



Universidad Nacional Autónoma  
de México

Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia

División de Estudios de Posgrado



01671  
1ej.  
1

**Eventos Inflamatorios en el Pulmón y su Correlación con la  
Remoción Bacteriana en Ratones Inoculados con Pasteurella  
Haemolytica y Staphylococcus Aureus**

**T E S I S**

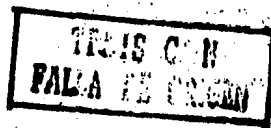
Presentada para la obtención del grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**AREA PATOLOGIA ANIMAL**

por

**JULIO MARTINEZ BURNES**



1984



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**EVENTOS INFLAMATORIOS EN EL PULMON Y SU CORRELACION CON LA  
REMOCION BACTERIANA EN RATONES INOCULADOS CON PASTEURELLA  
HAEMOLYTICA Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

**Tesis presentada ante la  
División de Estudios de Posgrado de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
de la  
Universidad Nacional Autónoma de México  
para la obtención del grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**AREA PATOLOGIA ANIMAL**

**por**

**JULIO MARTINEZ BURNES**

**Marzo de 1984**

**Asesores:**

**M.V.Z. MSc. PhD. Alfonso López Mayagoitia**

**M.V.Z. MSc. Martha Merino Moncada**

**M.V.Z. MSc. Pedro Ochoa Galván**

## DATOS BIOGRAFICOS

El autor nació en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, el 1º de Noviembre de 1955, en donde realizó sus estudios de primaria, secundaria y preparatoria. Posteriormente realizó su licenciatura en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas de 1973 a 1978, obteniendo el título de Médico Veterinario Zootecnista en 1979.

A partir de 1979 desempeñó el puesto de Maestro de tiempo completo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, colaborando en las labores de docencia y extensión.

En octubre de 1980 se inscribió como estudiante de Posgrado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, área Patología animal.

## RESUMEN

MARTINEZ BURNES, JULIO. "Eventos inflamatorios en el pulmón y su correlación con la remoción bacteriana en ratones inoculados con Pasteurella haemolytica y Staphylococcus aureus". (Bajo la dirección del MVZ. MSc., PhD. Alfonso López Mayagoitia).

Debido a la gran importancia que tienen las neumonías bacterianas en la salud del hombre y los animales, en los últimos años se han realizado numerosas investigaciones con el objeto de esclarecer su patogénesis. Uno de los métodos más utilizados ha sido el estudio de la remoción bacteriana, el cual permite conocer la viabilidad de las bacterias inhaladas en el pulmón a través del tiempo. Otro método que se ha utilizado en la actualidad es el de lavado traqueo-bronquial que permite conocer la respuesta celular que ocurre en un pulmón después de haber sido expuesto a un aerosol de bacterias. El objetivo de esta investigación fue estudiar la correlación entre la remoción bacteriana y la respuesta celular en pulmones de ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica o de S. aureus. Trecientos cincuenta y dos ratones fueron divididos en tres grupos, uno fue expuesto a P. haemolytica, otro a S. aureus y otro permaneció como testigo. Todos los grupos fueron ordenados al azar e inoculados por aerosol durante diez minutos, utilizando una cámara de acrílico con tres nebulizadores. Los animales inoculados se sacrificaron a diferentes intervalos de tiempo (0,1,2,4,8,12,24,48,72,150 y 300 horas). No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la remoción bacteriana entre los grupos expuestos a P. haemolytica y a S. aureus. Las curvas de remoción bacteriana fueron similares a las descritas por otros investigadores. La respuesta celular en el grupo inoculado con P. haemolytica mostró un incremento dramático y significativo ( $p < 0.01$ )

en el número de neutrófilos comparado con el grupo inoculado con S. aureus y con el testigo. El grupo expuesto a P. haemolytica presentó una correlación negativa ( $r = -0.51$ ) entre el número de neutrófilos presentes en las vías aéreas y el número de bacterias en el pulmón. En el grupo inoculado con S. aureus la correlación fue positiva ( $r = 0.21$ ). Por lo que respecta a la asociación de los macrófagos y el número de bacterias, esta fue negativa ( $r = -0.34$ ) en el caso de P. haemolytica y positiva en el caso de S. aureus ( $r = 0.48$ ).

Histológicamente se demostró la migración de neutrófilos a la lámina propia y a los espacios aéreos en los pulmones de los ratones expuestos a P. haemolytica.

# LISTA DE CONTENIDO

Página

<b>I INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>II REVISION DE LA LITERATURA</b>	
<b>1. Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Aerosoles.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Inhalación de partículas.....</b>	<b>6</b>
<b>a) Características físicas de las partículas.....</b>	<b>7</b>
<b>b) Efecto del tamaño de las partículas sobre su depósito en el aparato respiratorio.....</b>	<b>9</b>
<b>c) Mecanismos de depósito de partículas.....</b>	<b>10</b>
<b>i) Impacto.....</b>	<b>10</b>
<b>ii) Sedimentación.....</b>	<b>11</b>
<b>iii) Movimiento Browniano.....</b>	<b>11</b>
<b>4. Aerosoles de bacterias.....</b>	<b>12</b>
<b>5. Modelos experimentales de inoculación de bacterias en aerosoles.....</b>	<b>13</b>
<b>6. Modelos experimentales de remoción bacteriana.....</b>	<b>18</b>
<b>a) Modelos de remoción bacteriana en diferentes especies animales.....</b>	<b>19</b>
<b>i) Ratones.....</b>	<b>19</b>
<b>ii) Ratas.....</b>	<b>23</b>
<b>iii) Cobayos.....</b>	<b>24</b>
<b>iv) Conejos.....</b>	<b>25</b>
<b>v) Perros.....</b>	<b>25</b>
<b>vi) Cerdos.....</b>	<b>25</b>
<b>vii) Bovinos.....</b>	<b>26</b>
<b>7. Remoción bacteriana en condiciones adversas.....</b>	<b>27</b>
<b>8. Estudio de las células del tracto respiratorio mediante el uso de lavados bronquio-alveolares.....</b>	<b>31</b>

## LISTA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
a) Células bronquio-alveolares en condiciones normales.....	33
b) Cambios en las células bronquio-alveolares como respuesta a diferentes estímulos en el aparato respiratorio.....	35
9. Cambios macroscópicos y microscópicos en la respuesta inflamatoria del aparato respiratorio.....	40
 <b>III MATERIAL Y METODOS</b>	
1. Estudio piloto.....	46
2. Animales experimentales.....	47
3. Preparación del inóculo.....	48
4. Cámara de exposición al aerosol.....	50
a) Técnica de inoculación.....	50
b) Exposición de ratones al aerosol.....	51
5. Depósito de <u>Pasteurella haemolytica</u> y <u>Staphylococcus aureus</u> en el pulmón.....	52
6. Determinación de la retención y remoción pulmonar de <u>P. haemolytica</u> y <u>S. aureus</u> .....	54
a) Determinación de la retención.....	54
b) Determinación de la remoción.....	54
7. Lavado bronquio-alveolar.....	55
a) Colección y preparación de muestras para la cuenta de células bronquio-alveolares.....	55
b) Cuenta de células nucleadas de los lavados bronquio-alveolares.....	57
c) Cuenta diferencial de macrófagos y neutrófilos en los lavados bronquio-alveolares.....	58
d) Cuenta absoluta de macrófagos y neutrófilos en los lavados bronquio-alveolares.....	58
8. Lesiones macroscópicas y microscópicas.....	59
a) Colección de muestras.....	59
b) Lesiones macroscópicas.....	60



# LISTA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
c) Histopatología.....	61
IV DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADISTICO.....	62
1. Remoción bacteriana.....	62
2. Lavado bronquio-alveolar.....	67
3. Perfusión pulmonar.....	71
V RESULTADOS	
A. Remoción bacteriana del pulmón.....	75
B. Poblaciones celulares en los lavados bronquio-alveolares.....	93
C. Lesiones macroscópicas y microscópicas.....	126
VI DISCUSION.....	129
VII REFERENCIAS.....	143
VIII APENDICE.....	156

## LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro</u>	<u>Página</u>
1. Pesos, frecuencias, volúmenes respiratorios y áreas de superficie alveolar en diferentes especies animales, calculados de varias fuentes	8
2. Diferentes tipos de investigaciones del aparato respiratorio utilizando modelos experimentales de inoculación de bacterias por aerosoles	15
3. Reportes de factores exógenos que afectan experimentalmente la remoción bacteriana del aparato respiratorio de diferentes especies animales	28
4. Reportes de factores endógenos y misceláneos que afectan experimentalmente la remoción bacteriana del aparato respiratorio de diferentes especies animales	29
5. Reportes de factores que han demostrado no tener efecto adverso experimentalmente sobre la remoción bacteriana del aparato respiratorio en diferentes especies animales	30
6. Alteraciones inducidas por los virus en los mecanismos de defensa antibacterianos del pulmón	32
7. Porcentajes de macrófagos alveolares y neutrófilos en los lavados bronquio-alveolares, encontrados en varias especies animales bajo condiciones normales	34
8. Número de unidades formadoras de colonias de <u>P. haemolytica</u> y <u>S. aureus</u> por ml de inóculo utilizado en los aerosoles a los que se expusieron los ratones	50
9. Número de ratones usados para cada técnica en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación después de exponerlos a un aerosol de <u>P. haemolytica</u> . Primera etapa.	63
10. Número de ratones usados para cada técnica en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación después de exponerlos a un aerosol de <u>S. aureus</u> . Segunda etapa.	64
11. Definición de variables utilizadas en el estudio de la remoción bacteriana en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> y <u>S. aureus</u>	65
12. Definición de variables utilizadas en el estudio de los lavados bronquio-alveolares de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> , de <u>S. aureus</u> y testigos	69
13. Diseño experimental. Variables, escalas y pruebas estadísticas utilizadas en los parámetros investigados de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> , de <u>S. aureus</u> y testigos	73

<u>Cuadro</u>	<u>Página</u>
14. Diseño experimental. Variables, escalas y pruebas estadísticas utilizadas en los parámetros investigados de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> , de <u>S. aureus</u> y testigos	74
15. Concentraciones de inóculo y depósito de <u>P. haemolytica</u> y <u>S. aureus</u> en los pulmones de ratones inoculados por aerosol	80
16. Número de bacterias por gramo de pulmón (COLGRPUL) de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> (grupo P) y de <u>S. aureus</u> (grupo S) en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación	83
17. Número de bacterias por ratón (COLRATON) obtenido de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> (grupo P) y de <u>S. aureus</u> (grupo S) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación	83
18. Análisis de varianza del número de bacterias por gramo de pulmón, transformado a logaritmos; base 10 (COLLOG) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> (grupo P) y <u>S. aureus</u> (grupo S)	84
19. Índices o porcentajes de retención bacteriana (INRET) obtenidos de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> y de <u>S. aureus</u> en diferentes intervalos de tiempo postinoculación	87
20. Índices o porcentajes de remoción bacteriana (INREM) obtenidos de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> (grupo P) y de <u>S. aureus</u> (grupo S) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación	87
21. Análisis de varianza del índice de retención pulmonar; transformación logarítmica base 10 (INRETLOG) de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> (grupo P) y de <u>S. aureus</u> (grupo S)	90
22. Análisis de varianza del índice de remoción pulmonar; transformado a logaritmos; base 10 (INREMLOG) de ratones expuestos a <u>P. haemolytica</u> (P) y a <u>S. aureus</u> (S) en aerosol	91
23. Coeficientes de correlación entre las medias de las variables de remoción bacteriana pulmonar estudiadas con respecto a tiempo postinoculación (horas)	92
24. Número de células nucleadas por ml de lavado bronquio-alveolar (NUCENUCL) de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> (grupo P), <u>S. aureus</u> (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación	106

25. Número de células nucleadas por gramo de peso vivo (CEGRPV) obtenido de ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 106
26. Análisis de varianza de l número de células nucleadas transformado a logaritmos (NUCENLOG) de ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) 108
27. Porcentaje de neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (CUDIFN) obtenido de ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 111
28. Porcentaje de macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (CUDIFM) obtenido de ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 111
29. Análisis de varianza de l porcentaje de neutrófilos (CUDIFN) y de macrófagos (CUDIFM) de ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) 112
30. Número absoluto de neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (NUABSN) obtenido de ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 115
31. Número absoluto de macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (NUABSM) obtenido de ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 115
32. Análisis de varianza de l número absoluto de neutrófilos transformado a logaritmos (NABNLOG) de ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) 116
33. Análisis de varianza de l número absoluto de macrófagos transformado a logaritmos (NABMLOG) de ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) 119
34. Índice de neutrófilos entre macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (INM) de ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 120

<u>Cuadro</u>	<u>Página</u>
35. Índice de macrófagos entre neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (IMN) de ratones expuestos a aerosoles de <u>P. haemolytica</u> (grupo P), <u>S. aureus</u> (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación	120
36. Análisis de varianza del índice de neutrófilos entre macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (IMN) de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> (grupo P), <u>S. aureus</u> (grupo S) y testigos (grupo T)	121
37. Análisis de varianza del índice de macrófagos entre neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (IMN) de ratones expuestos a aerosoles de <u>P. haemolytica</u> (grupo P), <u>S. aureus</u> (grupo S) y testigos (grupo T)	122
38. Coeficientes de correlación entre las variables obtenidas de los lavados bronquio-alveolares con respecto al tiempo postinoculación (horas)	123
39. Coeficientes de correlación entre el número de células nucleadas (NUCENUC), de neutrófilos (NUABSN) y de macrófagos (NUABSM) con respecto a la retención (INRET) y remoción bacteriana (INREM)	124
40. Porcentaje de ratones que presentaron cambios histopatológicos en los diferentes intervalos de tiempo después de la inoculación con <u>P. haemolytica</u>	126

## LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1. Número de bacterias por gramo de pulmón (COLGRPUL) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> o de <u>S. aureus</u> (media $\pm$ error estándar)	81
2. Número de bacterias por gramo de pulmón (COLLOG) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> o de <u>S. aureus</u> (media $\pm$ error estándar)	82
3. Índice de retención bacteriana del pulmón (INRET) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> o de <u>S. aureus</u> (media $\pm$ error estándar)	85
4. Índice de remoción bacteriana del pulmón (INREM) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> o de <u>S. aureus</u> (media $\pm$ error estándar)	86
5. Índice de retención bacteriana del pulmón (INRETLOG) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> o de <u>S. aureus</u> (media $\pm$ error estándar)	88
6. Índice de remoción bacteriana del pulmón (INREMLOG) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> o de <u>S. aureus</u> (media $\pm$ error estándar)	89
7. Número de células nucleadas por ml de lavado bronquio-alveolar (NUCENUC) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> , de <u>S. aureus</u> y testigos (media $\pm$ error estándar)	105
8. Número de células nucleadas por ml de lavado bronquio-alveolar (NUCENLOG) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> , de <u>S. aureus</u> y testigos (media $\pm$ error estándar)	107
9. Porcentaje de neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (CUDIFN) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> , de <u>S. aureus</u> y testigos (media $\pm$ error estándar)	109
10. Porcentaje de macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (CUDIFM) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> , de <u>S. aureus</u> y testigos (media $\pm$ error estándar)	110
11. Número absoluto de neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (NUABSN) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> , de <u>S. aureus</u> y testigos (media $\pm$ error estándar)	113
12. Número absoluto de neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (NABNLOG) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> , de <u>S. aureus</u> y testigos (media $\pm$ error estándar)	114

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
13. Número absoluto de macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (NUABSM) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> , de <u>S. aureus</u> y testigos (media $\pm$ error estándar)	117
14. Número absoluto de macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (NABMLOG) en ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> , de <u>S. aureus</u> y testigos (media $\pm$ error estándar)	118
15. Células bronquio-alveolares recuperadas después de la inoculación con <u>P. haemolytica</u> . Población predominante de neutrófilos y algunos macrófagos (flechas). Tinción Wright (x 400)	125
16. Células bronquio-alveolares recuperadas después de la inoculación con <u>S. aureus</u> . Macrófagos alveolares con vacuolas en citoplasma. Tinción Wright (x 1000)	125
17. Pulmón de ratón cuatro horas después de la inoculación con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> . Migración de neutrófilos a través de la lámina propia y del epitelio ciliado de bronquiolo (flechas). H & E (x 400)	127
18. Pulmón de ratón cuatro horas después de la inoculación con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> . Neutrófilos en alvéolos. H & E (x 400)	127
19. Pulmón de ratón después de la inoculación con aerosoles de <u>S. aureus</u> . Espacios aéreos sin exudación celular. H & E (x 25)	128

## LISTA DE APENDICES

<u>Apéndice</u>	<u>Página</u>
1. Aparato de inoculación por aerosol	157
2. Aparato de inoculación por aerosol (Diagrama de flujo de aire)	158
3. Número de bacterias por gramo de pulmón (COLGRPUL) de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> (grupo P) y de <u>S. aureus</u> (grupo S) en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación	159
4. Número de bacterias por ratón (COLRATON) obtenido después de la inoculación con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> (grupo P) y de <u>S. aureus</u> (grupo S) en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación	160
5. Pruebas de Duncan para comparación de medias de las variables COLGRPUL, COLLOG y COLRATON en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación (horas) de ratones expuestos a aerosoles de <u>P. haemolytica</u>	161
6. Pruebas de Duncan para comparación de medias de las variables COLGRPUL, COLLOG y COLRATON en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación (horas) de ratones expuestos a aerosoles de <u>S. aureus</u>	161
7. Indices o porcentajes de retención bacteriana (INRET) obtenidos de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> y de <u>S. aureus</u> en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación	162
8. Indices o porcentajes de remoción bacteriana (INREM) obtenidos de ratones inoculados con aerosoles de <u>P. haemolytica</u> (grupo P) y <u>S. aureus</u> (grupo S) en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación	163
9. Pruebas de Duncan para comparar medias de las variables INRET, INRETLOG, INREM e INREMLOG en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación (horas) en ratones expuestos a aerosoles de <u>P. haemolytica</u>	164
10. Pruebas de Duncan para comparación de medias de las variables INRET, INRETLOG, INREM e INREMLOG en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación (horas) en ratones expuestos a aerosoles de <u>S. aureus</u>	164
11. Pesos de los ratones utilizados en el estudio de la remoción bacteriana pulmonar	165



