ulceración (18).

Pereira (18) estudió dos lesiones fibroproliferativas, causadas por las larvas de *D. hominis*, clínicamente similares a la lechiguana. Histológicamente, estas lesiones se caracterizaban por la proliferación de tejido fibroso con granulomas focales, conteniendo larvas de la mosca. No se observaron ni linfangitis eosinofílica ni calcificación de fibras colágenas. El autor sugiere que dado que *D. hominis* produce, ocasionalmente, una reacción fibrogranulomatosa, esta podría ser la lesión inicial de la lechiguana cuando el animal está infectado con *M. granulomatis*.

E.4. ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Con el objetivo de determinar si *D. hominis* es un portador de *M. granulomatis*, Ladeira *et al.* (14) realizaron el estudio bacteriológico de larvas y de lesiones causadas por *D. hominis* en bovinos de 3 campos diferentes, en 2 de los cuales nunca se habían registrado casos de lechiguana. En el tercer campo había un bovino cursando la enfermedad en el momento de la recolección del material. Se sembró material de 23 larvas y de lesiones ocasionadas por estas y se aisló *M. granulomatis* de 4 larvas y de dos lesiones de un animal perteneciente a uno de los campos donde nunca habían sido registrados casos de la enfermedad. La Tabla 1 muestra la distribución de larvas y lesiones extraídas de cada campo.

Ubicación	Animales muestreados	Cantidad de larvas y lesiones analizadas	Aislamiento de <i>M. granulomatis</i>
Campo 1	2	13	En 4 larvas y 2 lesiones
Campo 2	3	8	Negativo
Campo 3	2	2	Negativo

Tabla 1. Distribución del material obtenido para la determinación de la presencia de *M. granulomatis*

Con el mismo propósito de Ladeira *et al.* (14), Pereira *et al.* (19), realizaron un estudio bacteriológico utilizando 72 larvas y el mismo número de exudados provenientes de lesiones espontáneas de *D. hominis*, no habiendo aislado *M. granulomatis* en ningún caso. *M. granulomatis* tampoco fue aislada de moscas, larvas y huevos producidos en el laboratorio, provenientes de lesiones previamente inoculadas con suspensión bacteriana.

Ladeira *et al.*, (14) y Riet-Correa *et al.* (24) describen diversas tentativas de reproducción experimental de lechiguana mediante la inoculación de *M. granulomatis*, por diferentes vías (intramuscular, subcutánea, intradérmica e intralinfática), con y sin adición de adjuvante completo de Freund, saponina o mucina gástrica, con o sin pasajes previos de la bacteria en ratones, en bovinos que nunca habían presentado la enfermedad clínica y en otros que ya habían sufrido la enfermedad. De los 82 bovinos inoculados por alguna de las diferentes formas mencionadas, solo se reprodujo la enfermedad en 3 animales.

Riet-Correa *et al.* (24), realizaron 4 experimentos para intentar reproducir experimentalmente la enfermedad. En el primer experimento, utilizaron 9 bovinos de

ambos sexos, con edades que variaban de 6 meses a 9 años, los cuales fueron inoculados por vía intramuscular, subcutánea e intradérmica con una suspensión de *M. granulomatis* en solución salina, en concentración equivalente a la escala N° 3 de Mc Farland, habiendo producido, en todos los casos, abscesos que medían de 5 a 14 cm en el sitio de inoculación, los cuales remitieron espontáneamente en 15 a 34 días. *M. granulomatis* fue aislada de todos los abscesos. En el segundo experimento, fueron inoculados 2 bovinos de 6 a 8 meses de edad, por vía subcutánea, con un macerado de material de biopsias extraído de casos espontáneos de la enfermedad, habiendo obtenido resultados similares a los del primer experimento, con aislamiento de *M. granulomatis*. En el tercer experimento, 3 bovinos utilizados en el experimento 1 fueron inoculados por vía subcutánea con 2 ml de suspensión de la bacteria. Los resultados también fueron similares a los obtenidos a los dos ensayos previos. En el cuarto experimento se realizaron inoculaciones por vías subcutánea e intramuscular en 3 animales, tratados previamente con cloranfenicol y recuperados de la enfermedad, produciendo, en todos los casos, abscesos similares a los del primer experimento. Esos abscesos, en forma similar al primer experimento, también remitieron espontáneamente. En uno de los animales se observó una lesión en la región de la escápula similar a las de los casos espontáneos, la cual medía 28 cm de diámetro y 12 cm de altura hacia al 34° día, aumentando rápidamente hasta llegar a los 40 cm de diámetro y 17 cm de altura, hacia en 41° día. El examen histológico de la biopsia obtenida el 34° día reveló una proliferación de tejido conjuntivo laxo infiltrado por neutrófilos, eosinófilos y algunos linfocitos. El estudio realizado 7 días después (día 41) mostró un tejido conjuntivo más denso, algunas fibras colágenas calcificadas y una mayor frecuencia de eosinófilos en comparación con los neutrófilos. En el día 41 también se observaron microabscesos conteniendo leucocitos polimorfonucleares eosinófilos y neutrófilos dentro del tejido fibroso. *M. granulomatis* fue aislada de la lesión experimental.

La reproducción experimental de la enfermedad fue propiciada también mediante la inoculación de la suspensión bacteriana en lesiones naturales de *D. hominis* (14). Para ello fueron utilizados 6 bovinos, logrando reproducir la enfermedad en apenas uno de ellos. En el 34° día posterior a la inoculación, fue observada una lesión que presentó características clínicas e histológicas similares a las observadas en casos espontáneos de la enfermedad. El período entre la inoculación y la observación de la lesión fue el mismo descrito por Riet-Correa *et al.* (24), quienes reprodujeron la enfermedad

inoculando un animal por vía subcutánea sin infección previa por *D. hominis*. Este hecho y los resultados negativos obtenidos en los demás experimentos, así como la baja frecuencia de la enfermedad comprueban que la sola presencia de la bacteria no determina el desarrollo de la lesión, siendo necesarios factores asociados al huésped para que esta se desarrolle.

El desarrollo de la enfermedad en un animal con severa infección por *D. hominis* (50 a 100 larvas en un área de 10 a 20 cm de diámetro) y la localización de las lesiones espontáneas de lechiguana en regiones del cuerpo donde aparece la infección parasitaria, indican la posibilidad de que, en casos naturales, las lesiones se desarrollen donde haya gran número de larvas de *D. hominis* en el tejido subcutáneo (14).

La tercera oportunidad en la que la enfermedad fue reproducida experimentalmente fue cuando lesiones espontáneas de *D. hominis* fueron infectadas con una suspensión de *M. granulomatis* en 9 bovinos. Uno de los animales desarrolló una lesión de lechiguana 3 meses después de la inoculación (18).

Pereira (18) realizó diversos experimentos con la intención de demostrar la participación de *D. hominis* en la etiología de la lechiguana. Una suspensión de *M. granulomatis* fue inoculada en lesiones causadas por larvas de *D. hominis* en un bovino y se tomaron biopsias en dos lesiones producidas por la larva. En una de esas lesiones fue observada una linfangitis eosinofílica con proliferación de tejido conjuntivo, similar a la observada en casos espontáneos de lechiguana.

Con la finalidad de determinar si la ocurrencia de la lechiguana depende de la multiplicación de la bacteria en un proceso inflamatorio concomitante, Ladeira *et al.* (14), realizaron dos experimentos. En el primero, una suspensión de *M. granulomatis* en solución salina, con adición de adyuvante completo de Freund, fue inoculada por vía subcutánea en 6 bovinos. En el segundo experimento, donde fueron inoculados 6 animales, el adyuvante completo de Freund fue substituido por saponina. En los dos experimentos, los autores obtuvieron apenas la formación de abscesos en los sitios de inoculación, siendo los resultados similares a los descritos por Riet-Correa *et al.* (24).

Para investigar la hipótesis de que infecciones repetidas de *M. granulomatis* fuesen responsables por la formación del proceso inflamatorio observado en la lechiguana, Ladeira *et al.* (14) inocularon bovinos que ya habían sido inoculados previamente, obteniendo resultados negativos con relación a la reproducción de la lesión. Los mismos autores, inocularon la bacteria en 12 bovinos después de hacer un pasaje

murino, en la sospecha de que la falla en la reproducción experimental de la lechiguana era debida a la pérdida de la patogenicidad de *M. granulomatis*. También inocularon *M. granulomatis* asociada a 5% de mucina gástrica que actúa como activador de la patogenicidad; 6 animales fueron inoculados por vía subcutánea y 3 animales por vía intra linfática. La enfermedad no fue reproducida en ninguna de estas tentativas.

Considerando que la lesión primaria de la lechiguana es una linfangitis eosinofílica, Ladeira *et al.* (14) inocularon *M. granulomatis* por vía intralinfática en 3 bovinos, obteniendo resultados negativos y concluyendo que la vía de inoculación de la bacteria no es determinante para la reproducción de la enfermedad.

Ladeira *et al.* (14), trataron de reproducir la enfermedad mediante la inoculación de una suspensión de *M. granulomatis* en animales previamente tratados con dexametazona. Obtuvieron resultados negativos y concluyeron que la enfermedad no era determinada por un proceso de inmunosupresión en el huésped. También intentaron inocular la bacteria asociada a un macerado de larvas de *D. hominis*, inocular la bacteria en lesiones naturales de *D. hominis* en las cuales las larvas ya estaban muertas e infestar bovinos con larvas de *D. hominis* en forma concomitante con la inoculación de la bacteria. Ninguna de estas tentativas tuvo éxito.