12. Número de células nucleadas por ml de lavado bronquio-alveolar (NUCENUC) de ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos con solución amortiguadora (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 166
13. Número de células por gramo de peso vivo (CEGRPV) obtenido por lavados bronquio-alveolares de ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 167
14. Pruebas de Duncan para comparación de medias del número de células nucleadas por ml de lavado (NUCENUC), su transformación logarítmica (NUCENLOG) y el número de células por gramo de peso vivo (CEGRPV) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) 168
15. Porcentaje de neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (CUDIFN) obtenido en las cuentas diferenciales de ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 169
16. Porcentaje de macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (CUDIFM) obtenido de ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 170
17. Pruebas de Duncan para comparación de medias del porcentaje de neutrófilos (CUDIFN) y macrófagos (CUDIFM) en ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) 171
18. Número absoluto de neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (NUABSN) obtenido de ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 172
19. Pruebas de Duncan para comparación de medias del número absoluto de neutrófilos (NUABSN) y su transformación logarítmica (NABNLOG) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) 173

20. Número absoluto de macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (NUABSM) obtenido de ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 174
21. Pruebas de Duncan para comparación de medias del número absoluto de macrófagos (NUABSM) y su transformación logarítmica (NABMLOG) en ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) 175
22. Índice de neutrófilos entre macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (INM) de ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 176
23. Índice de macrófagos entre neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (IMN) de ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) en diferentes intervalos de tiempo postinoculación 177
24. Pruebas de Duncan para comparación de medias del índice de neutrófilos entre macrófagos (IMN) y del índice de macrófagos entre neutrófilos (IMN) de ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica (grupo P), S. aureus (grupo S) y testigos (grupo T) 178
25. Peso vivo, volumen de lavado bronquio-alveolar recuperado (VOLRECT), promedio de los tres lavados (VOLRECML) y relación volumen/peso vivo de ratones utilizados en el estudio de las poblaciones celulares del pulmón 179
26. Porcentaje total (PTVOLREC) e individual (PVOLREI<sub>1,2,3</sub>) de volúmenes recuperados en los lavados bronquio-alveolares de ratones 179

## 1. INTRODUCCION

La producción de carne y leche no ha podido incrementarse con la misma rapidez con la que ha aumentado la población mundial debido a diferentes factores ( 9 ). Entre las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en el ganado bovino y porcino en Europa y Norteamérica incluyendo a México están las infecciones respiratorias ( 14,125,170, 93). Las pérdidas económicas por las neumonías en cuanto a muerte, gastos de medicinas y de veterinario, así como también la baja producción de los animales sobrevivientes ocasionan que los costos de producción aumenten y la disponibilidad de estos alimentos disminuya.

Durante muchos años se ha tratado de entender los mecanismos que operan en la producción de las neumonías infecciosas de los animales domésticos. Los resultados han sido insuficientes lo que a su vez no ha permitido el desarrollo de métodos efectivos para la prevención de estas enfermedades ( 37, 95). La mayoría de los investigadores en ésta área han buscado productos biológicos que tengan efecto inmunoproláctico (133, 124) y han descuidado el estudio de los principios básicos que gobiernan la respuesta inflamatoria (151).

En los últimos años muchas investigaciones se han desarrollado para tratar de entender los mecanismos de defensa que operan en el pulmón humano ( 40). Particularmente se ha estudiado el destino de bacterias potencialmente patógenas inhaladas por el pulmón. Tradicionalmente se ha dado mayor importancia a los macrófagos alveolares como principal línea de defensa contra partículas inhaladas, sin embargo, estudios recientes han puesto en duda el papel de estas células fagocíticas (141). Actualmente se ha tratado de determinar el papel de los neutrófilos en los mecanismos de defensa del pulmón. La mayoría de estas investigaciones se han llevado

a cabo en animales de laboratorio y sus resultados han sido extrapolados para el estudio de la patogénesis, el tratamiento y la prevención de las neumonías del hombre (110). Llama la atención el hecho de que gran parte del conocimiento de los mecanismos que operan en las vías respiratorias de los animales domésticos se ha derivado de estudios hechos por los investigadores en hospitales de medicina humana (155); y sólo una minúscula parte ha sido aportada por médicos veterinarios (167,119).

Las hipótesis a probar en esta investigación son:

$H_1$  = Hay migración de neutrófilos a los espacios aéreos después de la inoculación con bacterias en aerosol.

$H_2$  = Existe correlación entre la remoción bacteriana y la respuesta inflamatoria del pulmón.

Los objetivos principales de esta investigación son:

1. Establecer un modelo confiable para exponer ratones a aerosoles bacterianos.
2. Determinar las curvas de remoción de Pasteurella haemolytica y Staphylococcus aureus, a diferentes intervalos de tiempo, a partir del pulmón.
3. Cuantificar la población de células fagocíticas en el pulmón de los animales expuestos a aerosoles bacterianos.
4. Investigar la posible correlación entre los valores de remoción bacteriana y los números de células fagocíticas.

Los resultados de esta investigación son aplicables no sólo para mejorar el conocimiento de la patogénesis de las neumonías en los animales domésticos, sino también en medicina humana comparada, donde se buscan modelos animales que puedan ser utilizados en el estudio de las neumonías en el hombre.

## II. REVISION DE LA LITERATURA

### 1. Introducción

Una de las funciones más importantes del pulmón, aparte de su papel en el intercambio gaseoso y en el metabolismo, es la de proveer una barrera biológica esencial entre los animales y su medio ambiente.

Es de fundamental importancia la manera en la cual el aparato respiratorio previene la entrada, neutraliza o remueve agentes dañinos que pueden llegar por diferentes vías (135)

Las vías más comunes mediante las cuales un agente patógeno alcanza el tejido respiratorio son: la vía aerógena a través del aire inhalado y la vía hematógena a través de la sangre que llega a los pulmones.

Por lo que respecta a la vía de entrada hematógena, ésta ocurre cuando partículas infecciosas son llevadas al pulmón por la circulación sanguínea, ejemplo de estas enfermedades son las viremias, bacteremias, septicemias y embolias parasitarias. A pesar de que muchos microorganismos circulantes alcanzan el pulmón, en pocas ocasiones se logra establecer la infección, debido a que se necesita que las partículas se fijen en el tejido respiratorio. Se considera que sólo una pequeña fracción (cerca del 1%) de la carga bacterémica es retenida en el pulmón; el resto pasa al hígado, bazo y riñón para ser eliminada por el sistema monocítico-macrofágico (Sistema Retículo-Endotelial) (56).

La mayoría de las infecciones del tracto respiratorio son por vía aerógena y se originan por partículas en aerosoles que llevan consigo agentes infecciosos. Estas partículas se pueden originar fuera del organismo o dentro de él, en el tracto respiratorio superior (167).

Cuando agentes infecciosos, toxinas, polvos minerales o partículas inmunogénicas contenidas en el aire penetran a los pulmones, encuentran una gran variedad de mecanismos de defensa que previenen su contacto con tejidos vulnerables. El grado en que los mecanismos de defensa del pulmón sean alterados por materiales extraños inhalados, determina en gran parte el curso de las enfermedades respiratorias (56).

En las infecciones transmitidas por la vía respiratoria, la diseminación depende de la producción de partículas en el aire (aerosoles) conteniendo microorganismos. Aerosoles con partículas infecciosas se generan frecuentemente a través de la tos y el estornudo de animales enfermos y de portadores sanos. Esto es más patente en la inflamación de las vías respiratorias, en donde hay un incremento en las secreciones de moco, por lo que el reflejo tosígeno está aumentado (131).

Por lo que respecta al estornudo, se ha calculado que en cada uno se producen más de 20 000 gotas de diferentes tamaños y con condiciones variables de velocidad, contenido de agua y humedad relativa (131). Esto se relaciona directamente con su capacidad de transmitir infecciones. Lo anterior nos da una idea de la importancia de los aerosoles en la patogénesis de los problemas respiratorios.

## 2. Aerosoles

Un aerosol se define como un sistema de partículas coloidales líquidas o sólidas suficientemente pequeñas para tener una disminución lenta de su velocidad, y por esta razón ser capaces de permanecer estables en el aire por períodos de tiempo relativamente largos y de acarrear agentes infecciosos (121,167).

En la naturaleza existen diferentes formas de aerosoles, que

pueden ser visibles e invisibles. Cuando éstos son visibles son llamados polvos, nieblas, vapores, humos, hollín o smog (121).

Los aerosoles son creados por condensación de vapor de partículas o por una dispersión o atomización de material en partículas (167).

En 1934, Wells (176) introdujo el término de "nucleos de las gotitas" para describir partículas con un tamaño entre 0.5 y 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, originadas a partir de la evaporación de partículas suspendidas en una fase líquida de mayor tamaño. Estas permanecen en el aire por varias horas antes de que la fuerza gravitacional las lleve al suelo. Las partículas mencionadas son la fuente principal de infecciones pulmonares ya que son ideales para la máxima penetración a los pulmones (29).

El hombre a través de diferentes técnicas ha logrado producir aerosoles artificiales, que han sido ampliamente utilizados en la medicina, en la investigación biomédica y en la industria. Estos han sido clasificados en monodispersos y polidispersos. Los monodispersos son aquellos en los que la mayoría de sus partículas tienen el mismo tamaño. Esta homogeneidad en tamaño resulta difícil de conseguir en muchas sustancias, por lo que es necesario el uso de aerosoles polidispersos que, aunque son producidos más fácilmente, son de difícil caracterización (130).

Los aerosoles monodispersos se han utilizado con múltiples ventajas en el área biomédica para estudios de depósito y remoción de partículas del tracto respiratorio y para la medición lineal de los espacios aéreos con aplicación en pruebas diagnósticas para enfermedades pulmonares (138).

Los aerosoles polidispersos se han utilizado en el área biomédica para estudios de inhalación de tóxicos, y en medicina en la llamada

"inhaloterapia", lo que permite administrar una medicación específica en las partes profundas del aparato respiratorio (130, 34).

La inhalación de partículas no es nada nuevo, pero el incremento en la contaminación del aire en sociedades industrializadas y el peligro causado por los contaminantes, ha dado nueva importancia al estudio de los aerosoles. En la década pasada, hubo un gran incremento en el uso de aerosoles artificiales en muchos tipos de industrias: en cosméticos, productos domésticos, insectidas, así como para el uso terapéutico en muchas enfermedades respiratorias. En las investigaciones biomédicas se ha dado un énfasis especial al destino de partículas inhaladas, su depósito, remoción y efecto en el tracto respiratorio (121, 113, 13, 11, 79, 25). Entre las partículas estudiadas están: virus, bacterias, hongos, minerales, materiales tóxicos y partículas inmunogénicas entre otros. También se ha estudiado el efecto que sobre la eliminación de partículas tienen otros factores asociados (51, 167, 118). Los estudios mencionados han sido aplicados en animales experimentales y en el hombre, contribuyendo al conocimiento de la patogénesis de las enfermedades respiratorias.

### 3. Inhalación de partículas

En la atmósfera se encuentran suspendidas numerosas partículas originadas de diversas fuentes, sus características y concentración en el aire varía espacialmente, existiendo un incremento en número y tamaño proporcional a la cercanía de los centros de actividad humana. En los estudios sobre la contaminación del aire y sus efectos en la salud y en el medio ambiente se ha dado una atención primaria a las altas concentraciones de partículas generadas por el hombre. Sin embargo, la mayor fuente de generación de partículas suspendidas en la atmósfera se



lleva a cabo por procesos naturales sin la intervención directa del hombre; muchas de estas son potencialmente patógenas ( 35).

En el proceso de la respiración la cantidad de aire que penetra a los pulmones es sorprendente; se calcula que un humano respira diariamente un volumen de aire aproximado de 8 000 litros. Por otro lado, la superficie del tejido respiratorio es la más grande interfase del hombre con su medio ambiente. Se calcula que la superficie del aparato respiratorio que está en contacto con el aire es aproximadamente de  $63 \text{ m}^2$  (171). La extensa superficie pulmonar y el enorme volumen de aire ambiental cargado de partículas que se inhala constantemente permiten que el aparato respiratorio esté expuesto a un gran número de partículas potencialmente patógenas. En los animales domésticos también se han calculado la superficie de tejido respiratorio y los volúmenes de aire consumidos. Es claro que el aparato respiratorio de las diferentes especies animales al igual que el del hombre está expuesto a un bombardeo constante de partículas. En el cuadro 1 se muestran los datos recopilados por varios autores en diferentes animales, donde se pueden observar el volumen de aire inspirado y exhalado de los pulmones con cada ciclo respiratorio (volumen Tidal), la frecuencia respiratoria, el volumen total consumido en 24 horas, el área de superficie alveolar y el peso.

#### a) Características físicas de las partículas

Las características físicas de las partículas como son tamaño, densidad, forma, solubilidad, estructura y tensión superficial son de importancia en el destino de las partículas inhaladas en el tracto respiratorio.

El tamaño de las partículas suspendidas en el aire atmosférico

CUADRO 1 . PESOS, FRECUENCIAS, VOLUMENES RESPIRATORIOS Y AREAS DE SUPERFICIE ALVEOLAR EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES, CALCULADOS DE VARIAS FUENTES ( 140, 166, 108, 171) .

Especie	Peso corporal (Kg)	Frecuencia respiratoria (resp / min)	Volumen Tidal (ml)	Volumen en 24 h (lts)	Area de superficie alveolar total (m <sup>2</sup> )
Hombre	70	12	450	7 776	63
Caballo	696	12	7 500	129 600	ND
Vaca	514	30	3 800	164 160	316
Cerdo	100	13	286	5 354	ND
Oveja	63	19	371	10 150	ND
Cabra	40	15	310	6 696	96
Perro	10	12	203	3 508	46.5
Gato	2.9	26	29	1 086	7.3
Mono ( <u>Macaca arctoïdes</u> )	2.6	40	45	2 592	ND
Gallina	2.5	30	31	1 340	ND
Conejo	2.4	39	16	898	ND
Cobayo	0.52	90	4	518	ND
Rata	0.25	97	2 *	280	ND
Hamster	0.09	74	1 *	106	ND
Ratón	0.02	28	0.2 *	8	ND

\* Obtenido a partir de la fórmula: VT = 10 ml/Kg (peso corporal) (140)

ND= No determinado

es una de las características de mayor importancia como determinante de su distribución en el aparato respiratorio. Aunque el tamaño de las partículas inhaladas es de mucha importancia, no es el único determinante de su depósito en el tracto respiratorio. Se ha demostrado que la forma de las partículas también es importante, como en el caso de la inhalación y depósito de sílica ( 13, 46 ) y asbesto en el pulmón; por ejemplo, fibras de asbesto superiores a los 300  $\mu\text{m}$  de longitud pero menos de 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro, han sido encontradas en los alvéolos ( 22 ). Probablemente debido a la orientación de su eje longitudinal paralelo a la corriente de aire, el comportamiento de estas fibras es similar a esferas de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro ( 29 ).

El término "tamaño aerodinámico de las partículas" se refiere a la densidad, forma y dimensiones físicas de dichas partículas ( 64 ).

La solubilidad de las partículas es también de importancia, especialmente en lo que se refiere a la inhalación de agentes tóxicos ( 29, 22 ).

El efecto de los factores ambientales sobre la estabilidad de las partículas en aerosoles ha sido ampliamente estudiado. La humedad relativa, la temperatura y la composición del medio ambiente afectan la estabilidad de las partículas suspendidas en el aire. También se ha demostrado que estas características físicas influyen marcadamente en la transmisión e infectividad de partículas infecciosas ( 32 ).

**b) Efecto del tamaño de las partículas sobre su depósito en el aparato respiratorio**

El sitio donde se depositan las partículas en el aparato respiratorio depende por un lado de las propiedades físicas del material

inhalado y por el otro de la profundidad y frecuencia de la respiración en un individuo.

Hatch en 1961 hizo una extensa revisión (64), y demostró que el sitio de depósito en el tracto respiratorio depende del tamaño aerodinámico de las partículas inhaladas. Partículas mayores de  $10\ \mu\text{m}$  de diámetro suspendidas en el aire que penetra al tracto respiratorio se depositan principalmente en las fosas nasales, pero pueden llegar algunas hasta el árbol bronquial. Partículas menores de  $10\ \mu\text{m}$  pero mayores de  $5\ \mu\text{m}$  son depositadas en su mayoría en la tráquea y bronquios. Las partículas de un rango de 2 a  $0.5\ \mu\text{m}$  son las que generalmente logran penetrar hasta los alvéolos (167).

#### c) Mecanismos de depósito de partículas

Las partículas inhaladas se depositan en el aparato respiratorio mediante diferentes mecanismos denominados por varios autores como factores aerodinámicos (165), fuerzas aerodinámicas (135) o mecanismos físicos (43). Estos son principalmente el impacto, la sedimentación y el movimiento Browniano. Existen quizá otros mecanismos que pueden influir en el depósito de partículas, como lo son las cargas electrostáticas, pero no han sido bien estudiadas. La importancia de cada uno de estos mecanismos en el depósito está también relacionada con el tamaño, forma y densidad de las partículas, así como con la velocidad de flujo de aire y con las características aerodinámicas de las vías respiratorias (135).

##### i) Impacto

El impacto de partículas en el aparato respiratorio ocurre

primariamente en la nariz y en las vías respiratorias superiores. Este es el mecanismo por el cual se depositan el mayor número de partículas independientemente de su tamaño. El mecanismo de impacto se produce cuando el aire inhalado, conteniendo partículas menores de 10-15  $\mu\text{m}$  entran a la cavidad nasal con gran velocidad. La forma de los meatos y la gran velocidad del aire inhalado forman turbulencias haciendo que el aire cambie repentinamente de dirección, lo que hace que las partículas suspendidas en éste se impacten en la mucosa respiratoria por inercia (135).

Mediante el mecanismo de impacto las partículas de 10  $\mu\text{m}$  o mayores se depositan en los cornetes nasales y en la faringe. Las partículas menores de 10  $\mu\text{m}$  se pueden depositar en las bifurcaciones traqueo-bronquiales, en donde la velocidad del aire es todavía suficiente como para imprimirle a las partículas fuerza de inercia. Este mecanismo de impacto es inexistente en los alvéolos, ya que en esta zona del pulmón la velocidad del aire es casi nula (29).

#### ii) Sedimentación

Este es el principal mecanismo de depósito de partículas en el rango de tamaño de 5.0 a 0.2  $\mu\text{m}$  y ocurre como resultado de fuerzas gravitacionales. El depósito por sedimentación se presenta en las regiones del pulmón en donde el aire fluye lentamente, como en los bronquios, bronquiolos y alvéolos. En estas regiones la velocidad de flujo disminuye hasta cerca de cero, debido a que las corrientes de aire se dirigen periféricamente en el pulmón y a las bifurcaciones del árbol bronquial. A esta velocidad del aire las fuerzas gravitacionales vencen la resistencia y es cuando ocurre la sedimentación, sobre todo en la

región llamada de "bajo flujo laminar". Esta región está comprendida entre la décimo quinta y vigésimo tercera bifurcación bronquial (135, 29).

### iii) Movimiento Browniano

Partículas de  $0.1 \mu\text{m}$  o menores son depositadas principalmente como resultado del llamado movimiento Browniano. En éste, las partículas suspendidas en el aire son bombardeadas por moléculas de gas, originando un movimiento de alta velocidad pero de corta duración. Mediante este tipo de movimiento, las partículas de pequeño tamaño chocan contra la mucosa respiratoria en sus diferentes regiones (29).

Algunos investigadores (132) no consideran que el movimiento Browniano sea un mecanismo importante de depósito, dado que sólo un pequeño número de partículas son de  $0.1 \mu\text{m}$  o menores. Sin embargo, otros investigadores (165) piensan que éste es un mecanismo eficiente de depósito de partículas, sobre todo en los alvéolos, aunque reconocen que el número de partículas que tienen el tamaño necesario para que ocurra el movimiento Browniano es mínimo.

Las partículas de un tamaño entre  $0.5$  y  $0.1 \mu\text{m}$  son poco afectadas por la inercia, por las fuerzas gravitacionales y por el movimiento Browniano, por lo que sólo el 20% de tales partículas inhaladas son depositadas en el pulmón. Esta proporción no es de valor si se compara con el número de partículas depositadas de otros tamaño; sin embargo, es importante desde el punto de vista epidemiológico, tomando en cuenta el número de partículas contenidas en la masa total inhalada, así como su estabilidad, lo que las hace más aptas para su inhalación (135).

#### 4. Aerosoles de bacterias

Uno de los tipos de partículas suspendidas en la atmósfera con mayor importancia biológica, son las bacterias, las cuales están distribuidas ampliamente en el medio ambiente y son comúnmente inhaladas. Muchas de estas bacterias son potencialmente patógenas y su inhalación es un riesgo para el desarrollo de infecciones del aparato respiratorio.

La posibilidad de diseminación de una infección bacteriana aerógena, es proporcional a la duración de la bacteria en el aerosol suspendido en la atmósfera. Se ha establecido que la viabilidad de las bacterias en aerosoles disminuye rápidamente, uno de los principales factores que influyen sobre la viabilidad e infectividad de las bacterias en los aerosoles es la fase de crecimiento en la que se encuentren. Se ha demostrado que las bacterias en fase de crecimiento logarítmico son más susceptibles a las influencias ambientales, específicamente a los cambios de humedad relativa y oxígeno, que las células bacterianas en la fase lag. La distribución de las bacterias en las partículas de un aerosol está relacionada con su concentración; por lo tanto, si la concentración de microorganismos en el aerosol es baja, muchas partículas permanecerán libres de bacterias (49).

Las infecciones respiratorias son una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad, tanto en el hombre (86) como en los animales domésticos (128). En los bovinos se calcula que las infecciones respiratorias constituyen el 75% de las enfermedades de esta especie y dentro de los procesos respiratorios, las neumonías representan un 75% de los diagnósticos (142). En la especie porcina, se cuenta con datos de porcentajes de mortalidad por neumonías que van desde el 25% hasta el 34% en cerdos de finalización (164). Las neumonías constituyen la mayor

causa de muertes y pérdidas económicas en las especies animales productivas (125,126, 16, 14,164,92 ,170).

##### 5. Modelos experimentales de inoculación de bacterias por aerosoles

Los aerosoles de bacterias han sido ampliamente utilizados en investigaciones del aparato respiratorio en el área biomédica. Su uso presenta múltiples ventajas sobre otras vías de inoculación, dado que:

- Asegura una distribución homogénea de las bacterias en el aparato respiratorio.
- No es necesario el uso de anestésicos para llevar a cabo la inoculación.
- Se pueden inocular un gran número de animales simultáneamente.
- Es el método que más se aproxima a la vía natural de las infecciones del aparato respiratorio.

La utilización de los modelos de inoculación de bacterias por aerosol en diferentes tipos de investigaciones del aparato respiratorio se encuentran resumidos en el cuadro 2 .

La primera descripción sobre aparatos y técnicas de inoculación por aerosol fue hecha por Stillman en 1923 (161). El aparato utilizado consistió de una caja cuadrada de lámina galvanizada con medidas de 12 x 10 x 7 pulgadas, esta cámara constaba de 2 ventanas de vidrio laterales y una ventanilla en un extremo, donde era colocado el filtro de algodón. En el extremo opuesto, había otra abertura a través de la cual se introdujo la nariz de un nebulizador de cristal. El aerosol se producía por el paso del aire generado por una perilla de hule hacia el nebulizador de cristal, el cual contenía un inóculo bacteriano.

A partir de 1952, comenzó una nueva era en el desarrollo de modelos de inoculación por aerosol para bacterias. Esto se debió a la



**CUADRO 2. DIFERENTES TIPOS DE INVESTIGACIONES DEL APARATO RESPIRATORIO  
UTILIZANDO MODELOS EXPERIMENTALES DE INOCULACION DE  
BACTERIAS POR AEROSOLES.**

Tipo de investigación	Referencias
Distribución de bacterias en el tracto respiratorio	Lillie y Thomson, 1972 (116) Jakab y Green, 1973 (82) Nugent y Pesanti, 1982 (136) Veit <u>et al.</u> , 1978 (172)
Transmisión de enfermedades por vía aerógena	Wells y Wells, 1936 (177) Davis <u>et al.</u> , 1982 (25)
Inducción experimental de neumonías	Jericho, 1983 (97) Jericho y Langford, 1977 (94) Gilka <u>et al.</u> , 1974 (41)
Reacción inflamatoria del tracto respiratorio	Snella y Rylander, 1982 (157) Johnson <u>et al.</u> , 1975 (99) Pierce <u>et al.</u> , 1977 (141) Hudson <u>et al.</u> , 1977 (74)
Respuesta inmunológica	Walker <u>et al.</u> , 1980 (174) Sebunya <u>et al.</u> , 1983 (154) Gross <u>et al.</u> , 1978 (58)
Inmunización por vía aerógena	Friend <u>et al.</u> , 1975 (38) Jericho y Langford, 1982 (96) Gilka <u>et al.</u> , 1974 (42) Jakab, 1976 (87)
Remoción bacteriana en condiciones normales	Laurenzi <u>et al.</u> , 1964 (113) Lillie y Thomson, 1972 (116) Goldstein y Green, 1967 (45) Jackson <u>et al.</u> , 1967 (80)
Remoción bacteriana en condiciones adversas	Jakab y Green, 1974 (86) Lopez <u>et al.</u> , 1976 (117) Jakab, 1974 (85) Lopez <u>et al.</u> , 1982 (120)

introducción de un aparato para el estudio de las infecciones aerógenas desarrollado por Henderson ( 66 ). Este aparato fue el modelo básico para posteriores investigaciones, ya que partiendo de su principio se realizaron modificaciones y adaptaciones por un gran número de investigadores.

Una modificación de suma importancia al aparato de Henderson fue hecha por Laurenzi et al. en 1964 (113). El aparato de exposición a aerosoles modificado por estos investigadores consistió de una cámara cilíndrica de acrílico transparente, con un diámetro interno de 40 x 6 pulgadas. En este sistema el aire generado por una compresora pasaba por un filtro y un rotámetro para llegar a un nebulizador Devilbiss modelo 40, que contenía el inóculo bacteriano. El paso del aire a través del nebulizador produjo el aerosol, el cual penetraba a una cámara de mezclado. En ésta, se combinaba el aerosol con aire circulante, llegando ambos a la cámara de exposición. Como sistemas de seguridad, el aire que salía de la cámara pasaba por dos filtros contra bacterias y por válvulas de seguridad que activaban o inactivaban el flujo del nebulizador. Este modelo se aplicó al estudio cuantitativo del depósito y remoción de bacterias por el pulmón de ratones. El modelo modificado de Laurenzi et al. pasó a formar parte de los modelos básicos utilizados posteriormente en un gran número de investigaciones.

Otra modificación al aparato de Henderson, que a su vez constituyó el punto de partida para su utilización en otros modelos, fue hecha por Beard y Easterday en 1965 ( 5 ). Este sistema constaba de una cámara de exposición metálica intercambiable para pequeñas especies de 25 cm de diámetro por 1 m de largo y de un capuchón o casco metálico para exposición de grandes especies. Dos tanques de aire formaban la fuente de

flujo, uno de ellos servía como flujo primario para activar un nebulizador convencional. El aire del otro tanque, o flujo secundario pasaba a través de un panel, donde se filtraba y humidificaba para mezclarlo con el aerosol en la cámara de exposición o en el capuchón. De cualquiera de los sistemas de exposición y con ayuda de una bomba de vacío, se extraían muestras para llevarlas al panel donde se verificaba la temperatura y para el muestreo del tamaño y concentración de las partículas. Contaba además con aditamentos para medir el volumen respiratorio. El aire que salía de los sistemas de exposición era succionado por presión negativa y se hacía pasar por un prefiltro con 4 capas de acrílico y por dos filtros desechables de alta eficiencia. Este aparato se utilizó para exponer cobayos, pollos, guajolotes, hurones, ovejas, cabras, cerdos, ponies y caballos.

Lillie y Thomson en 1972 (116) hicieron modificaciones al modelo de Laurenzi et al., obteniendo un preciso y complejo sistema de exposición a aerosoles para diferentes especies animales. El sistema estaba integrado por una cámara rectangular construida de metal y acrílico, de un tamaño de 36 pulgadas de largo, 18 de ancho y 16 de profundidad. En el centro de uno de los lados, se encontraba una abertura provista de un dispositivo de hule para introducir la cabeza de un becerro o que permitía cerrarla cuando se alojaban ratones en el interior de la cámara. El flujo primario de aire se produjo por un compresor que lo llevaba hacia cuatro nebulizadores Devilbiss modelo 40 en el mismo número de entradas en un extremo de la cámara y que conectaban con ella en forma de cono. El aerosol de bacterias generado, se combinaba con aire en las conexiones cónicas que llegaban a una cámara común de mezclado. Una vez combinado el aire, el aerosol llegaba a la cámara de exposición,

para salir a través de un filtro por medio de un sistema de flujo secundario que producía presión negativa interior. Contaba además con un solenoide conectado al compresor para controlar la presión del aire. Este modelo fue utilizado para el estudio de la remoción pulmonar de bacterias en becerros y ratones.

Gilka en 1973 (42) modificó el sistema de Lillie y Thomson adaptándolo para estudios con cuatro bovinos simultáneamente.

Actualmente diferentes investigaciones biomédicas se han desarrollado con modelos de exposición a aerosoles que utilizan sistemas de nebulizadores ultrasónicos. Estos sistemas completamente transistorizados permiten una mayor descarga de aerosol, con más alta densidad y con partículas de tamaño más homogéneo. Uno de estos modelos ha sido utilizado por Saunders et al. en 1983 (150), en cerdos. El sistema consta de una cámara de exposición fabricada con un bastidor metálico que soporta una cámara de polietileno, con dimensiones de 107 cm de ancho por 122 cm de longitud y 107 cm de altura. Una abertura en la cámara permite la entrada de las conexiones de un nebulizador ultrasónico Devilbiss modelo 65.

## 6. Modelos experimentales de remoción bacteriana

La determinación de la remoción bacteriana del pulmón es el método utilizado con mayor frecuencia para el estudio de la respuesta del tracto respiratorio a bacterias inhaladas en condiciones normales y anormales (118). Esta es una medición in vivo, basada en la capacidad fisiológica del pulmón para eliminar o remover partículas depositadas. Por este método puede ser calculado el número de microorganismos depositados en el pulmón de animales expuestos a una concentración

conocida de bacterias durante un tiempo controlado. La remoción y retención de las bacterias también puede ser determinada en diferentes tiempos después de la exposición (118).

La capacidad del pulmón para eliminar o deshacerse de materiales extraños incluyendo bacterias, ha sido reconocida desde hace muchos años. Bloomfield en 1922 (10) concluyó que en condiciones de salud, la exposición a microorganismos sólo ocasionalmente penetraba más allá de la laringe y que esto era el resultado del efectivo sistema de filtración del aparato respiratorio superior. Según este investigador, las bacterias que llegaban al aparato respiratorio superior, si no provocaban la enfermedad eran eliminadas por la corriente ciliar, morfan in situ o eran llevadas a través de los linfáticos.

La remoción bacteriana del aparato respiratorio ha sido estudiada en diferentes especies animales, utilizando diversas bacterias.

a) Modelos de remoción bacteriana en diferentes especies animales

i) Ratones

Stillman en 1923 (161) hizo uno de los primeros reportes sobre la capacidad del pulmón para eliminar bacterias inhaladas. Demostró que cuando ratones eran expuestos a una atmósfera de aerosoles con bacterias, éstas llegaban a los pulmones y podían ser recuperadas por períodos de tiempo considerables después de la inoculación. Demostró también que el período de persistencia de la bacteria en el pulmón, así como la producción de un estado septicémico o muerte variaba con el tipo de bacteria utilizada. En el caso de neumococos, éstos desaparecieron en pocas horas y no indujeron por sí mismos la infección. Este trabajo

constituyó el primer reporte sobre la utilización de Staphylococcus aureus en los modelos de remoción bacteriana. Resultados similares fueron obtenidos por Stillman y Branch en 1924 (162). Stillman en 1938 (163) describió que los índices de remoción variaban en las diferentes cepas de neumococos.

Laurenzi et al. en 1963 (112,113) utilizaron un modelo de aerosol con Staphylococcus aureus y determinaron el porcentaje de bacterias eliminadas por los pulmones en varios intervalos de tiempo, después de ser expuestos durante 30 minutos. Encontraron que el 45% de los microorganismos inhalados fueron eliminados del pulmón del ratón en una hora; el 70% fue eliminado en dos horas, el 88% en cuatro horas y el 97% en ocho horas. Estos patrones de remoción indicaron que la eliminación de S. aureus por el pulmón de los ratones fue rápida y predecible y que la concentración del aerosol no tenía influencia detectable en el porcentaje de bacterias eliminadas del pulmón. Otros trabajos se hicieron utilizando el modelo de ratones de remoción de S. aureus en condiciones normales, sirviendo de base para el estudio posterior de efectos adversos sobre la remoción bacteriana (114, 51, 116, 87, 83). Gracias a los experimentos de remoción bacteriana se concluyó que el pulmón de muridos en condiciones normales, elimina rápidamente las células de S. aureus inhaladas sin sufrir daño alguno.

Green y Kass en 1965 (53) compararon la remoción de Staphylococcus aureus, "Staphylococcus albus" y Proteus mirabilis en el pulmón de ratón, encontrando diferencias en los patrones de remoción de estas bacterias. "S. albus" se eliminó más rápidamente, seguido por S. aureus y finalmente la eliminación más lenta correspondió a P. mirabilis. Concluyeron que varias especies de bacterias tienen diferentes grados de susceptibilidad a la fagocitosis y a la digestión intracelular.

Goldstein y Green en 1967 ( 45 ) investigaron la remoción de Pasteurella pneumotropica. Concluyeron que ratones normales, después de inhalar esta bacteria, eliminaron un 45% en dos horas; un 65% fue eliminado a las cuatro horas y un 99% se eliminó a las veinticuatro horas. Aunque la eliminación de esta bacteria es más lenta que la de S. aureus, siguen el mismo patrón de remoción. Jakab y Dick, en 1973 ( 84 ) y Jakab, 1974 ( 85 ) obtuvieron resultados similares utilizando también P. pneumotropica en ratones.