E.5. TRATAMIENTO

Riet-Correa *et al.* (24), trataron 14 animales con lechiguana con 3 gramos diarios de cloranfenicol por vía intramuscular, durante 5 días consecutivos, obteniendo rápida regresión de las lesiones y observando una total recuperación de los animales en un período de 21 a 30 días.

Según datos del Laboratorio de Bacteriología del Laboratorio Regional de Diagnóstico de la Facultad de Veterinaria de la UFPel, *M. granulomatis* presenta 100% de sensibilidad frente a amicacina, cloranfenicol, estreptomina, danofloxacina y ceftiofur, 95,65% frente a gentamicina y 95,24% frente a polimixina B. Frente a otros antibióticos probados (ampicilina, kanamicina, eritromicina, fosfomicina, novobiocina, tetraciclina y penicilina), la bacteria presentó grados variados de sensibilidad.

F. OBJETIVOS

F.1. OBJETIVOS GENERALES

- * Incrementar el conocimiento sobre la patogenia de la lechiguana en los bovinos.

F.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Determinar la presencia de *M. granulomatis* en lesiones de lechiguana mediante el empleo de técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica.
- * Estudiar el efecto de *M. granulomatis* sobre los macrófagos y su importancia para la patogenia de la enfermedad.
- * Determinar posibles diferencias genéticas entre cepas de *M. granulomatis*.

G. MATERIALES Y METODOS

G.1 ANIMALES

Se utilizaron 2 bovinos (B1 y B2) cruce entre las razas Charoles y Hereford, de 2 años de edad y con un peso aproximado de 300 Kg.

G.2. PRODUCCIÓN EXPERIMENTAL DE LARVAS DE *D. hominis*

Se recolectaron 533 larvas de tercer estadio (L3) de *D. hominis* de bovinos espontáneamente infestados, en campos cercanos al municipio de la ciudad de Pelotas, Brasil.

Las larvas fueron seleccionadas y colocadas en vidrios con aserrín lavado, esterilizado y humedecido. Las larvas fueron mantenidas a 27°C, en estufa de germinación tipo BOD (demanda bioquímica de oxígeno), con fotoperíodo y humedad relativa de 70% a 80%, durante aproximadamente 30 días, hasta alcanzar el estadio de pupa. Luego de la eclosión de las moscas se procedió a su sexado y posterior apareamiento. Las parejas fueron mantenidas en recipientes de vidrios. Al día siguiente de la copula se introdujo un vector en el sistema (*Musca domestica*). La hembra de *D. hominis* presenta el hábito de la oviposición. Es decir, en proximidad del desove, la hembra se aproxima lentamente a un vector (*Musca domestica*, *Stomoxys calcitrans*, familia *Culicidae* y *Tabanidae*), y cuando se encuentra a aproximadamente un centímetro de distancia, da un salto súbito, aprisiona a la mosca y se une a esta. En ese momento desova una masa de huevos sobre la porción latero-ventral del abdomen del vector, utilizando una sustancia pegajosa. La mosca doméstica se desprende del parásito, pero no puede de hacerse de los huevos, aún mediante el uso de sus patas posteriores. El período de incubación de los huevos es de una semana. La incubación de estos sobre el vector asegura una alta viabilidad de los mismos, ya que se protegen de los rayos solares y de los vientos. Cuando el vector se deposita sobre el hospedador (bovino), el CO₂ y el calor liberado por el animal estimulan la transferencia de la larva. La mayoría de las larvas penetra en el mismo lugar donde se posa el vector (20).

Los vidrios fueron revisados diariamente, retirándose los huevos y colocándolos en placas de Petri, con papel humedecido en solución fisiológica, siendo conservados en estufa a 27°C y 70 a 80% de humedad relativa, durante aproximadamente 6 días, momento en que emergían las larvas infectantes (L1).

G.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE *M. granulomatis*

Muestras aisladas de las lesiones de un caso espontáneo de lechiguana (cepa 145/91), fueron sembradas en agar sangre ovino al 5% e incubadas a 37°C, durante 24 horas. El cultivo fue suspendido en una solución salina al 0,85%, con un grado de turbidez correspondiente al tubo 3 de la escala de McFarland ($\sim 2,3 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias por mililitro - UFC/ml).

G.4. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se utilizó un suero policlonal purificado anti-*M. granulomatis* producido en conejo. La dilución empleada fue de 1:4000. El método utilizado fue el de la streptavidina-biotina marcada con peroxidasa (LSAB). El primer paso de la técnica consistió en la incubación del tejido problema con el anticuerpo primario (específico), seguido de la incubación con el anticuerpo biotinilado. Finalmente se procedió a la incubación del sistema con una solución de streptavidina marcada con peroxidasa. Previo a la incubación con el suero anti-*M. granulomatis*, los cortes fueron tratados con “bloqueante universal” (“Universal Blocking Reagent”, Biogenex, USA”). De esta manera, se trataron de eliminar las coloraciones inespecíficas. El revelado de la peroxidasa fue realizada con 3',3'- diaminobenzidina (DBA) al 0,02% y H₂O₂ al 0,05%.

G.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Bloques de parafina cuyos tejidos fueron positivos a las reacciones inmunohistoquímicas en contra de *M. granulomatis* fueron desparafinados y el material incluido fue refijado en glutaraldehído al 2% en una solución 0,1M de cacodilato de sodio, pH 7,4. Posteriormente, fue posfijado en una solución al 1% de tetróxido de osmio en una solución 0,1M de cacodilato de sodio y embebido en Epon812. Cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina. Los cortes ultra finos fueron teñidos con citrato de plomo y acetato de uranilo y observados al microscopio electrónico de transmisión (Zeiss Electrón Microscope EM109).

G.6. AMPLIFICACIÓN ALEATORIA DEL POLIMORFISMO DEL DNA (RAPD)

La técnica del RAPD (del inglés: Random Amplification DNA Polimorfism) se basó en la amplificación de DNA por medio de PCR, utilizando primers (iniciadores) al

azar, sobre 8 cepas de *M. granulomatis* aisladas de casos espontáneos de la enfermedad. También se utilizó una cepa de *P. haemolytica* como control negativo. Como control positivo fue utilizada la cepa ATCC 115/86 de *M. granulomatis*. El resultado fue observado a través del análisis de electroforesis en gel de agarosa (GibcoBRL) del DNA amplificado (25). Cada cepa fue cultivada durante la noche a 37°C en un medio de agar sangre. Las colonias fueron suspendidas en 25µl de agua ultrapurificada (Milli-Q, Millipore, Brasil), hervidas durante 7 minutos en baño María y posteriormente centrifugadas en una microcentrífuga a 12.000 rpm, durante 5 minutos. Un microlitro de cada muestra fue utilizado en la reacción de PCR. Las cepas testadas fueron: 13B, 15B, 145/91, 294/86, 352/94, 524/95, 03/99, 300/99. La reacción de PCR fue preparada de la siguiente manera: 0,5µl de primer 2A (5' GCT GCT CAA C 3'), 0,5µl de primer 3A (5' GCA CTT GTA C 3'), 1µl de agua ultrapurificada Milli-Q, 22µl de Mix compuesto de 200µM dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech Inc, NJ, USA), 1U de *taq* DNA Polymerase (Life Technologies do Brasil Ltda., Brasil), solución tampón de 20mM Tris-HCL (pH 8,4) y 50mM KCL (Life Technologies do Brasil, Brasil) y 1µl de DNA. El volumen de la reacción fue de 25µl. Los tubos fueron posteriormente introducidos en un termociclador 480 (Perkin Elmer Cetus, USA) y sometidos a 35 ciclos de amplificación con los parámetros detallados en la Tabla 2.

Paso	Temperatura	Tiempo (min)	Ciclos	Proceso
1	94°C	5:00	2	Desnaturalización inicial
	35°C	5:00		Alineación inicial
	72°C	5:00		Extensión inicial
2	94°C	1:30	35	Desnaturalización
	35°C	1:30		Alineación
	72°C	1:30		Extensión
3	72°C	5:00		Extensión final

Tabla 2. Parámetros de amplificación de DNA de *M. granulomatis*, mediante PCR

Los dos primeros ciclos del primer paso (a 94°C, 35°C y 72°C durante 5 min c/u) se realizan para que se produzca la desnaturalización del DNA, la separación de sus las cadenas, la unión de los primers con las cadenas complementarias y su síntesis, permitiendo, de esta manera, la replicación inicial del DNA. Los próximos 35 ciclos

(paso 2, a 94°C, 35°C y 72°C durante 1:30 min c/u), sirven para la amplificación del DNA replicado. La extensión final (paso 3) se realiza a 72°C, durante 5 min.

Quince microlitros del producto obtenido por PCR fueron posteriormente mezclados con 3µl del solución tampón (sacarosa 40%, azul de bromocresol 0,06%) y sometidos a electroforesis en gel de agarosa (GibcoBRL) al 1,5%, con una corriente inductora de 100V y 25A, durante 60 minutos y visualizado en transiluminador (Maco Vue, UV-25 Hoefer Scientific Instruments, MN, USA). El peso de las bandas se obtuvo por comparación con marcadores del peso molecular de 100pb (100 Base-Paierr Ladder – Amersham Pharmacia Biotechh Inc NJ, USA). El gel fue fotografiado mediante una cámara Polaroid.

G.7. CULTIVO DE FIBROBLASTOS

Para determinar si la *M. granulomatis* es capaz de producir sustancias que estimulen la proliferación de fibroblastos se realizaron cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo. Para el cultivo, se utilizaron 5 huevos de gallina, de 13 días de incubación. Para la preparación de las células, los huevos fueron desinfectados con alcohol yodado y abiertos con tijera estéril, en nivel de la cámara de aire. Los embriones fueron retirados con una pinza. Luego de desarticular patas, cabeza, alas y extraer vísceras, los tejidos restantes fueron triturados con el auxilio de una jeringa de 20 ml. El material fue lavado en PBS hasta la obtención de un sobrenadante de aspecto transparente, y se lo resuspendió en una solución de tripsina en PBS (0,125%). El material fue mantenido en agitación hasta su disgregación total, hecho ocurrido aproximadamente a los 40 minutos. El material fue filtrado y la tripsina neutralizada con 10% de suero bovino fetal y posteriormente centrifugado a 900 Xg durante 10 minutos, para la obtención de las células a cultivar. Las células fueron resuspendidas en medio de Eagle, con 10% de suero bovino fetal, y distribuidas en 12 frascos de cultivo, a razón de 10 ml por frasco conteniendo 1×10^6 fibroblastos. Seis frascos recibieron 2 ml (20%) de un cultivo de 18 horas de *M. granulomatis* (congelado y descongelado durante 3 ciclos antes de su utilización) en medio de Brain Heart Infusion Broth, en la escala 3 de McFarland, pH 7,0. Los cultivos fueron incubados a 37°C. Luego de 24 horas se hizo un recambio de medio de cultivo y se agregaron otros 2 ml del cultivo bacteriano. A las 48 horas del comienzo de la incubación se realizó el recuento de células supervivientes en cada uno de los frascos y se compararon los tratamientos.

Para realizar el recuento fue necesario levantar los fibroblastos adheridos al vidrio mediante la incubación de las células con 2 ml de tripsina a 37°C. La actividad de la enzima fue inhibida con el agregado de suero bovino fetal. El recuento celular se realizó en una cámara de Fuchs-Rosenthal (0,2mm²) con una dilución 1:10.

G.8. ESTIMULACION MACROFAGICA DE FIBROBLASTOS CULTIVADOS

La capacidad del macrófago activado por la *M. granulomatis* para producir citocinas y enzimas que estimulen la proliferación de fibroblastos fue determinada a través del cultivo de macrófagos peritoneales murinos. Para el cultivo se utilizaron 10 ratones (Suizo Albino) de aproximadamente 55 días y 38 gramos de peso corporal. Los animales fueron sacrificados por inhalación con éter. Se inocularon 10 ml de solución salina estéril (0,9% de NaCl) por vía intraperitoneal para la recolección de macrófagos peritoneales. La suspensión recuperada de la cavidad peritoneal fue sembrada en tubos estériles y mantenidos en baño de hielo. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en medio RPMI con 10% de suero bovino fetal conteniendo 1×10^6 células/ml. Se sembraron 10 ml de la suspensión en cada uno de los 4 frascos de cultivo los que fueron posteriormente incubados a 37°C durante 2 horas en una atmósfera de 5% de CO₂, para permitir la sedimentación de los macrófagos (8, 16, 34). Los tubos conteniendo las células fueron lavados con medio de cultivo. Posteriormente se procedió a la infección de los cultivos, con la suspensión bacteriana, según el siguiente detalle: dos tubos fueron infectados con una suspensión de *M. granulomatis* en 1,0 ml de solución salina, con una concentración de grado 3 en la escala de McFarland (aproximadamente $2,3 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias/ml), con igual volumen de suero hiperinmune en contra de la bacteria y 10% de suero de cobayo, como fuente de complemento. Luego de 24 horas de incubación los sobrenadantes fueron retirados y utilizados en los cultivos de fibroblastos. Otros dos tubos fueron considerados como controles del medio y los sobrenadantes también fueron sembrados en el cultivo de fibroblastos. El mismo procedimiento se repitió a las 48 horas.

Se prepararon 18 frascos de cultivo conteniendo fibroblastos conforme fuera descrito previamente, para verificar si las citocinas producidas por los macrófagos estimulan la producción de los fibroblastos.

Seis frascos fueron inoculados con 2ml del sobrenadante de los macrófagos activados, 6 con el sobrenadante de los macrófagos control y otros 6 frascos fueron utilizados

como control. Después de las 24 horas se procedió al lavado del sobrenadante y reposición del mismo de acuerdo al esquema planteado. A las 48 horas de iniciado el cultivo se precedió al recuento de fibroblastos.

G.9. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

El número de células fibroblásticas obtenido luego del cultivo con *M. granulomatis* o con sobrenadante del cultivo de macrófagos infectados con *M. granulomatis* fue determinado por el estudio del análisis de la varianza entre grupos (ANOVA). La significación del test fue determinado mediante la prueba de Tuckey.

G.10. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Uno de los bovinos (B1) fue infectado con 46 larvas infectantes (L1) de *D. hominis*, producidas en el laboratorio. Las larvas fueron inoculadas en la región escapular mediante la ayuda del un pincel de punta fina (22).

El segundo bovino (B2) fue infectado con 89 larvas infectantes (L1) de *D. hominis*. Previo a la inoculación de las L1 en el B2, los sitios de inoculación fueron pincelados con una suspensión de *M. granulomatis* (cepa 145/91). La pincelación con la suspensión bacteriana fue repetida semanalmente durante 4 semanas.

La diferencia entre el número de larvas inoculadas en B1 y B2, se debió al número de larvas eclosionadas cada día. De esta manera se mantenía un control exacto de la evolución de las lesiones y del crecimiento de cada larva.

Para determinar la evolución de las lesiones se realizaron biopsias por incisión quirúrgica en ambos bovinos, retirándose las larvas siempre acompañadas de la lesión circundante y de piel. Estas biopsias fueron tomadas a los 7, 14 y 21 días post infección (p.i.). En B2 se realizó una biopsia adicional a los 28 días p.i. El material extraído fue fijado en formol tamponado al 10%, durante 24 horas, embebido en parafina, cortado en secciones de 5µm y teñido con hematoxilina-eosina (15).

El material extraído de B2 a los 28 días p.i. fue sometido a una reacción inmunohistoquímica. Los bloques de parafina positivos a la reacción inmunohistoquímica para detectar *M. granulomatis*, fueron utilizados para confirmar la presencia de la misma mediante estudios de microscopía electrónica.

A los 42 días p.i., se recolectaron 4 larvas de tercer estadio (L3) de *D. hominis* proveniente de la infección experimental de B2. Dos larvas fueron sembradas en agar sangre ovino al 5% y las otras dos fueron colocadas en vidrios con aserrín

previamente lavado, esterilizado y humedecido, y mantenidas a 27°C, en estufa de germinación tipo BOD, con fotoperíodo y humedad relativa de 70% a 80%, durante aproximadamente 30 días, hasta alcanzar el estadio de pupa. Las pupas fueron sembradas en agar sangre ovina al 5%, para detectar la presencia de *M. granulomatis*.

H. RESULTADOS

H.1. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE M. granulomatis

En el examen histopatológico de las muestras obtenidas de B1 a los 7 días p.i., se observó que la larva se presentaba rodeada por un exudado conteniendo neutrófilos, eosinófilos y fibrina (Fig. 3A). En la dermis que circundaba este exudado se observó edema, infiltrado de células mononucleares, eosinófilos y fibroblastos, con formación de tejido conjuntivo joven. En la periferia de la lesión se observó infiltración perivascular de células mononucleares y eosinófilos. A los 14 días p.i., las lesiones fueron similares a las encontradas en el día 7 p.i. En la epidermis se observaron lesiones hiperplásicas y en la dermis el exudado de células mononucleares fue más intenso, con presencia de colágeno, fibroblastos y macrófagos (Fig 3B). A los 21 días p.i., la lesión fue similar a las anteriores, pero estaba circundada por tejido conjuntivo entremezclado con una reacción inflamatoria constituida por células mononucleares y eosinófilos (Fig. 3C).

En las muestras de B2, obtenidas a los 7, 14 y 21 días p.i., las lesiones fueron similares a las observadas en B1. No obstante, las muestras del día 7 p.i. contenían un material eosinofílico granular, sugiriendo la formación de corpúsculos de Splendore Hoeppli (28), en el exudado que circundaba la larva (fig. 4A). Asimismo, se observaron áreas focales en la dermis con evidente proliferación de fibroblastos. A los 14 y a los 21 días p.i., se observaron, además de las lesiones anteriormente descritas, microabscesos constituidos principalmente por eosinófilos (Fig. 4B). A los 21 días p.i., también se observaron vasos linfáticos dilatados, conteniendo eosinófilos y fibroplasia más acentuada que la de B1 (Fig. 4C).