Estudios comparativos de la remoción de Pasteurella haemolytica y Staphylococcus aureus inoculadas por aerosol se llevaron a cabo por Lillie y Thomson en 1972 (116). P. haemolytica fue eliminada en un 66% a las dos horas después de inoculada, el 76% se eliminó a las cuatro horas y el 93% a las ocho horas. Para S. aureus encontraron el 57% de remoción a las dos horas, el 79% a las cuatro horas y el 93% a las ocho horas.

Se ha demostrado en condiciones normales que los pulmones de los ratones eliminan las bacterias inhaladas rápidamente, pero que existen considerables diferencias en cuanto a la velocidad en que algunas de estas son eliminadas del aparato respiratorio. Como ejemplo, Jackson et al. en 1967 ( 80 ) estudiaron la remoción pulmonar de diferentes bacterias Gram negativas en el ratón. Las cepas bacterianas utilizadas fueron: Pseudomonas spp, Herella spp, Escherichia coli, Flavobacterium spp y Proteus mirabilis. Encontraron que, con excepción de Pseudomonas spp, las demás bacterias fueron eliminadas con el mismo patrón y rapidez. La determinación cuantitativa del número de Pseudomonas en pulmón mostró un marcado incremento en la primera hora después de la inoculación. Sin embargo, la velocidad de eliminación se normalizó a las cuatro horas,

de manera similar a las otras bacterias utilizadas.

En 1976, Jay *et al.* ( 91) describieron la remoción de Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli y Staphylococcus aureus en ratones normales. Los valores de remoción a las cuatro horas después de inoculados por aerosol fueron: 73.4% para S. aureus y 92.7% para S. pneumoniae. Para E. coli la remoción fue significativamente más lenta, ya que sólo se eliminó el 21.5%. El comportamiento de remoción más errático correspondió a K. pneumoniae, ya que no fue eliminada y se multiplicó en el pulmón.

Un modelo combinado de remoción, inoculando en aerosol simultáneamente Proteus mirabilis y Staphylococcus aureus fue utilizado por Green y Green en 1968 ( 54). Demostraron que la remoción de ambas bacterias inoculadas simultáneamente se lleva a cabo con el mismo patrón y rapidez que cuando se inocula cada una por separado.

Southern *et al.* en 1971 ( 158) determinaron los patrones de remoción pulmonar en ratones normales utilizando dos cepas de diferente virulencia de Serratia marcescens. Concluyeron que esta bacteria, aunque se elimina de una manera más lenta, lo hace progresivamente, no observando diferencia significativa entre las dos cepas. Dichas cepas desaparecieron del pulmón a las 24 horas después de inoculadas. Estos resultados coinciden con los de Gross *et al.* en 1978 ( 59) quienes indican que no hay diferencia en la remoción pulmonar con dos cepas diferentes de Staphylococcus aureus, aunque una de ellas contenía la proteína A (factor antifagocítico). En contraste, Southern *et al.* en 1971 observaron diferentes patrones de remoción entre las diferentes cepas de Pseudomonas aeruginosa inoculadas por aerosol ( 159).

Un interesante estudio comparativo de la remoción de Staphylococcus



aureus administrado por aerosol a ratones fue utilizado por Nugent y Pesanti en 1982 (136). Estos investigadores encontraron que el número de bacterias disminuía más rápidamente de los lavados bronquio-alveolares que en los homogeneizados de pulmón. Estos resultados sirvieron para compararlos con la remoción, ingestión de bacterias in vivo y la actividad bactericida in vitro en condiciones normales y bajo la influencia de un agente viral.

Campbell et al. en 1983 (15) hicieron un estudio de remoción en ratones convencionales y en ratones libres de gérmenes. Se determinaron los patrones de remoción en ratones normales utilizando Pasteurella haemolytica por diferentes vías de inoculación, entre ellas la aerógena. Sus resultados indican que en ratones convencionales bajo condiciones normales las bacterias son eliminadas rápida y exponencialmente del pulmón. Lamentablemente estos investigadores no describieron los patrones de remoción bacteriana en los ratones libres de gérmenes.

## ii) Ratas

Southern et al. en 1971 (159) estudiaron la capacidad bactericida del pulmón en ratas y ratones normales expuestos a un aerosol con dos cepas diferentes de Pseudomonas aeruginosa. Las ratas eliminaron las dos cepas de dicha bacteria con el mismo patrón. Estas curvas de remoción fueron diferentes a las que se presentaron en ratones, los cuales eliminaron las cepas bacterianas en diferentes patrones.

Valores de remoción pulmonar fueron encontrados también por Johanson et al. en 1974 (98) utilizando un aerosol de Streptococcus pneumoniae. Las bacterias inhaladas fueron eliminadas de los pulmones de las ratas en un 76% por hora, en forma similar a la eliminación

descrita para ratones. Otro reporte fue hecho por Goldstein et al. en 1974 ( 47 ), sobre la remoción pulmonar de Staphylococcus aureus. En éste, el 44% de las bacterias inhaladas fueron eliminadas durante las primeras dos horas y media y el 76,9% a las cuatro horas.

### iii) Cobayos

Estudios sobre la remoción bacteriana en esta especie fueron desarrollados por Rylander en 1966 (146) y en 1968 (147). Utilizando Escherichia coli encontró un 84% de remoción a las cuatro horas de ser inoculada esta bacteria por aerosol. En otros estudios, Jakab y Green en 1973 ( 82 ) encontraron un 87% de remoción para Staphylococcus aureus y un 96% para Proteus mirabilis en cobayos normales a las cuatro horas después de ser inoculados. Estas bacterias desaparecieron virtualmente a las veinticuatro horas.

Davis et al. en 1982 ( 25 ) estudiaron la remoción de Legionella pneumophila en cobayos normales. Utilizando bacterias marcadas con radioisótopos, demostraron que el 60% de la radioactividad se eliminó del pulmón en las primeras cuatro horas después de ser inhaladas dichas bacterias. Por otro lado, hubo un crecimiento exponencial de L. pneumophila iniciándose en el momento de la inoculación por aerosol. Los mismos patrones de eliminación de la actividad radioactiva, así como el crecimiento exponencial en el pulmón en esta especie, se presentó en ratas inoculadas simultáneamente, lo que indica que gran parte de la radioactividad se eliminó por mecanismos físicos, pero que esta bacteria no fue afectada por la acción bactericida de otros componentes defensivos del pulmón.

## iv) Conejos

Cralley en 1942 ( 18 ) estudió la remoción de Serratia marcescens y determinó cuantitativamente la eliminación de esta bacteria inhalada por conejos normales. El 80% de las bacterias fueron eliminadas del pulmón una hora después de su exposición; a las tres horas se eliminó el 90% y a las doce horas no se pudieron recuperar bacterias de los pulmones.

## v) Perros

Se cuenta con muy pocos datos sobre la utilización de esta especie animal en los modelos de remoción bacteriana. El único reporte es el de Robertson y Hamburger en 1941 (145). Estos investigadores estudiaron las porciones periféricas de los pulmones de perros normales que habían sido expuestos a un aerosol con una cepa virulenta de neumococos. Encontraron que estas bacterias se recobraron del pulmón inmediatamente después de la exposición, pero que desaparecieron a las pocas horas sin evidencias histológicas de inflamación.

## vi) Cerdos

Curtis et al. en 1976 ( 19 ) estudiaron la remoción de Escherichia coli administrada en aerosoles a cerdos de diferentes edades. A las tres horas después de inoculada los lechones de 1 día de edad eliminaron el 50% de esta bacteria; en los animales de 6 días de edad se eliminó el 82% de la E. coli y finalmente en los animales de 18 y 26 días de edad fue eliminado el 95%. Se concluyó que entre más jóvenes eran los cerdos, menor capacidad tenían de eliminar de los pulmones las cepas de E. coli

no patogénicas. Otro reporte similar fue hecho por Drummond et al. en 1978 ( 28), utilizando también cepas no patogénicas de esta bacteria.

Saunders et al. en 1983 (150) determinaron la remoción de Bacillus subtilis en cerdos normales. El porcentaje de remoción de dicha bacteria inhalada fue de 54% a las dos horas, el 53% se eliminó a las cuatro horas, el 77% a las ocho horas y el 88% a las doce horas. Concluyeron que B. subtilis fue eliminado del pulmón de cerdos normales con un patrón similar a otras bacterias estudiadas en ratones y becerros.

#### vii) Bovinos

Lillie y Thomson en 1972 (116) estudiaron la remoción bacteriana pulmonar de becerros normales expuestos a un aerosol de Pasteurella haemolytica o de Staphylococcus aureus. Los valores de remoción obtenidos para P. haemolytica fueron de 75% a las dos horas, 90% a las cuatro horas y de 92% a las ocho horas después de ser inoculados. S. aureus fue eliminado en un 70% a las dos horas, en un 90% a las cuatro horas y finalmente en un 95% a las ocho horas.

La remoción de Serratia marcescens fue estudiada en becerros normales por Veit et al. en 1978 (172). Determinaron una eliminación de un 50.2% una hora después de ser inoculadas las bacterias, el 72.5% a las dos horas, el 88.6% a las cuatro horas, el 97.3% a las ocho horas y finalmente el 99.9% a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas.

Todos estos estudios demostraron la capacidad del pulmón bovino para eliminar las bacterias inhaladas.

De los datos obtenidos en las diferentes especies animales, se puede concluir que bajo condiciones normales, los animales de laboratorio

y los animales domésticos estudiados, tienen la capacidad de eliminar del pulmón numerosas especies bacterianas de una manera rápida y predecible. También se puede concluir que cada especie y cada cepa de la misma bacteria son eliminadas con patrones y velocidades de remoción diferentes.

#### 7. Remoción bacteriana en condiciones adversas

Una vez establecidos los valores de remoción bacteriana del aparato respiratorio en una especie animal y en una bacteria específica, se puede determinar el efecto de diferentes factores sobre los mecanismos de defensa. Se han descrito un gran número de factores o condiciones que afectan la remoción bacteriana del tracto respiratorio (cuadros 3 y 4 ). También se han encontrado factores que no han demostrado tener efecto sobre la remoción (cuadro 5 ). Revisiones sobre la remoción bacteriana en condiciones normales y anormales han sido realizadas por Green en 1969 (55) y Thomson y Gilka en 1974 (167). Aunque existen numerosos reportes de factores que deprimen la remoción bacteriana del pulmón, poco se sabe de los mecanismos implicados.

Uno de los factores adversos más estudiados en el modelo de remoción ha sido las infecciones virales. La importancia de las enfermedades virales como predisponentes a neumonías bacterianas ha sido bien documentada en el hombre y en los animales domésticos (88). Es ampliamente aceptado que diversos virus tienen la capacidad de deprimir la habilidad del aparato respiratorio para eliminar bacterias inhaladas de diferentes especies animales. Se ha demostrado que cada virus tiene un tiempo crítico para ejercer su efecto perjudicial y, si las bacterias son inhaladas en este tiempo específico, el resultado será una infección combinada virus-bacteria, neumonía y muerte.

CUADRO 3 . REPORTES DE FACTORES EXOGENOS QUE AFECTAN EXPERIMENTALMENTE LA REMOCION BACTERIANA DEL APARATO RESPIRATORIO DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES.<sup>1</sup>

Factor	Especie animal	Referencias
Alcohol	Ratones Cobayos	Green y Kass, 1964 ( 51 ); 1965 ( 53 ); Laurenzi y Guarnieri, 1966 (115); Rylander, 1968 (147); Laurenzi et al., 1963 (112); Green y Green, 1968 (54); Stillman, 1924 (162)
Hipoxia	Ratones	Laurenzi et al., 1963 (112); Green y Kass, 1964 ( 51 ); 1965 ( 53 ); Harris et al., 1977 ( 63 )
Ozono	Ratas	Goldstein et al., 1974 ( 47 ); 1978 ( 48 )
Carbón	Cobayos Ratones	Rylander, 1968 (147); 1969 (148); Laurenzi y Guarnieri, 1966 (115)
Carbón y SO <sub>2</sub>	Cobayos	Rylander, 1969 (148)
Rayos X	Ratones	Kim et al., 1976 (107)
Amoníaco	Cerdos	Drummond et al., 1978 ( 28 )
Frió	Cerdos Ratones	Curtis et al., 1976 ( 19 ); Green y Kass, 1965 ( 53 )
Barbitúricos	Ratones	Laurenzi y Guarnieri, 1966 (115)
Oxígeno	Ratones	Huber, 1970 ( 73 ); Shurin et al., 1971 (155)
Inhalación de humo de cigarro	Ratones Cobayos	Laurenzi et al., 1963 (112); 1966 (115); Rylander, 1969 (148)
Inóculo de gran tamaño	Ratones	Toews et al., 1978 (169)
Histamina	Becerras	Gilka et al., 1974 ( 42 )
Corticosteroides	Ratones	Green y Kass, 1964 ( 51 ); Laurenzi et al., 1963 (112)
Material capsular de Neumococos	Ratas	Ansfield et al., 1977 ( 1 )
Endotoxina (E. coli)	Becerras	Gilka et al., 1974 ( 42 )
Aceite de crotón	Becerras	Gilka et al., 1974 ( 42 )
Inhalación de éter	Ratones	DeMaria y Kapral, 1978 ( 26 )
Silicosis severa	Ratones	Goldstein et al., 1969 ( 46 )
Dióxido de nitrógeno	Ratones Hamsters	Ehrlich, 1976 ( 30 )

<sup>1</sup> Modificado y actualizado (118,167)

**CUADRO 4 . REPORTES DE FACTORES ENDOGENOS Y MISCELANEOS QUE AFECTAN  
EXPERIMENTALMENTE LA REMOCION BACTERIANA DEL APARATO  
RESPIRATORIO DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES.<sup>1</sup>**

<b>Factor</b>	<b>Especie animal</b>	<b>Referencias</b>
Falla renal y nefrectomía	Ratones	Goldstein y Green, 1965 ( 44 ); 1967 ( 45 )
Edema pulmonar	Ratones Ratas Becerras	LaForce <u>et al.</u> , 1973 ( 110 ); Gilka <u>et al.</u> , 1974 ( 42 ); Johanson <u>et al.</u> , 1974 ( 98 ); Harford y Hara, 1950 ( 61 )
Edad	Cerdos	Curtis <u>et al.</u> , 1976 ( 19 )
Sexo	Ratones	Green y Kass, 1965 ( 53 )
Inanición	Ratones	Green y Kass, 1964 ( 51 )
"Stress"	Conejos (in vitro)	Grogan, 1973 ( 57 )
Procesos supurativos	Ratones	LaForce y Huber , 1970 ( 109 )
Hipocomplementemia	Ratones	Gross <u>et al.</u> , 1978 ( 58 )
Uremia y acidosis	Ratones	Kass <u>et al.</u> , 1966 ( 105 )

<sup>1</sup> Modificado y actualizado (118,167)

CUADRO 5 . REPORTES DE FACTORES QUE HAN DEMOSTRADO NO TENER EFECTO  
ADVERSO EXPERIMENTALMENTE SOBRE LA REMOCION BACTERIANA DEL  
APARATO RESPIRATORIO DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES.<sup>1</sup>

Factores	Especies	Referencias
Proteína A ( <i>S. aureus</i> )	Ratones	Gross <u>et al.</u> ,1978 ( 59 ) Hsieh <u>et al.</u> ,1978 ( 72 )
Silicosis	Ratones	Goldstein <u>et al.</u> ,1969 ( 46 )
Cortisona	Ratones	Jackson <u>et al.</u> ,1967 ( 80 )
Neumonitis hipersensitiva	Cobayos	Jakab y Green,1973 ( 82 )
Inhalación de humo de cigarro	Cobayos	Rylander,1969 (148)
SO <sub>2</sub> (10 ppm)	Cobayos	Rylander,1969 (148)
Tetraciclinas	Ratones	Jackson <u>et al.</u> ,1967 ( 80 )
Inanición	Ratones	Jackson <u>et al.</u> ,1967 ( 80 )
Frío	Ratones	Stillman,1923 (161)
Irradiación	Ratones	Campbell,1983 ( 15 )
Imferón o citrato férico de amonio	Ratones	DeMaria y Kapra1,1978 ( 26 )
Inhalación de éter, talco, cuarzo	Ratones	Stillman,1923 (161)
Esteroides*	Ratones	Lightfoot <u>et al.</u> ,1968

\* Bacterias inoculadas intravenosamente  
1 Modificada y actualizada (118).



Originalmente se pensaba que las lesiones virales en la mucosa respiratoria formaban un "nidio" para la proliferación de bacterias ( 60 , 4, 22 ), sin embargo, estudios recientes han descartado esta idea, postulándose un defecto en los mecanismos de defensa inducidos por la infección viral ( 81 , 85 ). Apoyando esta idea están otros estudios, en los que se logró inducir infecciones mixtas virus-bacteria utilizando virus no patógenos para el aparato respiratorio ( 75 , 33 ). A la fecha todavía no se ha esclarecido el mecanismo exacto mediante el cual los virus deprimen los mecanismos de remoción bacteriana. Un resumen de los mecanismos propuestos están contenidos en el cuadro 6 ( 90 ).