Del animal B2 se tomaron, asimismo, muestras de piel pinceladas con la bacteria pero no inoculadas con las larvas. El estudio histológico no reveló ningún tipo de alteración cutánea.

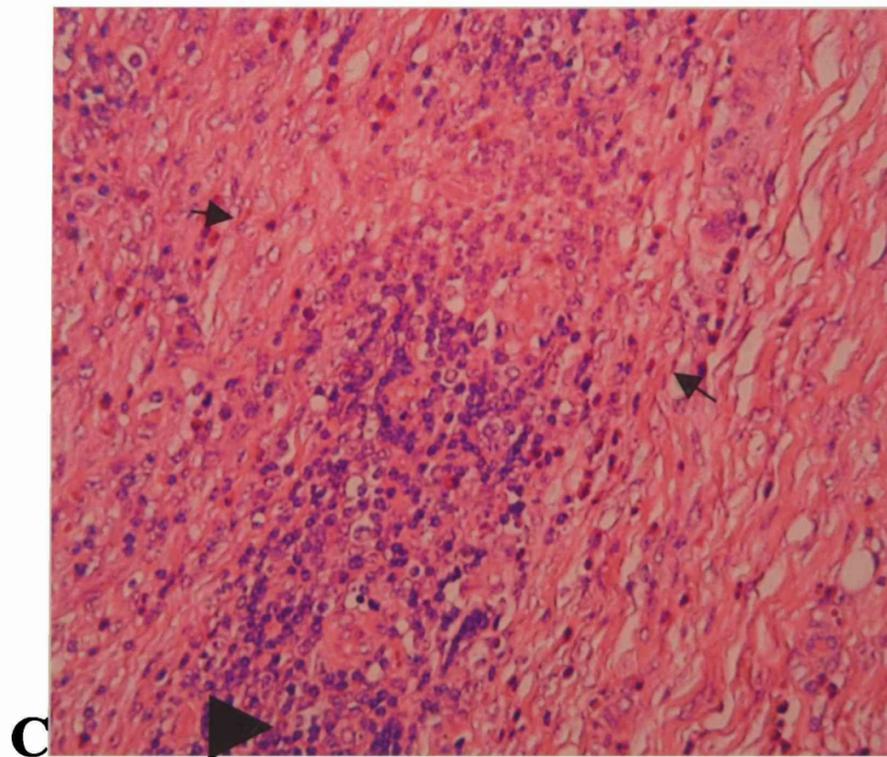
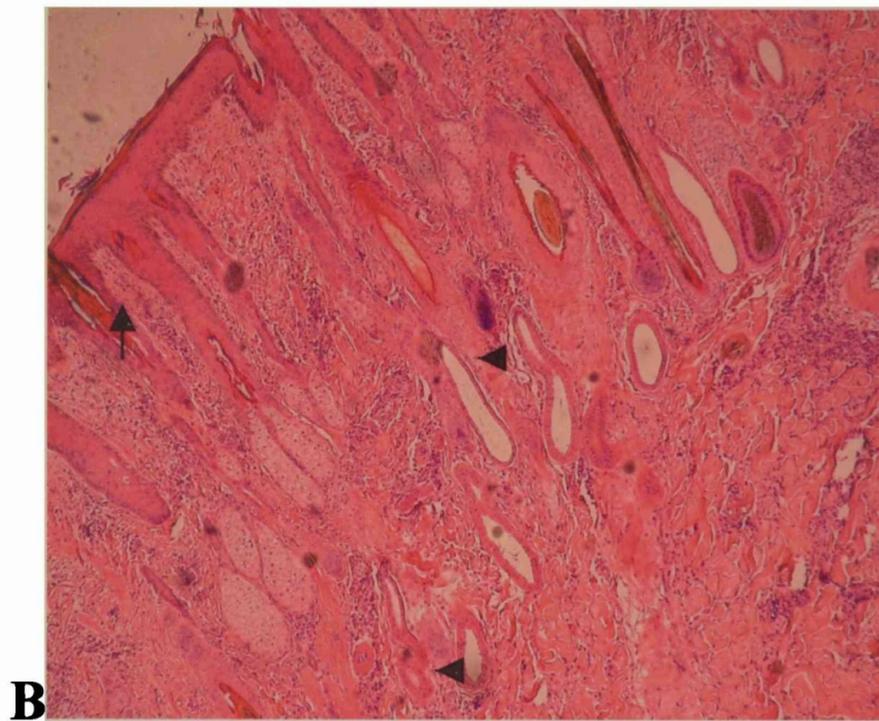
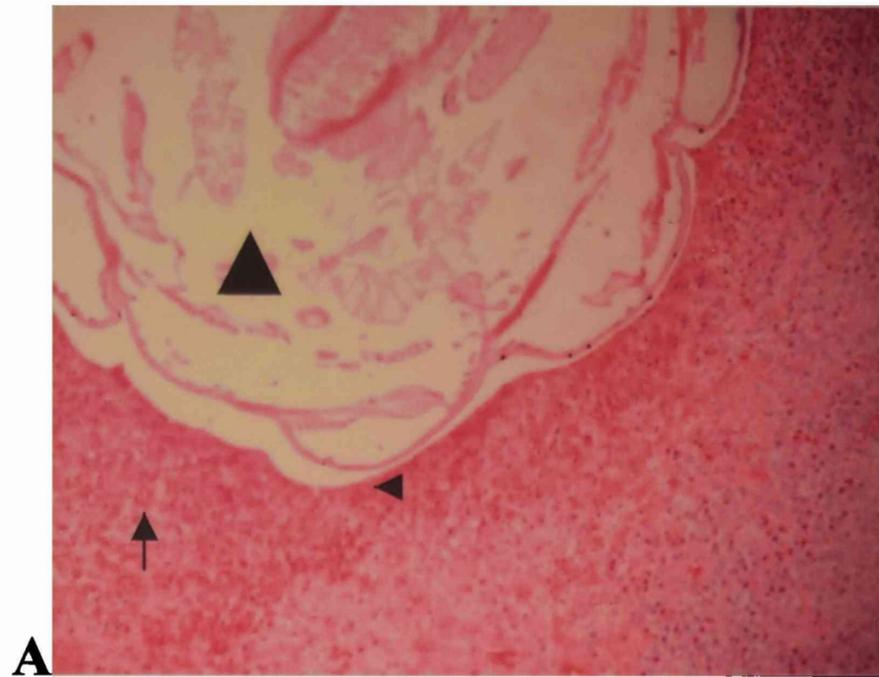


Fig.3. Aspecto histológico de la piel del bovino B1.

A. Exudado conteniendo neutrófilos, eosinófilos y fibrina (flecha) alrededor de la larva (punta de flecha) 100x. B. Lesiones hiperplásicas en la epidermis (flecha) y presencia de células mononucleares en la dermis. 100x. C. Tejido conjuntivo entremezclado con una reacción inflamatoria (punta de flecha), conteniendo eosinófilos (flechas). 200x.

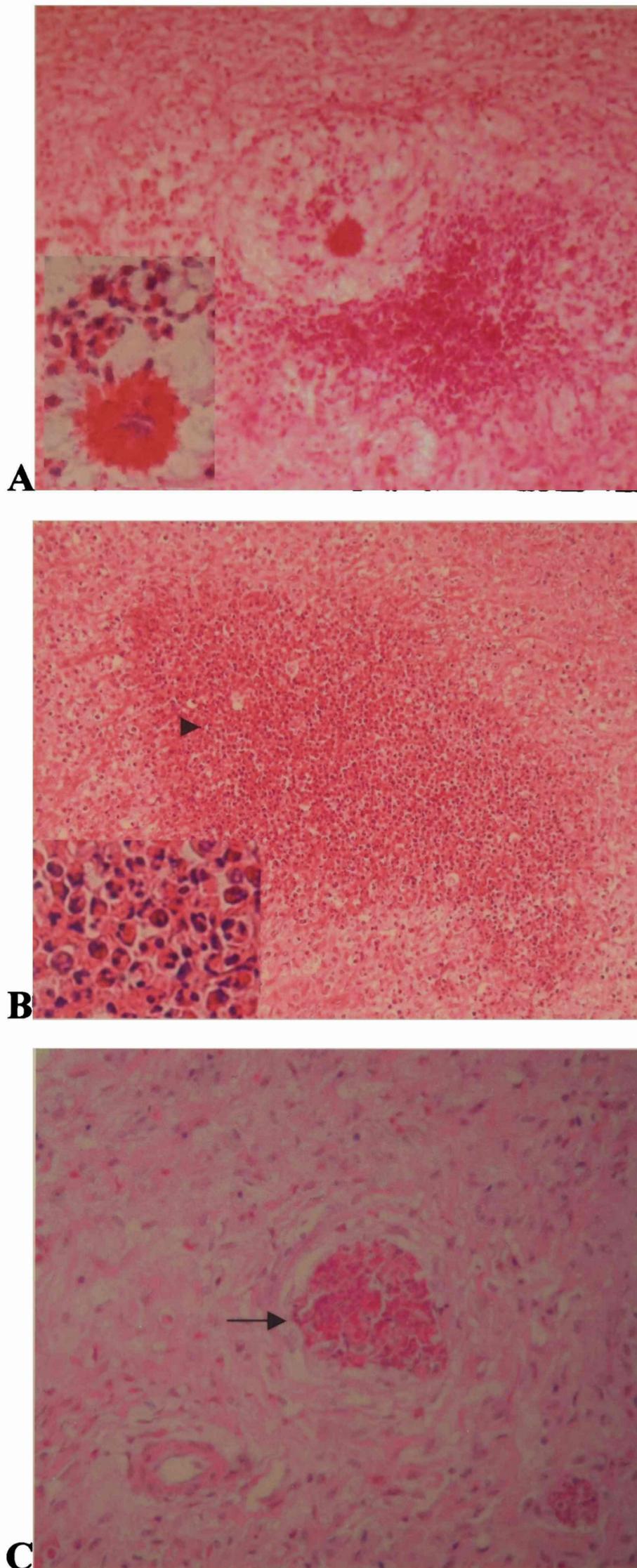


Fig. 4. Aspecto histológico de la piel del bovino B2.

A. Presencia de material eosinofílico granular, (corpúsculos de Splendore-Hoeppli) en el exudado. 100x. Detalle del mismo en el extremo inferior izquierdo. 400x. B. Microabscesos (punta de flecha) constituidos por eosinófilos. 100x. (detalle a 400x). C. Vasos linfáticos dilatados, conteniendo eosinófilos (flecha). 200x.

A los 28 días p.i., las muestras de B2 evidenciaron gran cantidad de vasos neoformados, engrosamiento de la pared de los vascular, numerosas fibras de tejido conjuntivo y presencia de numerosos fibroblastos, en la región próxima a la localización de la larva (Fig. 5).

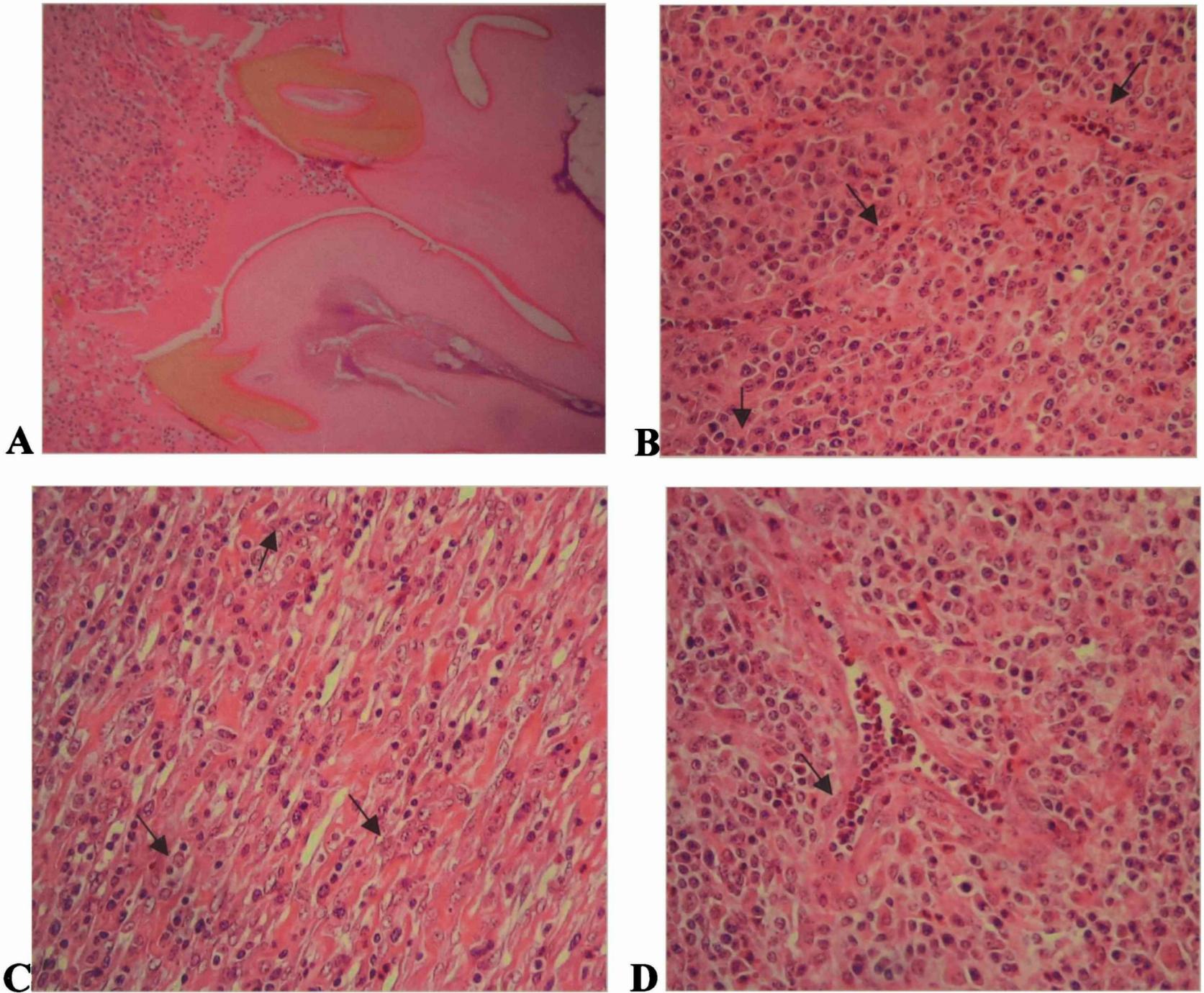


Fig. 5. Reacción inflamatoria inducida por la presencia del parásito.

A. Presencia de la larva rodeada por una reacción inflamatoria. 40x B. presencia de vasos en neoformación (flechas). 200x. C. Abundante tejido conjuntivo con presencia de gran cantidad de fibroblastos (flechas). 200x. D. Vaso sanguíneo con un gran engrosamiento de la pared (flecha). 200x.

Las técnicas inmunohistoquímicas revelaron la presencia de *M. granulomatis* en el exudado inflamatorio alrededor del parásito. También permitió determinar la presencia de numerosas bacterias dentro de células mononucleares (macrófagos), alrededor de la larva (Fig. 6).

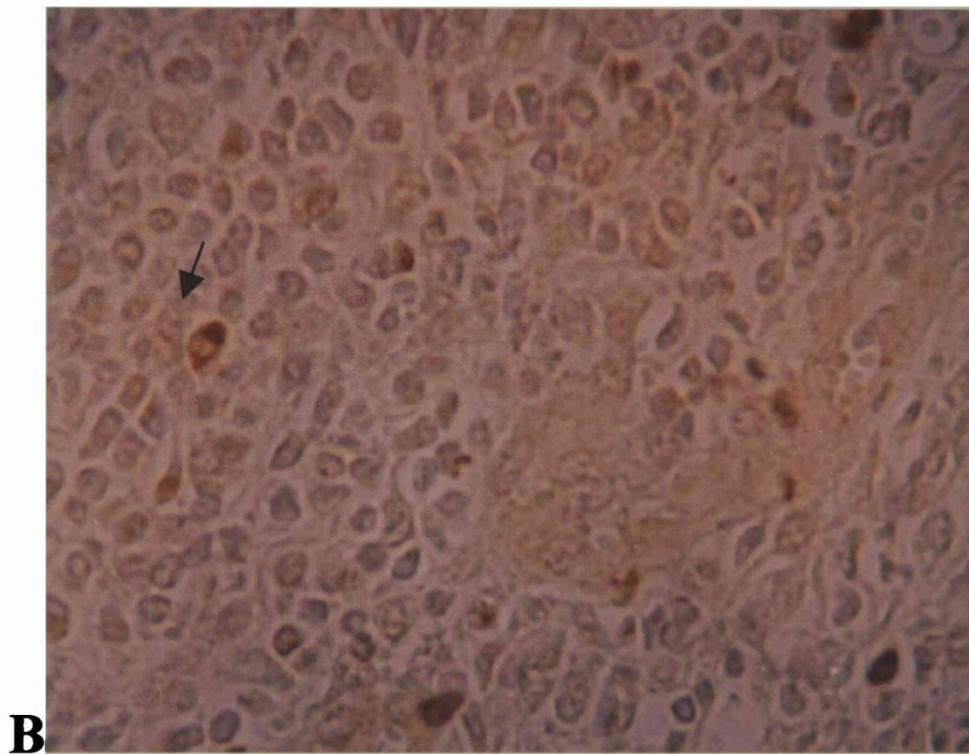
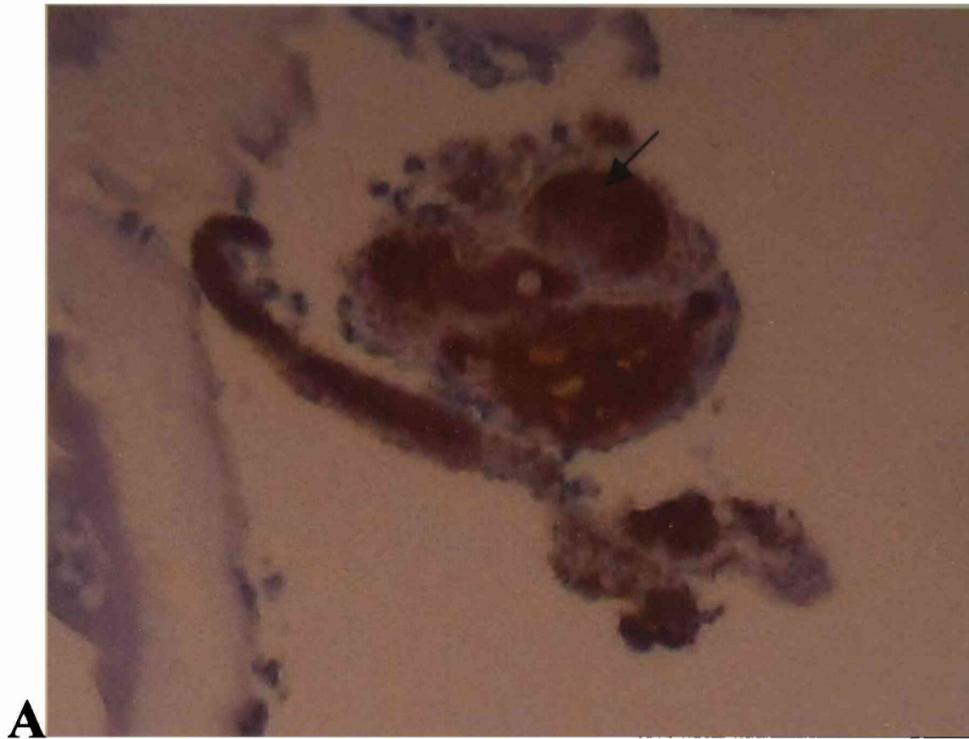