#### 8. Estudio de las células del tracto respiratorio mediante el uso de lavados bronquio-alveolares

Los lavados bronquio-alveolares fueron descritos por Hunninghake et al. en 1979 ( 78 ) como "un método muy útil para estimar correctamente los procesos inflamatorios e inmunes del pulmón humano". Davis et al. en 1982 ( 24 ) definieron que los lavados bronquio-alveolares proporcionan un muestreo accesible de células y secreciones del tracto respiratorio para estudios clínicos e investigación. Los lavados bronquio-alveolares han sido muy utilizados en medicina humana y en menor grado en medicina veterinaria. Su aplicación ha sido en el diagnóstico y caracterización de procesos inflamatorios, inmunes y neoplásicos del aparato respiratorio ( 78 , 101 ). Esta técnica ha contribuido mucho al conocimiento de la patogénesis de los problemas respiratorios ( 168 ). Debido a las complicaciones que se presentan después de un lavado bronquio-alveolar en pacientes o voluntarios humanos, se han utilizado con mucha frecuencia en modelos animales experimentales de enfermedades respiratorias. Estos modelos permiten un estudio completo y progresivo de todas las fases de las afecciones respiratorias.

Existen diferentes técnicas de lavado bronquio-alveolar; en

**CUADRO 6 . ALTERACIONES INDUCIDAS POR LOS VIRUS EN LOS MECANISMOS DE DEFENSA ANTIBACTERIANOS DEL PULMON ( 90 ).**

---

1. Aumento en la susceptibilidad a la colonización bacteriana
  2. Disminución de la remoción mucociliar
  3. Disminución de los niveles de substancia tensio-activa
  4. Supresión de la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares:
    - a) Quimiotaxis
    - b) Captura de partículas
    - c) Ingestión
    - d) Fusión de fago-lisomas
    - e) Acción lítica y degradativa intracelular
  5. Disminución de los niveles de enzimas lisosómicas
-

forma general consiste en la introducción y extracción de líquido en el tracto respiratorio mediante la inserción de un tubo o catéter en la tráquea o en un bronquio, colectándose las células bronquio-alveolares exfoliadas.

a) Células bronquio-alveolares en condiciones normales

En condiciones normales en el hombre y en los animales la población de células bronquio-alveolares recuperadas por lavados consisten en: macrófagos alveolares, polimorfo y mononucleares, eritrocitos y células epiteliales. El tipo celular más estudiado, ha sido el de los macrófagos alveolares. Esto es debido a que constituyen más del 80% de la población celular, así como por su importancia en los mecanismos de defensa del aparato respiratorio. Actualmente se ha fijado la atención sobre el papel de los neutrófilos como célula fagocítica en el pulmón. Los otros tipos celulares, sólo están presentes en pequeño número y apenas recientemente se les ha dado cierta importancia en los mecanismos de inflamación en el pulmón. Una revisión de las cuentas diferenciales de células fagocíticas en varias especies animales están resumidas en el cuadro 7. Los linfocitos representan desde el 3 al 15% de las células bronquio-alveolares en humanos (78, 144, 24) y en los animales hasta el 10% (17). La población de eosinófilos en los animales domésticos constituye sólo del 1 al 24% del paquete celular recuperado (127). La mayoría de los eritrocitos que se encuentran en los lavados bronquio-alveolares se deben a causas agónicas, hemorragias intrapulmonares, fallas cardíacas o técnicas de sacrificio. Las células epiteliales son encontradas en lavados normales e indican una actividad exfoliativa y han sido poco estudiadas en procesos patológicos.

**CUADRO 7 . PORCENTAJES DE MACROFAGOS ALVEOLARES Y NEUTROFILOS EN LOS LAVADOS BRONQUIO-ALVEOLARES, ENCONTRADOS EN VARIAS ESPECIES ANIMALES BAJO CONDICIONES NORMALES (118).**

Especies	Porcentajes <sup>1</sup>		Referencias
	Macrófagos	Neutrófilos	
Hombre	93	< 1	Hunninghake,1979 ( 78 )
Hombre	80-92	< 1	Marr <u>et al.</u> ,1977 (175)
Hombre	78	ND	Reynolds <u>et al.</u> ,1975 (144)
Mono ( <u>Rhesus cynomologus</u> )	53	0.5	Kastello <u>et al.</u> ,1979 (104)
Bovino	90	ND	Fox,1973 ( 36 )
Cerdo	60	5	Harmen <u>et al.</u> ,1979 ( 62 )
Perro	60	1.1	Kaltreider <u>et al.</u> ,1975 (103)
Perro	59.9	2	Kaltreider <u>et al.</u> ,1974 (102)
Conejo	97.4	1.3	Mauderly,1977 (127)
Conejo (prenatal)	> 95	ND	Sieger,1978 (156)
Conejo	ND	<10*	Galindo y Myrvik,1970 ( 39 )
Conejo	90-98	ND	Holub y Hauser,1969 ( 71 )
Cobayo	85	5	Pennington,1977 (139)
Cobayo	55-71	0-9	Spencer <u>et al.</u> ,1974 (160)
Cobayo	70	ND	Waldman y Henney,1971 (173)
Cobayo	73	3*	Mauderly,1977 (127)
Rata	96.2	1.8*	Mauderly,1977 (127)
Rata	94	2	Boorman <u>et al.</u> ,1979 ( 12 )
Hamster	95.7	2.5	Mauderly,1977 (127)

ND = No determinado

\* = Incluyendo linfocitos

1 = Los porcentajes restantes lo forman los otros tipos celulares recuperados por lavado bronquio-alveolar

La fagocitosis representa uno de los factores de mayor importancia en los mecanismos de defensa del aparato respiratorio. El papel de los macrófagos alveolares como principal célula fagocítica del pulmón ha sido reconocida por varios investigadores. El estudio sistemático de los macrófagos alveolares en animales, comenzó en 1961 cuando Myrvik et al. (134) describieron el procedimiento para la obtención de estas células fagocíticas. Posteriormente el desarrollo de las técnicas de lavado bronquio-alveolar en humanos permitió también el estudio de los macrófagos alveolares. Estas células son los únicos fagocitos mononucleares; su localización en la interfase aire-tejido resulta en una exposición directa a partículas inhaladas (69). Se ha postulado que los macrófagos alveolares son las células defensivas primarias del pulmón contra bacterias (50, 56). Sin embargo, otros trabajos demostraron que los leucocitos polimorfonucleares estuvieron presentes en gran número después de exponer animales de laboratorio a bacterias por vía de aerosol. De acuerdo a estas investigaciones, muchas de estas células aparentemente estaban fagocitando bacterias (179, 180, 122, 141, 118). Actualmente la atención de los investigadores se ha fijado al estudio del posible papel de los neutrófilos en la fagocitosis en el aparato respiratorio.

b) Cambios en las células bronquio-alveolares como respuesta a diferentes estímulos en el aparato respiratorio

Se han realizado diversas investigaciones para determinar el efecto de varios estímulos sobre la población de células bronquio-alveolares. Kaitreider en 1974 (102) por instilación de un gran número de eritrocitos de ovino en las vías aéreas de perros, encontró

un incremento del 2 al 25% de neutrófilos en la población bronquio-alveolar; sin embargo una in-stilación de un bajo número de eritrocitos sólo mostró un leve efecto en las cuentas leucocitarias en el pulmón. En otro estudio, Kaltreider et al. en 1975 (103) inocularon intratraquealmente eritrocitos de ovino en perros. Estos investigadores demostraron un incremento en los leucocitos polimorfonucleares de 1.1 a 12% y una disminución en los macrófagos alveolares del 60 al 40% a los 4 días después de la inoculación. Observaciones similares fueron hechas por Bice et al. en 1979 (8) en perros beagles instilados también con eritrocitos ovinos. Holub y Hauser en 1969 (71) encontraron un incremento en el porcentaje de linfocitos con una disminución paralela en el porcentaje de macrófagos en conejos inmunizados por administración intratraqueal de eritrocitos ovinos, pero no encontraron cambios significativos en las cuentas de neutrófilos.

Reynolds et al. en 1975 (144) y Warr et al. en 1977 (175) no pudieron demostrar cambios significativos en la población de neutrófilos obtenida en lavados pulmonares de individuos expuestos a humo de cigarro. Los cambios estuvieron confinados a la población de macrófagos y linfocitos.

Williams en 1978 (178) no observó ningún cambio significativo en la población celular del tracto respiratorio inferior de cerdos después de la administración intranasal de t-tioglicolato estéril. Esta substancia es comúnmente usada para estimular la acumulación de macrófagos en cavidad abdominal.

Snencer et al. en 1974 (160) no encontraron cambios importantes en las células del aparato respiratorio de cobayos después de haber sido inmunizados con BCG y Mycobacterium tuberculosis muertos, por varias vías

de inoculación, incluyendo la respiratoria. En contraste, los resultados descritos por Galindo y Myrvik en 1970 ( 39), demostraron que cobayos con neumonía granulomatosa inducida por sensibilización con BCG tuvieron un incremento en el número de células bronquio-alveolares, de las cuales un 60-80% eran macrófagos alveolares, células epiteliales y gigantes; del 5 al 15% fueron linfocitos y del 5 al 10% leucocitos polimorfonucleares.

Boorman et al. en 1979 ( 12) observaron que el porcentaje de neutrófilos en lavados bronquio-alveolares de ratas se incrementó cuando los pulmones fueron expuestos a ozono, aunque con una baja significancia. Por otro lado, en estudios in vitro, Schwartz y Christman en 1979 (152) encontraron que el ozono tiene un efecto inhibitorio en la migración de los macrófagos alveolares de monos Rhesus.

El efecto de agentes anestésicos en las células recuperadas por lavados bronquio-alveolares en ratas y hamsters fue estudiado por Henderson y Lowrey en 1983 ( 67). El efecto se tradujo en un aumento del número de eritrocitos, presentándose en mayor grado con el dióxido de carbono, seguido por el pentobarbital sódico y finalmente el de menor grado fue el halotano. Estos resultados, aunados a un aumento en los niveles enzimáticos y proteínicos en los lavados indican un aumento en la permeabilidad vascular producida por los agentes anestésicos.

Hunninghake et al. en 1978 ( 77) encontraron un incremento marcado en los neutrófilos pero no en las células mononucleares en lavados bronquio-alveolares de cobayos, cuatro horas después de la inoculación intratraqueal de Staphylococcus aureus. En contraste, la inoculación intratraqueal de solución salina no provocó la misma respuesta. Un incremento del 5 al 24% de neutrófilos en lavados bronquio-alveolares de cobayos dos horas después de la inoculación

intratraqueal de Pseudomonas aeruginosa, fue descrito por Pennington en 1977 (139). Por otro lado, agentes inmunosupresores como la cortisona y la ciclofosfamida inhibieron la respuesta neutrofilica manteniendo bajo su número, pero sin influir en la actividad bactericida in vitro de dichas células. Estos datos sugirieron que en los animales inmunosuprimidos, la susceptibilidad del pulmón a las infecciones bacterianas se debe al reducido número de neutrófilos y no a defectos bactericidas intracelulares.

Se han estudiado diferencias en el comportamiento de los neutrófilos con diferentes tipos de bacterias inoculadas al tracto respiratorio de animales de laboratorio. Pierce et al. en 1977 (141), observaron que Klebsiella pneumoniae y E. coli fueron capaces de inducir una respuesta neutrofilica de las dos a las cuatro horas después de la inoculación en ratones. Esta neutrofilia no se observó en animales expuestos a Staphylococcus aureus. Estas investigaciones postularon que los polimorfonucleares fueron las principales células fagocíticas involucradas en la destrucción de bacterias por el pulmón del ratón.

Hudson et al. en 1977, inocularon endotoxina de Salmonella typhosa por aerosol en cobayos y hamsters, y estudiaron la población celular de los lavados bronquio-alveolares. Encontraron que el número de células obtenido, en su mayoría leucocitos polimorfonucleares, se incrementó marcadamente a las cuatro y seis horas después de la inoculación. Los animales testigos expuestos a aerosoles de agua no presentaron una respuesta similar. Por otro lado, en animales inoculados simultáneamente, se determinó en tejidos pulmonares fijados un incremento en el índice entre polimorfonucleares sobre células epiteliales, posterior a la exposición de la endotoxina (74).

Helander et al. en 1980 (65) determinaron el efecto de



diferentes polisacáridos sobre la población de células bronquio-alveolares de cobayos. Los polisacáridos de Pseudomonas putida, Enterobacter agglomerans y Klebsiella oxytoca causaron un marcado incremento en el número de las células bronquio-alveolares a las veinticuatro horas después de ser inoculados por aerosol. Este incremento se presentó en los macrófagos, neutrófilos, linfocitos y en menor grado en los eosinófilos. Por otro lado, el lipopolisacárido de Agrobacterium spp y Xanthomonas sinensis no provocaron aumento de células. Se concluyó que el flujo de células a los espacios aéreos está relacionado con las características de los lipopolisacáridos bacterianos, principalmente al contenido de heptosa y lípido A.

Otro estudio del efecto de los lipopolisacáridos en la población de células bronquio-alveolares fue realizado por Snella y Rylander en 1982 (157). Lipopolisacáridos de E. coli o de K. oxytoca fueron inoculados en cobayos y hamsters por aerosol. Se determinó que una sola exposición a los lipopolisacáridos de E. coli provocó un aumento en el número de la mayoría de las células bronquio-alveolares recuperadas por lavados, presentándose este efecto desde las cuatro horas hasta las setenta y dos horas. Cuando la exposición fue repetida cada 24 horas, se presentó un descenso marcado sólo en el número de neutrófilos sin afectarse la población de las demás células. En animales descomplementados sometidos al mismo tratamiento no hubo variación en el aumento de las diferentes células. Los animales expuestos a zymosan por aerosol no tuvieron cambios en la población celular. Estos resultados sugieren que otros factores y no la activación de complemento sérico inician el incremento de neutrófilos después de inhalar lipopolisacáridos y que quizá el mecanismo inicial sea la activación de macrófagos alveolares.

El efecto viral sobre la población de leucocitos recuperados de lavados bronquio-alveolares en ratones fue estudiado por Nugent y Pesanti en 1982 (136). Estos investigadores demostraron un incremento en el número de leucocitos en los ratones infectados con virus desde el tercero hasta el undécimo día. Por otro lado, la actividad fagocítica de los macrófagos no se vio alterada.

Onofrio et al. en 1983 (137), estudiaron la respuesta de las células fagocíticas recuperadas por lavado bronquio-alveolar en ratones inoculados intratraquealmente con S. aureus. Encontraron que el número de polimorfonucleares aumentó proporcionalmente al volumen de bacterias inoculadas. Aunque no se presentó un aumento en el número de macrófagos, las bacterias fueron eliminadas del pulmón progresivamente, por lo que se sugiere que la interacción granulocitos-macrófagos alveolares juega un papel importante en el proceso de fagocitosis.

La participación de los leucocitos polimorfonucleares en la fagocitosis de material inhalado, fue demostrada por los estudios de Kaltreider et al. en 1975 (103), quienes establecieron que los macrófagos alveolares no son las únicas células de defensa en las vías aéreas.

#### 9. Cambios macroscópicos y microscópicos en la respuesta inflamatoria del aparato respiratorio

La respuesta del tejido respiratorio a diferentes agentes o estímulos ha sido estudiada por diversos investigadores. Básicamente se encuentran en la literatura reportes del efecto en la afluencia de células a espacios aéreos y descripciones de lesiones macroscópicas y microscópicas producidas por diferentes agentes.

El efecto de varios factores quimiotácticos fue estudiado por Desai et al. en 1979 (27). Por inoculación intratraqueal en hamsters

demonstraron que sustancias como solución salina, IgG, albúmina sérica y factor  $C_4$ , fallaron en inducir una respuesta inflamatoria en el pulmón. En cambio el factor  $C_5$  provocó marcada congestión, hemorragias focales y pleurales y edema pulmonar; los cambios microscópicos se iniciaron desde los 5 minutos posteriores a la inoculación, presentándose edema perivascular y marginación intravascular de neutrófilos, progresando ésta a una difusa y confluyente acumulación de dichas células en el alvéolo con persistente edema perivascular. Los cambios macroscópicos y microscópicos fueron proporcionales a la dosis de factor quimiotáctico y al tiempo de postinoculación.

Damiano et al. en 1980 (20) realizaron un estudio morfológico de la afluencia de neutrófilos a espacios aéreos en perros estimulados por el lavado de pulmones con solución salina estéril. El uso de microscopía electrónica de barrido y transmisión permitió establecer la ruta de migración de los neutrófilos a partir de los capilares hacia los espacios intersticiales, pasando entre las uniones de los neumocitos I y II. Estos autores citan que un mecanismo de migración similar fue propuesto en los monocitos, ya que atraviesan entre las uniones del neumocito tipo I. Davis et al. en 1978 (23), describieron la migración de macrófagos y linfocitos a través de la discontinuidad de la membrana basal del neumocito tipo II, hacia los espacios aéreos. Otro estudio sobre el sitio de migración de neutrófilos fue realizado por Hulbert et al. en 1981 (76); en éste, se expusieron cobayos a la inhalación de humo de cigarro, estudiando después la afluencia de neutrófilos a la mucosa traqueal por medio de microscopía de luz y electrónica. Demostraron que dichas células inflamatorias en su ruta hacia la superficie mucosa lo hicieron a partir de los capilares, atravesando el epitelio ordenados en fila y a través de

aberturas solitarias y no entre células epiteliales al azar. Concluyeron que esta forma de migración de los neutrófilos proporciona una vía rápida de acceso de la circulación a los espacios aéreos donde pueden funcionar como primera línea de defensa contra material inhalado. Que el movimiento a través de sitios específicos y no al azar entre células epiteliales reduce al mínimo el número de aberturas para el tránsito celular y así se controla mejor el movimiento de fluidos y por último que esto minimiza el contacto entre células migratorias y las terminaciones nerviosas sensitivas.