Fig 6. Reacción inmunohistoquímica para la determinación de la presencia de *M. granulomatis*

A. Presencia de marcación en el exudado alrededor del parásito (flecha). B. Células mononucleares mostrando una reacción inmunohistoquímica positiva (flecha). 400x.

La microscopía electrónica confirmó la presencia de la bacteria en el exudado inflamatorio alrededor de la larva, conforme fue sugerido por la marcación observada a través de la técnica de inmunohistoquímica. Los cuerpos bacterianos fueron vistos libres o fagocitados por macrófagos donde permanecían, aparentemente, intactos en el interior de fagosomas (Fig. 7).

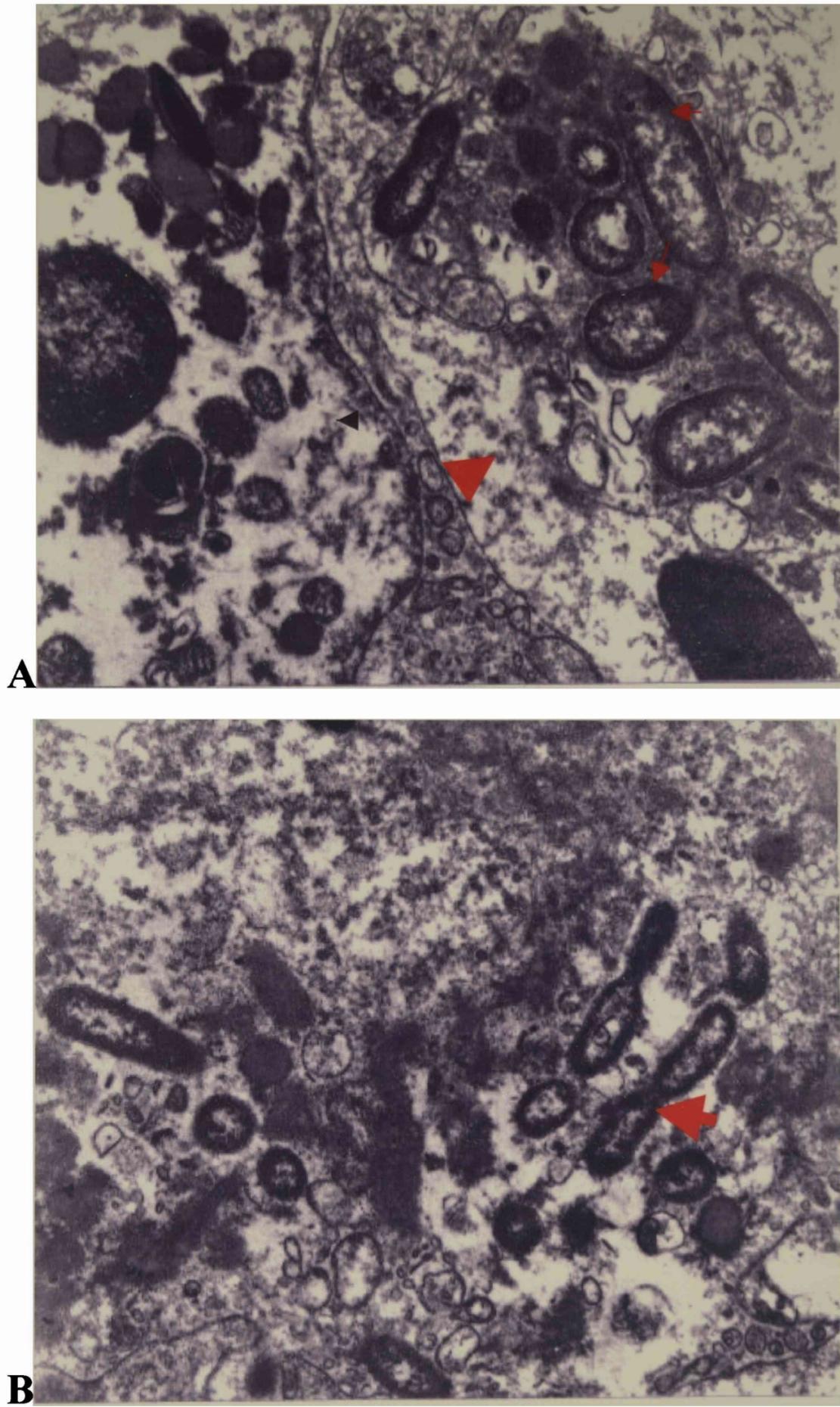


Fig. 7. Micrografía electrónica del tejido inflamatorio adjacente a larva.
A. Macrófago (punta de flecha) exhibiendo cuerpos bacterianos fagocitados en el citoplasma. (flechas). B. Cuerpos bacterianos libres en el exudado (flecha)

La *M. granulomatis* pudo ser aislada de la hemolinfa de las 2 larvas recolectadas de B2 a los 42 días p.i. De las pupas no se pudo aislar la bacteria.

H.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE *M. granulomatis*

A través de la corrida electroforética de las muestras que fueron sometidas a la PCR fue posible diferenciar 8 bandas en cada una de las muestras analizadas. La más pesada correspondió a aproximadamente 5000 pb, mientras que la más liviana fue de 300 pb (Fig. 8). Si bien las bandas de cada muestra presentaron diferencias en su intensidad, todas presentaron el mismo patrón de bandeo. En la columna 5, es evidente la diferencia en el patrón de migración de la *M. haemolytica*, especialmente demostrada por las 3 bandas más livianas de ~200 pb y las dos más pesadas con más de 23000 pb, que aparecen en esta columna.

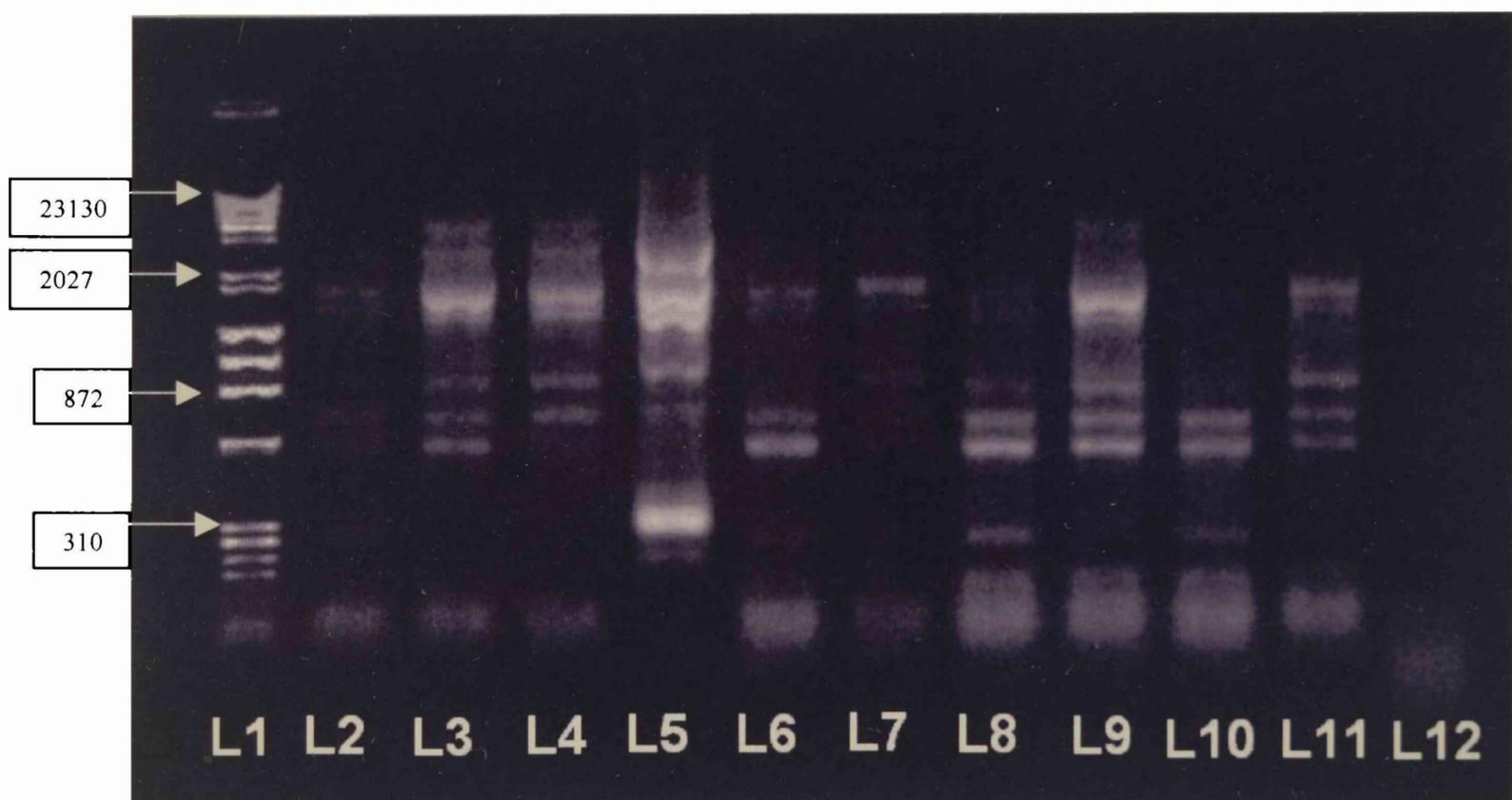


Fig. 8. Electroforesis del RAPD de 8 cepas de *M. granulomatis*. L1: Marcador del peso molecular PhiX174-HaeIII/lambda-HindIII; L2: ATCC 115/86 (control positivo); L3: cepa 13B; L4: cepa 15B; L5: *P. haemolytica* 133/96; L6: cepa 145/91; L7: cepa 294/86; L8: cepa 352/94; L9: cepa 524/95; L10: cepa 03/99; L11: cepa: 300/99; L12: H₂O (control negativo).

H.3. EFECTO DE LA *M. granulomatis* SOBRE CULTIVO DE FIBROBLASTOS

El recuento de fibroblastos obtenido de un cultivo celular incubado con *M. granulomatis* arrojó los resultados que pueden observarse en la Tabla 3. De acuerdo a estos datos, la diferencia estadística en la cantidad de células no fue significativa.

Tratamiento	Células/ml
Fibroblastos control	$3.387.500 \pm 1.45 \times 10^6$
Fibroblastos incubados con <i>M. granulomatis</i>	$3.216.666 \pm 0.43 \times 10^6$

Tabla 3. Recuento celular de fibroblastos infectados con *M. granulomatis*

Los cultivos celulares de fibroblastos incubados con sobrenadante de macrófagos activados fueron contados mediante una cámara celular, obteniéndose los resultados expresados en la Tabla 4. Como en el caso anterior, los fibroblastos cultivados con sobrenadante de macrófagos no mostraron un aumento significativo con respecto a los cultivos control. No obstante, cuando estas células fueron co-cultivadas con sobrenadante de macrófagos infectados con *M. granulomatis*, la diferencia en el recuento celular fue estadísticamente significativa.

Tratamiento	Células/ml
Fibroblastos control	$3.600.000 \pm 0.48 \times 10^6$
Fibroblastos incubados con sobrenadante de macrófagos	$4.504.166 \pm 0.97 \times 10^6$
Fibroblastos incubados con con sobrenadante de macrófagos infectados con <i>M. granulomatis</i>	$5.412.500 \pm 0.87 \times 10^6$

Tabla 4. Recuento celular de fibroblastos incubados con sobrenadante de cultivo de macrófagos

I. DISCUSION

En los estudios previos (14, 18, 19, 24) fue demostrado que la lechiguana es una enfermedad causada por la bacteria *Pasteurella granulomatis*, que más adelante fue caracterizada como *Mannheimia granulomatis* (*M. granulomatis*). La enfermedad se caracteriza por la presencia de una paniculitis fibrogranulomatosa proliferativa con linfangitis y abscesos eosinofílicos. Los autores también sugieren que la causa de la enfermedad podría ser una asociación de la bacteria con la larva de la mosca *Dermatobia hominis* (*D. hominis*).

En el presente trabajo, fueron inoculados dos bovinos con larvas de primer estadio (L1) de *D. hominis*. Uno de los animales fue también inoculado con *M. granulomatis*, con el objetivo de comparar las lesiones histológicas causadas por la *D. hominis* con y sin la presencia de la bacteria. Las lesiones encontradas en ambos casos, así como las características histológicas observadas, fueron en un todo comparables con las descripciones de Sanavria *et al.* (26) y Pereira *et al.* (19). Este último autor describe lesiones conteniendo microabscesos y linfangitis eosinofílica en un animal inoculado experimentalmente con *D. hominis* y *M. granulomatis*. La linfangitis eosinofílica, con ruptura de la pared de vasos sanguíneos y formación de los microabscesos eosinofílicos, también han sido descriptos como las lesiones primarias de la lechiguana (24). La observación de las lesiones en tres estudios realizados sobre biopsias indica que la infección bacteriana es la responsable de la aparición de la linfangitis y los abscesos eosinofílicos. La marcada proliferación del tejido fibroso, observada en los casos espontáneos de la enfermedad (24), no fue reproducida en el presente trabajo.

En la biopsia realizada a los 28 días posteriores a la inoculación de la *D. hominis*, fueron observadas bacterias en el interior de los macrófagos, tanto en los estudios de microscopia electrónica como en los de inmunohistoquímica. Andrade (2) observó, a través de la reacción inmunohistoquímica, la marcación de *M. granulomatis* en el interior o alrededor de los microabscesos o de la linfangitis eosinofílica, o próximos a la acumulación de células inflamatorias en casos espontáneos de la enfermedad. La presencia de los cuerpos bacterianos aparentemente intactos en el interior de los fagosomas macrofágicos sugiere que estas bacterias tienen un mecanismo que evita que la vesícula endocítica se fusione con el lisosoma, evitando de esta forma, la exposición a las enzimas lisosomales, de manera similar a lo que ocurre cuando los

macrófagos ingieren *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Encephalitozoon cuniculi* y algunas *Chlamydiae* (10).

En los tres casos en que la enfermedad fue reproducida experimentalmente, la lesión fue observada 34 días después de la inoculación, en dos casos (14, 24) y 90 días después, en el caso restante (19). Con estos datos es posible especular que la bacteria permanece en los macrófagos del hospedador hasta que, por algún factor patogénico desconocido, se desencadena la enfermedad o se produce la destrucción de la misma (13). El aislamiento de *M. granulomatis* de la hemolinfa de las larvas recolectadas a los 42 días después de la inoculación, así como la observación de la bacteria en el interior de la larva mediante las técnicas inmunohistoquímicas demostraron que la *M. granulomatis* es capaz de sobrevivir en el interior de las larvas, y sugiere que la *D. hominis* actúa como vector de la bacteria. Esta posibilidad fue evidenciada por Ladeira et al. (14), que aislaron *M. granulomatis* de larvas recolectadas de un animal proveniente de una propiedad donde nunca había ocurrido un caso de lechiguana. Esto podría sugerir que la mosca puede ser transportadora de la bacteria. Diversas especies bacterianas han sido asociadas con dípteros. Las larvas de las moscas pueden ingerir bacterias con la alimentación, las que persisten en los diferentes períodos evolutivos del parásito pasando a través del tracto alimentario, donde se multiplican, hasta ser eliminadas por los excrementos de la mosca adulta. Una o más especies de bacterias pueden ser encontradas en la sangre de la *Musca domestica* (mosca doméstica), dependiendo de la edad, nutrición y medio en la que esta vive. Los huevos de *Dacus oleae* (mosca de las oliveras) se contaminan por *Ascobacterium luteum* en el momento de la oviposición. La bacteria se localiza en sectores del tracto anal muy próximos a la abertura del oviducto. Cuando los huevos del parásito pasan a la vagina son presionados contra la abertura y las bacterias contenidas en estas porciones contaminan la superficie de los mismos. La bacteria penetra a través de los micrópilos hacia el interior del huevo acompañando el desarrollo embriológico del insecto (27).

El mecanismo que usa la bacteria para inducir una marcada proliferación del tejido fibroso, como ocurre en los casos espontáneos de la enfermedad (14, 24), no está todavía esclarecido. Un mecanismo que podría explicar las extensas áreas fibrosas presentes en los casos de lechiguana sería la estimulación de la síntesis del colágeno por parte de los fibroblastos proliferados a partir de factores secretados por los macrófagos infectados (10). De acuerdo con Andrade *et al.* (2), al usar el método de polarización de luz con la tinción del Picrosirius en cortes histológicos de casos

espontáneos de lechiguana, se observa una producción progresiva y ordenada de tejido conjuntivo, como ocurre en los procesos de cicatrización, donde las tramas delicadas de colágeno (tipo III) son substituidas por fibras bastante más espesas (colágeno tipo I). La actividad celular se muestra siempre más acentuada alrededor de las colecciones de células inflamatorias, lo que sugiere que los mediadores secretados tienen una gran importancia en la activación génica de la síntesis de la matriz extracelular.