Cohen y Batra en 1980 ( 17 ) estudiaron el efecto de la broncoscopia y del lavado pulmonar en la población de células bronquio-alveolares de perros y monos. Estos estudios demostraron que el lavado pulmonar produce una afluencia de neutrófilos tanto al lóbulo donde se llevó a cabo el lavado como en el lóbulo del lado opuesto. La afluencia de neutrófilos a los pulmones ocurrió también después de realizar en los animales broncoscopia sin lavado pulmonar; esto no se presentó cuando se realizó únicamente la anestesia de los animales testigos. Estos estudios sugieren que los pulmones tienen un mecanismo que regula y controla la afluencia de neutrófilos local y contralateralmente.

Otras investigaciones llevadas a cabo por Cohen y Batra en 1980 ( 17 ) demostraron un incremento en el número de leucocitos en sangre con aumento en las formas jóvenes circulantes después de broncoscopia o lavados pulmonares. Un incremento en el número de leucocitos sanguíneos se produjo cuando se instiló en los pulmones un concentrado de lavados pulmonares. Estos datos indican que los pulmones contienen un material que puede estimular a la médula ósea para liberar leucocitos de sus reservas.

Los cambios histológicos en el aparato respiratorio en ratones inoculados intratraquealmente con solución salina y S. aureus fueron estudiados por Onofrio et al. en 1963 (137). En secciones de pulmones obtenidos 4 horas después de la inoculación con solución salina solamente se presentó la mucosa denudada con infiltración celular en el intersticio peribronquiolar; en los bronquios y alvéolos no se encontró una respuesta celular significativa. En los casos de animales inoculados con S. aureus, se encontró un gran número de neutrófilos y glóbulos rojos en los alvéolos, sin denudación del epitelio bronquiolar.

Un interesante estudio utilizando aerosoles de agua, de S. aureus, de Klebsiella pneumoniae y E. coli en ratones fue desarrollado por Pierce et al. en 1977 (141). Determinaron que los animales que recibieron aerosol de agua únicamente, tuvieron una significativamente más polimorfonucleares neutrófilos en el alvéolo que los animales no inoculados, sugiriendo que la sola exposición a aerosoles de agua provocó una inflamación ligera. S. aureus no provocó una respuesta marcada de afluencia de polimorfonucleares neutrófilos a las 4 horas, sin embargo, la apariencia bronquial fue diferente a la de los animales expuestos al aerosol de agua. En contraste, las bacterias Gram negativas provocaron una respuesta marcada de polimorfonucleares inmediatamente después de terminada la inoculación. Esta respuesta es similar histológicamente a bronconeumonía o bronquitis purulenta en algunas áreas del pulmón.

Hudson et al. en 1977 (74) inocularon endotoxina de Salmonella typhosa por aerosol en cobayos y hamsters. Se observó un incremento progresivo en el índice de polimorfonucleares neutrófilos y células epiteliales con diferentes patrones de acuerdo a la especie animal utilizada. Determinaron también la ruta de migración de los polimorfo-

nucleares a partir de los capilares; éstos migraban a través de la lámina propia y el epitelio para llegar a la luz de los bronquios y bronquiolos pero no a los alvéolos.

Berendt en 1978 ( 7 ) estudió el efecto del volumen del inóculo de Klebsiella pneumoniae sobre el aparato respiratorio de ratones y monos ardilla. Esta bacteria resultó menos virulenta en ambas especies animales cuando se administró por aerosol que cuando se instiló intranasalmente en ratones o intratraquealmente en monos. Se demostró también que K. pneumoniae administrada intratraquealmente a monos, incrementó su virulencia proporcionalmente al aumento en volumen de inóculo, aun conservando una concentración bacteriana baja. Se concluyó que el efecto producido al incrementar el volumen de material instilado en monos se debió probablemente a la elevada resistencia a los mecanismos de defensa o a la amplia dispersión de las bacterias en los pulmones.

Davis et al. en 1982 ( 25 ) estudiaron la respuesta inflamatoria del pulmón de cobayos y ratas inoculadas con aerosoles de Legionella pneumophila. Esta bacteria no fue eliminada después de su inhalación presentándose un crecimiento intrapulmonar y neumonía. Se trató de una neumonía multicéntrica (nodular), con zonas hemorrágicas que crecieron y se consolidaron progresivamente. Se encontraron en los espacios aéreos células inflamatorias mononucleares y polimorfonucleares además de detritus celulares. Bacterias intactas fueron identificadas dentro de los macrófagos alveolares y leucocitos polimorfonucleares. Se concluyó que los mecanismos de defensa del pulmón son ineficaces contra L. pneumophila y que defensas inespecíficas pueden ser de suma importancia para determinar el resultado de la infección.

La respuesta inflamatoria del pulmón producida por Pasteurella

haemolytica ha sido estudiada en diferentes especies animales y bajo diversas condiciones experimentales ( 37, 117, 41, 97 ). Principalmente se han realizado estudios en bovinos, dado que en éstos es el agente causal de una severa neumonía fibrinosa, caracterizada por necrosis coagulativa, atelectasia, acúmulos de fibrina, distensión y trombosis linfática, hiperplasia linfoide y un marcado acúmulo de neutrófilos en bronquiolos y alvéolos. Además se encuentran macrófagos y células "en remolino" (swirling cells) alrededor de las zonas necróticas, y a veces células gigantes. Esta bacteria es frecuentemente aislada de la mucosa nasal de los animales aparentemente normales, además de que se ha demostrado su participación en la producción de neumonías, asociada a "stress", deshidratación, transporte e infecciones virales.

P. haemolytica es patógena para la mayoría de los rumiantes, sin embargo presenta poca o nula patogenicidad en roedores normales. A la fecha no se ha logrado establecer un modelo confiable en animales de laboratorio de pasteurelisis neumónica.

La patogenicidad de P. haemolytica en ratones ha sido recientemente estudiada por Campbell et al. en 1983 ( 15 ). Como resultado de estos estudios, se concluyó que la ausencia de virulencia de esta bacteria en ratones estuvo relacionada con la habilidad de los fagocitos tisulares normales para inactivarla rápidamente al ser inoculada por diferentes vías, incluyendo la aerógena.

### III. MATERIAL Y METODOS

#### 1. Estudio piloto

Debido a que este tipo de experimentación no se había llevado a cabo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), se decidió hacer una serie de estudios piloto para probar las técnicas de cultivo, inoculación, anestesia y sacrificio. Originalmente se utilizaron ratas Wistar y Long Evans provenientes del Bioterio de la F.M.V.Z., UNAM (Granja Veracruz), sin embargo por la alta prevalencia de neumonía crónica murina se decidió cambiarlas por ratones. Los ratones utilizados fueron de raza Albina Suiza cepa CFM del mismo bioterio. Debido a que los ratones se encontraron sanos y sin evidencia de problemas respiratorios se decidió utilizar esta especie como animal de experimentación.

Se probaron diferentes vías de inoculación para seleccionar la más confiable. La técnica intratraqueal y la intranasal fueron poco confiables ya que un gran porcentaje de los animales (60%) no sobrevivieron a la inoculación. Es interesante hacer notar que muchos de los ratones murieron aún cuando se les administraban los mismos volúmenes de inóculo utilizados por otros investigadores (153). Otro de los problemas asociados a este tipo de inoculación es la necesidad de anestesiarse a los animales. La técnica de exposición a un aerosol en cámara mostró ser muy confiable. Se seleccionó este método porque:

1. Asegura una distribución homogénea de las bacterias en el aparato respiratorio (116, 82).
2. No es necesario el uso de anestésicos para la inoculación.
3. Se pueden inocular un gran número de animales simultáneamente.
4. Es el método que más se aproxima a la vía de entrada



natural de las infecciones del sistema respiratorio.

En el estudio piloto también se probaron las técnicas de preparación del inóculo siguiendo las recomendaciones de trabajos ya publicados (116,117). No se encontró ningún problema utilizando las técnicas descritas. Para la exposición al aerosol y la determinación del número de bacterias en los pulmones se siguió la metodología descrita en la literatura (113,116,119,120). Por lo que se refiere a los lavados bronquio-alveolares hubo necesidad de modificar ligeramente las técnicas descritas por otros investigadores (127,129). Para la técnica de perfusión pulmonar se determinó el volumen óptimo de formalina para conseguir una perfusión adecuada y el mínimo daño al pulmón. Los animales fueron sacrificados por desnucamiento para la determinación de la remoción bacteriana. Se utilizó al pentobarbital sódico por vía intraperitoneal para el sacrificio de los animales en las técnicas de lavado bronquio-alveolar y perfusión pulmonar, seguido por el desangrado por sección de la arteria renal izquierda.

## 2. Animales experimentales

Se utilizaron ratones Albinos cepa CFM con un peso promedio de 25 g, obtenidos de la Granja Avícola Experimental y Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM). Los ratones se separaron por sexos y se alojaron en un local, a una temperatura promedio de 22.2°C, con un mínimo de 16°C y un máximo de 28°C. Se les proporcionó alimento sin antibióticos ad libitum producido en la misma granja. Todos los animales se sometieron a un periodo de observación y adaptación de cinco días antes de cada experimento.

Los animales se dividieron en grupos para ser expuestos a los

aerosoles. Un grupo se inoculó con Pasteurella haemolytica, otro con Staphylococcus aureus y el grupo testigo fue inoculado con solución amortiguadora de fosfatos. En estos grupos se determinó la remoción bacteriana del pulmón, la población celular por lavados bronquico-alveolares y las lesiones macroscópicas y microscópicas del pulmón. En cada grupo se realizaron 3 réplicas experimentales en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación, excepto en los testigos en los cuales solo se hizo una réplica experimental.

### 3. Preparación del inóculo

Cultivos biofilizados de Pasteurella haemolytica (serotipo 2, Biotipo A, H 29)\* y Staphylococcus aureus (ATCC 29223)\*\* fueron restituidos en caldo infusión cerebro y corazón<sup>1</sup> (CICC) y sembrados en cajas de Petri con gelosa sangre<sup>2</sup> e incubados a 37°C por 24 horas. Se tomaron seis colonias de dichas cajas con una asa bacteriológica y se inocularon por duplicado en matraces de vidrio con capacidad de 50 ml conteniendo 25 ml de CICC, asegurando así un adecuado aporte de oxígeno. Se incubaron con agitación en un baño María<sup>3</sup> a 37°C y 70 oscilaciones por minuto por 12 horas. De este cultivo se transfirieron 20 ml a matraces de vidrio con capacidad de 250 ml conteniendo 200 ml de CICC, que se reincubaron en el mismo baño a igual temperatura por 2 horas. Posteriormente los cultivos fueron centrifugados<sup>4</sup> en botellas de plástico de 500 ml a 10 000 rpm (17 700 x g) por 10 minutos a 10°C.

---

\* Obtenida originalmente por E.L. Biberstein (Davis, California)

\*\* Obtenido del Departamento de Bacteriología, F.M.V.Z., UNAM

1 Difco Lab., Detroit, Michigan, U.S.A.

2 Merck, D.R.F. Alemania

3 Forma Scientific, M. Ohio, U.S.A.

4 Centrifuga refrigerada J2-21 Beckman Inst. Inc. Fullerton, CA., U.S.A.

El sobrenadante fue eliminado y el sedimento se resuspendió en 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.2); una vez homogeneizado se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, para lavar las células bacterianas del caldo utilizado. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 7 ml de solución amortiguadora. Todo esto se realizó por duplicado para prevenir pérdidas accidentales del inóculo.

Para determinar la concentración requerida de bacterias, se realizaron estudios preliminares de espectrofotometría. El cultivo resuspendido en solución amortiguadora fue ajustado a una absorbancia de 1.3 en un espectrofotómetro<sup>1</sup> a 620 nm de longitud de onda. Se tomó 1 ml del inóculo ajustado para confirmar el número de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) antes de inocular a los animales. Este estudio cuantitativo consistió en realizar diluciones seriadas a partir de dicho cultivo ajustado, hasta  $10^{-10}$  sembrando tres gotas de 25 microlitros de cada dilución de P. haemolytica en placas de gelosa sangre<sup>2</sup> y de S. aureus en agar tripticosa soya (ATS)<sup>2</sup>. Las placas se dividieron en tres secciones para contener las gotas de tres diluciones diferentes, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se realizaron cuentas de las UFC en las diluciones en donde eran contables. El número de UFC/ml de cultivo de los microorganismos se presenta en el cuadro 8 .

El cálculo de la concentración del inóculo de P. haemolytica y S. aureus fue realizado por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de bacterias por ml de inóculo} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución}}{0,075}$$

---

1 Bausch & Lomb, Rochester, N.Y., U.S.A.

2 Merck, D.R.F. Alemania

Donde.-

- Nº de bacterias por ml de inóculo = Nº de P. haemolytica o S. aureus contenidas en 1 ml de inóculo
- Nº de colonias = Número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en las tres gotas, a una dilución contable
- factor de dilución = Factor de dilución al que se realizó la siembra y la cuenta de UFC
- 0.075 = Volumen de mililitros sembrados en las placas de GS o ATS (3 gotas de 0.025 ml = 0.075 ml)

CUADRO 8 . NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE P. HAEMOLYTICA Y S. AUREUS POR MILILITRO DE INOCULO UTILIZADO EN LOS AEROSÓLES A LOS QUE SE EXPUSIERON LOS RATONES.

Réplica experimental	<u>P. haemolytica*</u> UFC/ml	<u>S. aureus*</u> UFC/ml
R <sub>1</sub>	6.4 x 10 <sup>9</sup>	7.5 x 10 <sup>8</sup>
R <sub>2</sub>	3.7 x 10 <sup>9</sup>	4.8 x 10 <sup>8</sup>
R <sub>3</sub>	3.8 x 10 <sup>9</sup>	1.0 x 10 <sup>9</sup>

\* Volumen aproximado de inóculo = 8 ml  
tiempo de exposición al aerosol = 10 minutos

#### 4. Cámara de exposición al aerosol

a) La técnica de inoculación por exposición al aerosol se adaptó con modificaciones al diseño de Laurenzi et al., 1964 (113).

El sistema de aerosol (apéndice 1) consistió de una cámara rectangular de acrílico (47 cm de largo, 34.5 cm de ancho y 21.5 cm de altura) con cuatro perforaciones laterales y una en la cara superior. Los nebulizadores<sup>1</sup> fueron conectados en tres de las perforaciones

<sup>1</sup> Mod. 645 Devilbiss Co, Somerset, P.A., U.S.A.

laterales. La perforación superior de forma circular (21 cm de diámetro) era removible y por ella se introdujeron las jaulas con los ratones; esta abertura contó con un empaque de hule y tornillos, los cuales se aseguraron herméticamente antes de iniciar la inoculación por aerosol. Por último, la cuarta perforación fue conectada a un filtro tubular de plástico conteniendo algodón en su interior; este filtro se conectó a una manguera para extracción de aire.

La corriente de aire fue generada mediante una compresora<sup>1</sup>, conectada a dos filtros<sup>2</sup> y a un regulador<sup>3</sup>, el cual se ajustó a 10 libras de presión por pulgada cuadrada. El regulador se conectó por medio de una manguera a un tubo múltiple de donde salen tres mangueras de hule, cada una de ellas fue conectada a un nebulizador. El aire se extrajo de la cámara mediante una bomba de vacío<sup>4</sup> conectada a la cámara por el filtro tubular de algodón. Todo el aire succionado por esta bomba pasó al fondo de un recipiente conteniendo fenol al 5%. Tanto la cámara de aerosol como la bomba de vacío y el aire extraído se mantuvieron dentro de una campana de flujo negativo (apéndice 2).

El paso de aire a través de los nebulizadores, permitió la generación del aerosol con partículas de tamaño calculado en un rango de 1 a 1.5 micras. Los nebulizadores contaron con un compartimiento para depositar el inóculo.

b) Exposición de ratones al aerosol.- Grupos de sesenta ratones distribuidos en ocho jaulas permanecieron con flujo de aire por dos minutos antes de iniciar la exposición al aerosol. Una vez verificada

---

1 Kellogg Mexicana, México

2 Perkin Elmer Co. N., Connecticut, U.S.A.

3 Fisher Controls Co. M., Iowa, U.S.A.

4 Fab. de Equipos para Lab. e Ind. S.A., Guad., México

la existencia de presión negativa (presión de entrada < presión de salida) se introdujo el inóculo a los nebulizadores mediante un catéter de plástico<sup>1</sup> conectado a una jeringa. Al terminar la inoculación por aerosol (10 minutos), se cerró el aporte de aire a los nebulizadores, se abrió la cámara y se sacaron las jaulas con los ratones. Para desinfectar el equipo se introdujeron las jaulas vacías a la cámara y se expusieron al aerosol por cinco minutos añadiendo 500 ml de formalina al 10%. Posteriormente se desconectaron los nebulizadores y se sellaron las salidas. Los nebulizadores se desinfectaron nuevamente sumergiéndolos en una solución de fenol al 5%. La cámara fue lavada con cepillo y detergente y expuesta a los rayos solares por dos o tres horas antes de cada inoculación por aerosol.

5. Depósito de Pasteurella haemolytica y Staphylococcus aureus en el pulmón

Inmediatamente terminada la exposición al aerosol, ya sea de P. haemolytica o de S. aureus, las jaulas con los ratones se sacaron de la cámara y se distribuyeron al azar en jaulas marcadas con la hora de sacrificio.

Los ratones utilizados en los experimentos para determinar la remoción bacteriana, se sacrificaron por desnucamiento con pinzas y se pesaron en una balanza analítica digital<sup>2</sup>. La piel del cuerpo de los ratones se desinfectó sumergiendo todo el ratón con excepción de la cabeza en una solución de cloruro de benzalconio<sup>3</sup> por varios segundos. Para extraer los pulmones, los ratones se sujetaron en una plataforma de madera con una tabla de parafina en decúbito dorsal con las extremidades

1 Deseret Medical Inc., B & D, Utah, U.S.A.

2 Ohaus Scale Corporation, N.Y., U.S.A.

3 Equipos Médicos Quirúrgicos, México

bien separadas por pinzas. La piel de la región torácica se cortó y removió con tijeras. La cavidad torácica se abrió cortando las costillas en la región costovertebral con tijeras. Una vez expuestos los pulmones, éstos se removieron asépticamente por tracción de la tráquea y se depositaron en cajas de Petri estériles. Los pulmones fueron separados de los bronquios extrapulmonares con bisturí. Todos los pulmones se pesaron y los datos fueron registrados. El proceso de disección se realizó en su totalidad en la proximidad de mecheros de gas y flameando con alcohol el instrumental en cada uno de los pasos.

Los pulmones se colocaron en tubos maceradores de vidrio<sup>1</sup> (19 x 150 mm y 16 x 150 mm) y se les añadieron 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.2) homogeneizándolos con ayuda de un rotor de velocidad variable<sup>2</sup>. El homogenizado de pulmón ( $10^{-0}$ ) se diluyó en serie hasta la dilución  $10^{-3}$  y mediante una pipeta<sup>3</sup> se sembraron tres gotas de 0.025 ml de cada dilución en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo; para P. haemolytica se utilizó gelosa sangre y para S. aureus agar tripticosa soya. Se dividieron las cajas en tres espacios, y se sembraron tres gotas de cada dilución, o sea, 0.075 ml por dilución. Las cajas de Petri se incubaron a 37°C durante 24 horas para posteriormente hacer la lectura del número de UFC por gota sembrada.

La determinación cuantitativa del número de P. haemolytica y S. aureus por gramo de pulmón en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de bacterias por gramo de pulmón} = \frac{\text{Número de colonias} \times 5.0 \times \text{factor dilución}}{0.075} \div \frac{\text{peso pulmón}}{1000}$$

---

1 Pyrex, Corning Glass Works, N.Y., U.S.A.  
 2 Caframo, Ontario, Canadá  
 3 Transpette-Brand, W.G., Germany

Donde.-

Nº de bacterias por gramo de pulmón	=	Nº de <u>P. haemolytica</u> o <u>S. aureus</u> depositadas por gramo de pulmón en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación
Nº de colonias	=	Nº de UFC presentes en las 3 gotas, a una dilución contable
5.0	=	Nº de mililitros de solución amortiguadora de fosfatos adicionados al tubo donde se maceraron los pulmones
factor de dilución	=	Factor de dilución al que se realizó la siembra y la cuenta de UFC
0.075	=	Volumen de mililitros sembrados en las cajas de Petri (3 gotas de 0.025 ml = 0.075 ml)
peso del pulmón	=	Peso del pulmón obtenido después de separar los bronquios extrapulmonares
1 000	=	Factor de ajuste para el cálculo por gramo (1 000 mg) de pulmón

#### 6. Determinación de la retención y remoción pulmonar de Pasteurella haemolytica y Staphylococcus aureus

a) Después de determinar el número de P. haemolytica o S. aureus por gramo de pulmón en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación, se procedió a determinar el porcentaje de bacterias retenidas por el pulmón a diferentes intervalos de tiempo, por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de retención} = \left( \frac{\text{Índice } 0 \text{ de bacterias recuperadas en los diferentes intervalos postinoculación}}{\text{Nº de bacterias depositadas a las cero horas}} \right) \times 100$$

b) La determinación del porcentaje de remoción de P. haemolytica y S. aureus por el pulmón, está basado en la cantidad de bacterias eliminadas del pulmón. El depósito a las cero horas fue tomado como el 100% de retención, por lo que si a éste se resta el porcentaje de



retención en los diferentes intervalos postinoculación se obtiene el porcentaje de remoción, como lo demuestra la siguiente fórmula:

$$\text{Indice o \% de remoción} = (100\% - \% \text{ de retención en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación})$$

## 7. Lavado bronquio-alveolar

### a) Colección y preparación de muestras para la cuenta de células bronquio-alveolares

Una vez concluida la inoculación por aerosol de P. haemolytica o S. aureus, los ratones se distribuyeron al azar en jaulas marcadas con la hora respectiva de sacrificio. Los animales del grupo de las cero horas se sacrificaron inmediatamente terminada la inoculación.

Los ratones utilizados para el lavado bronquio-alveolar se sacrificaron con Pentobarbital Sódico<sup>1</sup> (0.063 mg/ml) a una dosis de 0.125 ml (7.87 mg/g. peso) por vía intraperitoneal, obteniéndose la muerte en un tiempo aproximado de 3 a 5 minutos. Todos los ratones fueron pesados en una balanza analítica digital<sup>2</sup> y sus datos fueron registrados. Una vez anestesiados, los ratones se sujetaron en decúbito dorsal en una plataforma de madera con una tabla de parafina. Para facilitar la disección, los cuatro miembros de los ratones se distendieron y fijaron mediante el uso de pinzas de cangrejo con retractores elásticos. En la piel y músculos de la región abdominal izquierda se hizo una incisión con tijeras de aproximadamente 2 cm para exponer la cavidad abdominal y así poder seccionar la arteria renal izquierda, para producir un buen desangrado. Este procedimiento se hizo con el fin de disminuir el número

1 Anestesia, Lab. Norden de México

2 Ohaus Scale Corporation, N.Y., U.S.A.

de eritrocitos en el lavado bronquio-alveolar. La incisión abdominal se continuó hasta la región torácica y cervical, separando la piel y sujetándola a la parafina por medio de alfileres. Los bordes costovertebrales fueron cortados con tijeras, quedando abierta la región torácica, asegurándose así un espacio libre que permitiera al pulmón distenderse durante el lavado.

Una vez expuesta la tráquea, se hizo una incisión transversal en los primeros anillos traqueales. A través de la incisión se pasó un catéter de plástico<sup>1</sup> (número 18) conectado a una jeringa desechable de tuberculina<sup>2</sup>. Se inyectó lentamente 1 ml de solución salina fisiológica<sup>3</sup> (SSF), dándose posteriormente un ligero masaje al pulmón para facilitar el desprendimiento de las células bronquio-alveolares. Al momento de inyectarse SSF, el catéter se encontraba insertado dentro de la tráquea con una profundidad aproximada de 1.2 cm. La aspiración del volumen inyectado se hacía lentamente después de retirar el catéter aproximadamente 5 mm. Los pulmones fueron lavados en tres ocasiones consecutivas, por lo que el volumen total inyectado fue de 3 ml por ratón. El lavado obtenido en las tres jeringas se depositó en tubos de plástico de 5 ml conteniendo EDTA<sup>4</sup> y se homogeneizó con la ayuda de un agitador de tubos<sup>5</sup> durante 3 minutos. La suspensión celular se mantuvo en refrigeración (4°C - 5°C) mientras se colectaba la muestra del siguiente ratón. Las muestras fueron centrifugadas<sup>6</sup> a 2 000 rpm (500 g) durante 20 minutos a una temperatura de 5°C. El sobrenadante fue decantado y el sedimento restituido en 1 ml

---

1 Estercat, Plásticos Precisión Med. S.A., México

2 Plastipak, B & D de México

3 McGaw, AHS/México

4 Sigma de México, S.A.

5 Aliquot Mixer, Ames Lab. Tek., Inc. W. Illinois, U.S.A.

6 Centrifuga refrigerada J2-21 Beckman Inst. Inc. Fullerton, CA., U.S.A.

de SSF y posteriormente homogeneizado. Utilizando un tubo capilar<sup>1</sup> se tomaron 0.050 ml para la cuenta de células nucleadas en cámara. El resto de la suspensión celular fue centrifugada nuevamente en las mismas condiciones, decantándose el sobrenadante. Del paquete celular sedimentado se tomó la muestra con un capilar<sup>2</sup> para el estudio diferencial de células bronquio-alveolares.

b) Cuenta de células nucleadas de los lavados bronquio-alveolares

Para la cuenta de células nucleadas, se utilizó una cámara de Neubauer<sup>3</sup> y la tinción azul de cresilo brillante<sup>4</sup>. Las células se tificaron en el mismo capilar con el que se tomó la muestra y una vez homogeneizada la suspensión, se depositaron 0.010 ml dentro de la cámara.

Para la cuenta en la cámara de Neubauer se utilizó un microscopio de luz y el número de células nucleadas fue determinado a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Células nucleadas} = \frac{\text{cuenta en cámara}}{3} \times 10\ 000$$

Donde.-

Células nucleadas = N° de células nucleadas por ml de lavado bronquio-alveolar \*

Cuenta en cámara = N° de células nucleadas presentes en 3 cuadros diagonales

3 = N° de cuadros observados (1 cuadro = 1 mm<sup>2</sup> )

10 000 = Factor de conversión para obtener el número de células nucleadas por ml de lavado (1 cuadro = 1 mm<sup>2</sup> = 0.0001 ml)

---

1 Propper Manufacturing, Co. L.I. N.Y., U.S.A.

2 Propper Manufacturing, Co. L.I. N.Y., U.S.A.

3 Boeckel, Co. Scient. Equip. B. Hamburg

4 Sigma de México

\* En las cuentas no se incluyeron las células epiteliales

c) Cuenta diferencial de macrófagos y neutrófilos en los lavados bronquio-alveolares

La cuenta diferencial se hizo en un frotis teñido con Wright<sup>1</sup>. Dos gotas del paquete sedimentado se depositaron en un portaobjetos, secándolas con aire caliente para después ser teñidas. Los frotis se montaron con cubreobjetos y se identificaron.

A los frotis se les asignó por una tercera persona un número al azar (21) para evitar una observación prejuiciosa de los ratones de donde provenían las muestras.

Para determinar el porcentaje de macrófagos y neutrófilos de las células bronquio-alveolares, se observaron 200 células nucleadas (no epiteliales) por gota.

d) Cuenta absoluta de macrófagos y neutrófilos en los lavados bronquio-alveolares

A partir de los datos obtenidos en las cuentas de células nucleadas en la cámara de Neubauer y en las cuentas diferenciales de macrófagos y neutrófilos en frotis, se determinaron las cuentas absolutas de macrófagos y neutrófilos por medio de la fórmula siguiente:

$$\text{Cuenta absoluta de macrófagos o neutrófilos} = \frac{\text{cuenta de células nucleadas} \times \% \text{ de macrófagos o de neutrófilos}}{100}$$

Donde.-

Cuenta absoluta de macrófagos o neutrófilos = Determinación del número absoluto de macrófagos o neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar

---

1 Sigma de México

Cuenta de células nucleadas = Número de células nucleadas (no epiteliales) por ml de lavado en cámara

% de macrófagos o de neutrófilos = Porcentaje de macrófagos o neutrófilos obtenido en el estudio diferencial

100 = Factor de conversión

## 8. Lesiones macroscópicas y microscópicas

### a) Colección de muestras

Una vez terminada la inoculación por aerosol, los ratones utilizados para estudios histopatológicos fueron distribuidos al azar. Todos los animales fueron sacrificados mediante la administración de Pentobarbital sódico<sup>1</sup> (0.063 g./ml) con una dosificación de 0.125 ml (7.87 mg/g. peso) por vía intraperitoneal. Los ratones murieron en un tiempo aproximado de 3 a 5 minutos. Posteriormente se pesaron y sus datos fueron registrados.

Para la perfusión con formaldehído, los ratones se sujetaron en una plataforma de madera con una tabla de parafina con los miembros extendidos en decúbito dorsal. La piel y los músculos de la región abdominal izquierda fueron incididos con tijeras, llegando a la cavidad abdominal para desangrarlos mediante la sección de la arteria renal izquierda. La piel de la región cervical media se incidió con bisturí, se separó y se sujetó a la parafina por medio de alfileres. Las glándulas salivales y los músculos de la zona cervical se separaron para dejar expuesta y libre la tráquea. En los anillos traqueales anteriores se hizo una pequeña incisión con bisturí (hoja número 15)<sup>2</sup>, por donde se

---

1 Anestesa1, Norden de México

2 Bard Parker, B & D de México

insertaba un catéter plástico (número 18)<sup>1</sup> a una profundidad aproximada de 1 cm. El catéter se conectó a una jeringa de tuberculina conteniendo 0.40 ml de formalina bufferada al 10%. La inyección del fijador se hizo lentamente, una vez terminada se extrajo el catéter y se pinzaron los anillos abiertos para evitar el reflujo del formaldehído.

Para extraer los pulmones se continuó la incisión abdominal hasta la región torácica y se separó la piel. La caja torácica se abrió por incisiones costocondrales dejando libres a los pulmones. La tráquea y pulmones fueron extraídos seccionándolos con bisturí y con la ayuda de la tracción ejercida en las pinzas que sujetaban los anillos abiertos. Los pulmones, tráquea y corazón una vez extraídos se depositaron en un frasco con formalina bufferada al 10% por un mínimo de 48 horas para completar su fijación. Posteriormente la tráquea y bronquios extrapulmonares se separaron del tejido pulmonar. Se seleccionaron tres cortes sagitales de la parte media de los tres lóbulos del pulmón derecho (craneal, intermedio y caudal) y dos de los lóbulos del pulmón izquierdo (craneal y caudal). Los tejidos fueron procesados con técnicas de rutina; parafinados, seccionados a 5 micrones y teñidos con hematoxilina-eosina ( 2 ). Cortes de cada lado del pulmón fueron montados e identificados en laminillas diferentes.

#### b) Lesiones macroscópicas

Durante la disección de los ratones utilizados en las tres técnicas (determinación de la remoción, lavado bronquio-alveolar y perfusión), los pulmones se inspeccionaron detalladamente buscando cambios morfológicos

---

<sup>1</sup> Estercat, Plásticos Precisión, Med. México

como consolidación, atelectasia y exudación. En el caso de presentarse alguna de estas lesiones se registraron y se clasificaron de acuerdo al grado de extensión.

### c) Histopatología

A todas las muestras procesadas se les asignó por una tercera persona un número al azar (21) para evitar una observación prejuiciosa de los ratones de donde provenían las muestras al hacer el análisis con el microscopio de luz.

Para el estudio de las lesiones microscópicas, los pulmones fueron divididos topográficamente y de una manera arbitraria en: bronquios, bronquiolos, alvéolos y septos. La escala utilizada para la clasificación de los cambios histopatológicos fue nominal para la presencia o ausencia de lesiones y de índice (porcentajes) para la frecuencia de los cambios en los diferentes grupos. Las lesiones estudiadas fueron: congestión, edema, exudación celular, atelectasia, trombos de fibrina e hiperplasia linfoide, tal como se establece en otros trabajos (120). Además se estudió el sitio de la lesión en el tejido pulmonar (141).

#### IV. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizaron 352 ratones, cada uno representó una unidad experimental. La exposición al aerosol se hizo en dos etapas; la primera con Pasteurella haemolytica (grupo P)(cuadro 9) y la segunda con Staphylococcus aureus (grupo S)(cuadro 10). En cada etapa se determinaron la remoción bacteriana (REMBACT), la población celular por lavados bronquio-alveolares (LABROAL) y las lesiones del pulmón por perfusión pulmonar (PERPUL); se incluyeron grupos testigos inoculados con solución amortiguadora (grupo T) para cada una de las etapas. Para cada una de éstas se realizaron 3 réplicas experimentales, incluyendo en cada una de ellas los diferentes intervalos de tiempo postinoculación.

1. Para determinar la remoción bacteriana (REMBACT) se utilizaron un total de 126 unidades experimentales, 63 para el grupo P y 63 para el grupo S, divididos cada uno en 3 réplicas con 21 ratones por réplica. El número de unidades experimentales en los diferentes intervalos postinoculación por réplica fue de 2, con excepción de las cero horas donde se utilizaron 5 para obtener la media de las cero horas con un mayor número de observaciones. Lo anterior ocasiona tener clases desiguales en el grupo de las cero horas con respecto a las demás horas postinoculación. Se contó con 9 intervalos de tiempo postinoculación: 0,1,2,4,8,12,24,48 y 72 horas. En la determinación de la remoción bacteriana se estudiaron diferentes variables a las que se les definió de acuerdo al cuadro 11.