En este trabajo se observó que la sola presencia de la bacteria en el cultivo de fibroblastos no fue suficiente para inducir un aumento significativo de la cantidad de estas células. Lo mismo ocurrió cuando se utilizaron sustancias producidas por macrófagos, sin la estimulación bacteriana. La proliferación de fibroblastos fue significativa cuando los macrófagos fueron estimulados con la *M. granulomatis*. Esto sugiere que es preciso que el macrófago sea estimulado por las endotoxinas de la bacteria y produzca factores de crecimiento, tales como las interleuquinas y enzimas, que provoquen la proliferación de los fibroblastos y consecuentemente mayor secreción de colágeno (1, 13, 29).

Las muestras de *M. granulomatis* aisladas de casos espontáneos de lechiguana, sometidas a la prueba de RAPD presentaron bastante homogeneidad entre el número y localización de las bandas identificadas, usando los primer 2A y 3A. Los resultados demostraron la ausencia de diversidad entre las cepas. Otros autores observaron el mismo patrón al usar cepas y primers diferentes a los utilizados en este trabajo (11, 12, 32). Esta prueba resultó ser bastante útil para el diagnóstico de *M. granulomatis* en muestras clínicas, cuando falló el cultivo.

J. CONCLUSIONES

- A través de las técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica fue posible determinar la presencia de *M. granulomatis* en el exudado inflamatorio alrededor del parásito así como en el interior del mismo. Cuerpos bacterianos también fueron observados libres en la lesión o fagocitados por macrófagos.
- La *M. granulomatis* es capaz de sobrevivir en el interior de la larva de *D. hominis*, actuando esta como vector de la bacteria.
- La reacción granulomatosa producida por la *D. hominis* podría ser la lesión inicial de la lechiguana si la bacteria está presente.
- *M. granulomatis* no es capaz de estimular por sí misma la proliferación de fibroblastos. Para que esto ocurra se requiere de la presencia de macrófagos activados por la bacteria.
- No se observaron diferencias genómicas entre las cepas de *M. granulomatis* aisladas de casos espontáneos, cuando fueron analizadas mediante la prueba de RAPD.
- La prueba de RAPD resulta ser útil para el diagnóstico de *M. granulomatis* en muestras clínicas, cuando falla el cultivo.

K. BIBLIOGRAFIA

1. ALMEIDA-LOPES, L. (1999). Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência. Dissertação de mestrado. São Paulo. Faculdade de Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale da Paraíba. p78.
2. ANDRADE, GB. (1999). Estudo histoquímico, morfométrico e molecular do colágeno na paniculite fibrogranulomatosa proliferativa focal dos bovinos (lechiguana). Dissertação de doutorado. São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo. p88.
3. ANDRADE, GB; RIET-CORREA, F; MONTES, GS; BATTLEHNER, CN; SALDIVA, PH. (1997). Dating of fibrotic lesions by the Picrosirius-polarization method. An application using the lesions of Lechiguana (bovine focal proliferative fibrogranulomatous panniculitis). *Eur J Histochem*; 41(3):203-209.
4. ANGEN, O; AHRENS, P; BISGAARD, M. (2002). Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet Microbiol*; 84(1-2):103-14.
5. ANGEN, O; MUTTERS, R; CAUGANT, DA; OLSEN, JE.; BISGAARD, M. (1999). Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*; 49 Pt 1:67-86.
6. BIRGEL Jr., EH; OLLHOFF, RD; BENESI, FJ; VIANA, RB; SHALSH, UM; PACHECO, JCG; FLORIO, WAB; RAMOS, MCC; BIRGEL, EH. (1999). Ocorrência de lechiguana (paniculite fibrogranulomatosa proliferativa) em bovino criado no Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, 66(supl.):130.
7. BLACKALL, PJ; BISGAARD, M; STEPHENS, CP. (2002). Phenotypic characterisation of Australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*., *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*. *Aust Vet J*; 80(1-2):87-91.

8. BRADE, V. DIESELHOFF-DEN DULK, MM; VAN FURTH, R. (1982). Isolation and characterisation of mononuclear phagocytes from the bone marrow, blood, and peritoneal cavity of the guinea-pig. *J Pathology* 137(2):139-147.
9. CHANDLER, AC; CLARK, PR. (1965). *Introducción a la parasitología*. Ediciones Omega, S.A.- Barcelona. p.814-816.
10. FRIEDMAN, H; ESCOBAR, M; REICHARD, SM. (1980). The Reticuloendothelial System. *Ed. Plenum*, 793(1-8):36-37.
11. GOMES, FR; LADEIRA, SL; COIMBRA, HS; SCHUCH, LFD. (2002). Identificação de *Mannheimia granulomatis* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). *Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET) Gramado- RS*
12. GOMES, FR; LADEIRA, SL; COIMBRA, HS; SCHUCH, LFD. (2003). Perfil genómico de *Mannheimia granulomatis* pela técnica de RAPD. *Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Florianópolis, SC.*
13. JANEWAY, CA; TRAVERS, P; WALPORT, M. & SHLOMCHIK, M. (2002). *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. Ed. Artmed. 5ªed. 357-358.
14. LADEIRA, SL; RIET-CORREA, F; PEREIRA, DB; CARTER, GR. (1996). Role of *Pasteurella granulomatis* and *Dermatobia hominis* in the etiology of lechiguana in cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 791:359-368.
15. LUNA, GL. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institut of Pathology* (1968). 3ed. New York, MC Graaw – Hill, 285p.
16. MARTINS, LA. (1998). Modulação da resposta imune em animais de experimentação inoculados com *Pasteurella granulomatis*. *Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, São Paulo.*
17. MOYA BORJA, GE. (1982). O berne: biología, comportamento e controle. *Defesa Vegetal & Animal – Agroquímica CIBA-GEIGY*. 17:19-26.
18. PEREIRA, DB. (1997). Lechiguana: Aspectos patogênicos, estudo de portadores de *Pasteurella granulomatis* e novos casos da doença em bovinos. *Dissertação de mestrado. Pelotas, Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, 51p.*
19. PEREIRA, DB; RIET-CORREA, F; LADEIRA, SL. (2000). *Estudos*

- complementares da infecção por *Mannheimia granulomatis* (lechiguana) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 20(3):91-96.
20. RIBEIRO, PB. (1998). Miiasis. En RIET-CORREA, F; SCHILD, AL; MÉNDEZ, MC. *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*. Editorial Universitaria UFPel. Pelotas. Brasil.
 21. RIBEIRO, GA; CARTER, GR; FREDERIKSEN, W; RIET-CORREA, F. (1989). *Pasteurella haemolytica*-like bacterium from a progressive granuloma of cattle in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, 27(6):1401-1402.
 22. RIBEIRO, PB; DE OLIVEIRA, CMB. (1983). Fase parasitária da *Dermatobia hominis* sobre bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 35(5):691-698.
 23. RIET-CORREA, F; LADEIRA, SL.; ANDRADE, GB; CARTER, GR. (2000) Lechiguana (focal proliferative fibrogranulomatous panniculitis) in cattle. *Veterinary Research Communications*, 24:557-572.
 24. RIET-CORREA, F; MÉNDEZ, MC; SCHILD, AL; RIBEIRO, GA; ALMEIDA, SM. (1992). Bovine focal proliferative fibrogranulomatous panniculitis (lechiguana) associated with *Pasteurella granulomatis*. *Vet. Pathol.*, 29:93-103.
 25. SAMBROOK, J; FRITSCH, EF; MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2ªed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 6.
 26. SANAVRIA, A; LOPES, CWG.; MOYA BORJA, GE. (1987). Histopatologia da pele de bovino na infecção experimental por *Dermatobia hominis*. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro*. 10(1-2):9-23.
 27. STENHAUS, EA. *Insect Microbiology*. (1967). Hafner Publishing Company, New York and London. 763p.
 28. THOMSON, RG. (1990). *Patologia Veterinária Especial*. Ed. Manole Ltda. São Paulo, p.32-33.
 29. TIZARD, IR. (2002). *Imunologia Veterinaria. Uma Introdução*. Ed Roca. 6ªed. p.34.
 30. VALLES, GM. (1977). Ecología y control de *Dermatobia hominis* en Colombia. Trabajos presentados en el Seminario sobre Ecología y control de los parasitos externos de importancia económica que afectan el ganado en América Latina. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia.) Serie CS-13:141-146.
 31. VARASCHIN, MS; SILVA, AM. (1998). Paniculite fibrogranulomatosa focal em bovino de Minas Gerais. *Ciência Rural*, 28:151-153.

32. VEIT, HP; CARTER, GR; RIET-CORREA, F; BROWN, SS. (1995). The use of polymerase chain reaction to identify *Pasteurella granulomatis* from cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 791:350-358.
33. VEIT, HP; WISE, DJ; CARTER, GR; CHENGAPPA, MM. (1998). Toxin production by *Pasteurella granulomatis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 849:479-84.
34. WEINFELD, I; BIRMAN, EG, PAULA, CR. (1999). Macrophages phagocytosis of *Candida albicans*. An *in vitro* study. *Rev Odont Univ São Paulo*, v.13, n.3. p.233-238.