Usando el paquete Estadístico para Ciencias Sociales<sup>1</sup> (SPSS) y el Sistema de Análisis Estadístico<sup>2</sup> (SAS), se obtuvieron los estadísticos:

---

1 SPSS. McGraw Hill, Inc. N.Y., U.S.A. P.U.C. (UNAM)

2 SAS. Institute Inc., Raleigh, N.C., U.S.A., C.E.C. (Chapingo), México.



**CUADRO 9 . PRIMERA ETAPA**  
**NUMERO DE RATONES USADOS PARA CADA TECNICA EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION DESPUES DE**  
**EXPONERLOS A UN AEROSOL DE PASTEURELLA HAEMOLYTICA.**

Técnica	Réplica	Tiempo postinoculación (horas)											Total por réplica
		0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300	
Determinación de la remoción bacteriana	1	5	2	2	2	2	2	2	2	2	ND	ND	21
	2	5	2	2	2	2	2	2	2	2	ND	ND	21
	3	5	2	2	2	2	2	2	2	2	ND	ND	21
Lavado bronquio-alveolar	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	ND	19
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	22
	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	22
Perfusión pulmonar	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND	9
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
TESTIGO													
Lavado bronquio-alveolar	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	22
Perfusión pulmonar	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11

Total por etapa = 190

ND = No determinado

CUADRO 10. SEGUNDA ETAPA  
 NUMERO DE RATONES USADOS PARA CADA TECNICA EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION DESPUES DE EXPONERLOS A UN AEROSOL DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

Técnica	Réplica	Tiempo postinoculación (horas)											Total por réplica
		0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300	
Determinación de la remoción bacteriana	1	5	2	2	2	2	2	2	2	2	ND	ND	21
	2	5	2	2	2	2	2	2	2	2	ND	ND	21
	3	5	2	2	2	2	2	2	2	2	ND	ND	21
Lavado bronquio-alveolar	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	22
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	22
	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	22
Perfusión pulmonar	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
TESTIGO													
Lavado bronquio-alveolar	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	22*
Perfusión pulmonar	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11*

\*\* Total por etapa = 162

ND = No determinado

\* Los ratones del grupo control fueron utilizados para ambas etapas

\*\* En el total por etapa no están incluidos los ratones del grupo control

**CUADRO 11. DEFINICION DE VARIABLES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE LA REMOCION BACTERIANA EN RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE PASTEURELLA HAEMOLYTICA Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

Clave	Definición
COLGRPUL	Nº de bacterias por gramo de pulmón
COLLOG	Transformación logarítmica de COLGRPUL
COLRATON	Nº de bacterias por ratón
INRET	Indice de retención bacteriana
INRETLOG	Transformación logarítmica de INRET
INREM	Indice de remoción bacteriana
INREMLOG	Transformación logarítmica de INREM
PESOV	Peso vivo
PESOPT	Peso del pulmón transformado a miligramos
PORPVIVO	Porcentaje que representa el pulmón en mg con respecto al peso vivo

medias de peso vivo, peso del pulmón, porcentaje que representa el pulmón respecto a peso vivo, bacterias por gramo de pulmón, retención y remoción pulmonar, su desviación y error estándar. Se determinaron las correlaciones entre las variables: número de bacterias por gramo de pulmón, índices o porcentajes de retención y remoción con respecto a intervalos de tiempo postinoculación, así como pruebas de Duncan para medias.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para estudiar el efecto de grupo, réplica experimental, de tiempo (horas postinoculación) y su interacción sobre las variables bacterias por gramo de pulmón, porcentaje de retención y de remoción. Fueron probadas las siguientes hipótesis nulas:

Efecto principal	Hipótesis nulas:
Grupo	$\mu_P = \mu_S$
Réplica	$\mu_{R_1} = \mu_{R_2} = \mu_{R_3}$
Tiempo	$\mu_{H_0} = \mu_{H_1} = \mu_{H_2} = \mu_{H_4} = \mu_{H_8}$ $= \mu_{H_{12}} = \mu_{H_{24}} = \mu_{H_{48}} = \mu_{H_{72}}$

También se investigó la posible interacción entre grupo, réplica e intervalos de tiempo (horas):

Grupo * Réplica
Grupo * Hora
Réplica * Hora

Los ANDEVA se desarrollaron con el modelo siguiente (68):

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + R_j + T_k + GR_{ij} + GT_{ik} + RT_{jk} + E_{ijk}$$

Donde.-

$Y_{ijk}$  = N° de bacterias por gramo de pulmón, peso vivo, peso pulmón e  
Índice de retención o  
Índice de remoción

$\mu$  = Media general

$G_i$  = Efecto del i-ésimo grupo,  $i = 1, 2$

$R_j$  = Efecto de la  $j$ -ésima réplica,  $j = 1, 2, 3$

$T_k$  = Efecto del  $k$ -ésimo tiempo (horas),  $k = 1, 2, 3, \dots, 9$

$GR_{ij}$  = Interacción entre el  $i$ -ésimo grupo y la  $j$ -ésima réplica

$GT_{ik}$  = Interacción entre el  $i$ -ésimo grupo y el  $k$ -ésimo tiempo

$RT_{jk}$  = Interacción entre la  $j$ -ésima réplica y el  $k$ -ésimo tiempo

$E_{ijk}$  = Error aleatorio, NI  $(0, \sigma^2 e)$

Se realizó el ANDEVA usando transformación logarítmica (base 10) de las variables número de bacterias por gramo de pulmón y de los índices de retención y de remoción, para tratar de obtener una distribución normal de estas variables.

Se determinó la mejor ecuación de regresión entre el número de bacterias por gramo de pulmón, el índice de retención y remoción con respecto al tiempo postinoculación. El modelo incluyó efecto lineal, cuadrático y cúbico:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_1^2 + \beta_3 X_1^3 + X_{eij}$$

Donde.-

$Y_{ij}$  = Índice de retención o Índice de remoción

$\beta_0$  = Ordenada al origen

$\beta_1$  = Coeficiente de regresión lineal

$\beta_2$  = Coeficiente de regresión cuadrático

$\beta_3$  = Coeficiente de regresión cúbico

$X$  = Tiempo en horas

$X_{eij}$  = Error aleatorio NI  $(0, \sigma^2 e)$

2. Para la técnica de lavado bronquio-alveolar (LABROVAL) se utilizaron un total de 151 unidades experimentales, 63 para el grupo P, 66 para el grupo S y 22 para el grupo T. Los primeros dos grupos

estuvieron formados por 3 réplicas cada uno y el grupo testigo solo contó con 1 réplica. Al desarrollar la primera etapa con el grupo P, en la réplica 1 y al estudiar la respuesta celular se encontró que a las 72 horas postinoculación la población celular no había retornado a sus valores normales, por lo que se optó por añadir dos intervalos de tiempo postinoculación para la colección de muestras, por lo que quedaron integrados así: 0,1,2,4,8,12,24,48,72,150 y 300 horas. Por lo tanto el número de unidades experimentales fue diferente en ambas etapas. En la técnica de lavado bronquio-alveolar las variables estudiadas fueron definidas en el cuadro 12.

Utilizando el paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS)<sup>1</sup> y el Sistema de Análisis Estadístico (SAS)<sup>2</sup> se obtuvieron los estadísticos siguientes: medias, desviación y error estándar de las variables; peso, volúmenes recuperados, número de células nucleadas, porcentaje y número absoluto de macrófagos y neutrófilos e índices entre macrófagos y neutrófilos, por grupo, réplica y hora postinoculación. Se determinaron las correlaciones existentes entre volúmenes recuperados y cuentas celulares con respecto al peso y hora postinoculación, así como comparaciones de medias por pruebas de Duncan.

Se realizaron análisis de varianza (ANDEVA) para el estudio del efecto de grupo, réplica experimental, tiempo (horas postinoculación) y las posibles interacciones de grupo, réplica y tiempo, sobre las variables; número de células nucleadas, porcentaje y número absoluto de macrófagos y neutrófilos, índices entre macrófagos y neutrófilos, peso vivo y volúmenes de lavado recuperados. Se probaron las siguientes

---

1 SPSS. McGraw Hill Inc. N.Y., U.S.A. P.U.C. (UNAM)  
2 SAS. Institute Inc., Raleigh, N.C., U.S.A., C.E.C. (Chapingo), México.

**CUADRO 12. DEFINICION DE VARIABLES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE LOS LAVADOS BRONQUIO-ALVEOLARES DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE PASTEURELLA HAEMOLYTICA, DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y TESTIGOS.**

Clave	Definición
PESO	Peso vivo
PVOLREI <sub>1,2 y 3</sub>	Porcentaje de volúmenes individuales recuperados (1,2 y 3)
VOLRECT	Volumen recuperado total
VOLRECML	Volumen recuperado promedio por ml
PTVOLREC	Porcentaje total de volumen recuperado
VOLPVIVO	Relación de volumen recuperado en microlitros con respecto al peso vivo
NUCENUC	Número de células nucleadas por mililitro
NUCENLOG	Transformación logarítmica de NUCENUC
CEGRPV	Células por gramo de peso vivo
CUDIFN	Cuenta diferencial de neutrófilos (%)
CUDIFM	Cuenta diferencial de macrófagos (%)
NUABSN	Número absoluto de neutrófilos
NABNLOG	Transformación logarítmica de NUABSN
NUABSM	Número absoluto de macrófagos
NABMLOG	Transformación logarítmica de NUABSM
INM	Indice de neutrófilos sobre macrófagos
IMN	Indice de macrófagos sobre neutrófilos

hipótesis nulas:

Efecto principal	Hipótesis nulas:
Grupo	$\mu_P = \mu_S = \mu_T$
Réplica	$\mu_{R_1} = \mu_{R_2} = \mu_{R_3}$
Tiempo	$\mu_{H_0} = \mu_{H_1} = \mu_{H_2} \dots = \mu_{H_{300}}$

Se investigaron también las posibles interacciones entre grupo, réplica e intervalos de tiempo (horas):

Grupo \* Réplica

Grupo \* Hora

Réplica \* Hora

Los ANDEVA fueron desarrollados bajo el siguiente modelo (68):

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + R_j + T_k + GR_{ij} + GT_{ik} + RT_{jk} + E_{ijk}$$

Donde.-

$Y_{ijk}$  = Número de células nucleadas o  
 Porcentaje de macrófagos y neutrófilos o  
 Número absoluto de macrófagos y neutrófilos o  
 Índice entre macrófagos y neutrófilos o  
 Peso vivo y volumen de lavado bronquio-alveolar recuperado

$\mu$  = Media general

$G_i$  = Efecto del i-ésimo grupo,  $i = 1,2,3$

$R_j$  = Efecto de la j-ésima réplica,  $j = 1,2,3$

$T_k$  = Efecto del k-ésimo tiempo (horas),  $k = 1,2,3 \dots 11$

$GR_{ij}$  = Interacción entre el i-ésimo grupo y la j-ésima réplica

$GT_{ik}$  = Interacción entre el i-ésimo grupo y el k-ésimo tiempo

$RT_{jk}$  = Interacción entre la j-ésima réplica y el k-ésimo tiempo

$E_{ijk}$  = Error aleatorio, NI (0,  $\sigma^2e$ )

La transformación logarítmica (base 10) fue utilizada en el análisis con el fin de conseguir una distribución normal, homogeneizando



y obteniendo pocas fluctuaciones en las variables dependientes: número de células nucleadas y número absoluto de macrófagos y neutrófilos con respecto al tiempo postinoculación. Se incluyó un modelo de regresión para estudiar el efecto lineal, cuadrático y cúbico:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_1^2 + \beta_3 X_1^3 + X_{eij}$$

Donde.-

$Y_{ij}$  = Número de células nucleadas o  
Porcentaje de macrófagos y neutrófilos o  
Número absoluto de macrófagos y neutrófilos o  
Índices entre neutrófilos y macrófagos

$\beta_0$  = Ordenada al origen

$\beta_1$  = Coeficiente de regresión lineal

$\beta_2$  = Coeficiente de regresión cuadrático

$\beta_3$  = Coeficiente de regresión cúbico

X = Tiempo en horas

$X_{eij}$  = Error aleatorio NI ( $0, \sigma^2 e$ )

3. En la técnica de perfusión pulmonar (PERPUL) se aumentaron también 2 intervalos de tiempo postinoculación. Se utilizaron 75 ratones para las dos etapas. Para el grupo P fueron 31 ratones en 3 réplicas, para el grupo S se utilizaron 33 ratones en 3 réplicas y el grupo T con solo 1 réplica de 11 ratones. Los ratones del grupo testigo fueron utilizados para ambas etapas.

En la perfusión pulmonar se estudiaron los cambios macro y microscópicos encontrados en los diferentes intervalos postinoculación. Se decidió que la estadística frecuencia y las escalas ordinal y de índice eran las más adecuadas para estudiar los grados de extensión de los cambios.

Con el objeto de investigar la existencia de una posible asociación entre remoción bacteriana y lavados bronquio-alveolares

(células fagocíticas en el pulmón) se decidió hacer un estudio de correlación. Para esto se tomaron las variables de remoción bacteriana, expresada en índices o porcentajes por un lado y por el otro los números absoluto de células nucleadas, de neutrófilos y de macrófagos. Se utilizó el coeficiente de correlación ( $r$ ) de Pearson (143)

Con los datos obtenidos en todos los experimentos se realizaron diferentes tipos de análisis (cuadros 13,14 ).

CUADRO 13. DISEÑO EXPERIMENTAL  
 VARIABLES, ESCALAS Y PRUEBAS ESTADÍSTICAS UTILIZADAS EN LOS PARÁMETROS INVESTIGADOS DE RATONES INOCULADOS  
 CON AEROSOLES DE PASTEURELLA HAEMOLYTICA, DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y TESTIGOS.

Parámetro	Variable	Escala	Estadística
Remoción bacteriana	COLGRPUL	razón	$\bar{X}^1$ , D.E. <sup>2</sup> , valor mínimo, máximo, E.E. <sup>3</sup> de la media, ANDEVA, transformación logarítmica, regresión y correlación. Duncan.
	COLLOG	razón	
	COLRATON	razón	
	INRET	índice	
	INRETLOG	índice	$\bar{X}^1$ , D.E. <sup>2</sup> , valor mínimo, máximo, E.E. <sup>3</sup> de la media, ANDEVA, transformación logarítmica, regresión y correlación. Duncan.
	INREM	índice	
	INREMLOG	índice	
	PESOV	razón	
	PESOPT	razón	$\bar{X}^1$ , D.E. <sup>2</sup> , valor mínimo, máximo, E.E. <sup>3</sup> de la media, ANDEVA, regresión y correlación.
	PORPVIVO	índice	
Perfusión pulmonar	Cambios macro y microscópicos	nominal (-,+) índice	Frecuencias

<sup>1</sup> Media

<sup>2</sup> Desviación estándar

<sup>3</sup> Error estándar

**CUADRO 14. DISEÑO EXPERIMENTAL**  
**VARIABLES, ESCALAS Y PRUEBAS ESTADÍSTICAS UTILIZADAS EN LOS PARÁMETROS INVESTIGADOS DE RATONES INOCULADOS**  
**CON AEROSOL DE PASTEURELLA HAEMOLYTICA , DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y TESTIGOS.**

Parámetro	Variable	Escala	Estadística
Lavado bronquio-alveolar	PESO	razón	$\bar{X}^1$ , D.E. <sup>2</sup> , E.E. <sup>3</sup> de la media, ANDEVA regresión y correlación.
	PVOLREI <sub>1,2 y 3</sub>	índice	
	VOLRECT	razón	
	VOLRECML	razón	$\bar{X}^1$ , D.E. <sup>2</sup> , valor mínimo, máximo, E.E. <sup>3</sup> de la media, ANDEVA, transformación logarítmica, regresión y correlación, Duncan.
	PTVOLREC	índice	
	VOLPIVO	índice	
	NUCENUC	razón	$\bar{X}^1$ , D.E. <sup>2</sup> , valor mínimo, máximo, E.E. <sup>3</sup> de la media, ANDEVA, transformación logarítmica, regresión y correlación, Duncan.
	NUCENLOG	razón	
	CEGRPV	razón	
	CUDIFN	índice	$\bar{X}^1$ , D.E. <sup>2</sup> , valor mínimo, máximo, E.E. <sup>3</sup> de la media, ANDEVA, transformación logarítmica, regresión y correlación, Duncan.
	CUDIFM	índice	
	NUABSN	razón	
	NABNLOG	razón	
	NUABSM	razón	
	NABMLOG	razón	
INM	índice	$\bar{X}^1$ , D.E. <sup>2</sup> , valor mínimo, máximo, E.E. <sup>3</sup> de la media, ANDEVA, regresión y correlación, Duncan.	
IMN	índice		

<sup>1</sup> Media  
<sup>2</sup> Desviación estándar  
<sup>3</sup> Error estándar

## V. RESULTADOS

### A. Remoción bacteriana del pulmón

El depósito de Pasteurella haemolytica en los pulmones de los ratones a las cero horas o sea al concluir la inoculación por aerosol tuvo en las tres réplicas experimentales una media de  $6.06 \times 10^5$  bacterias por gramo de pulmón. El promedio de depósito en los ratones inoculados con Staphylococcus aureus fue de  $9.9 \times 10^5$  bacterias por gramo de pulmón (cuadro 15).

El número de bacterias por gramo de pulmón depositadas en la población total a las cero horas mostró una correlación negativa ( $r = -0.91$ ) con respecto a la concentración de inóculo inicial (cuadro 15).

El número de bacterias por gramo de pulmón (COLGRPUL) obtenido en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación fue mayor en las primeras horas en el grupo de ratones inoculado con S. aureus (fig. 1). En este grupo, el número de bacterias descendió progresivamente a partir de la primera hora después de la inoculación, sin presentar fluctuaciones marcadas, aunque más lentamente que en el caso de P. haemolytica. El número de S. aureus encontrado en los pulmones llegó al mínimo a las 12 horas después de la inoculación (cuadro 16). El número de bacterias por gramo de pulmón fue menor en las primeras horas en los ratones inoculados con P. haemolytica, comparado con el grupo expuesto a S. aureus (fig. 1). Aunque el número de P. haemolytica disminuyó rápidamente a la primera hora después de la inoculación, se presentó un aumento marcado a la segunda hora, para después descender progresivamente y de una manera más rápida, llegando al mínimo a las 12 horas (apéndice 3).

El número de bacterias por gramo de pulmón analizado por medio de

transformación logarítmica no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los dos grupos de ratones estudiados (fig. 2 ). El peso del pulmón analizado como covariable tuvo un efecto significativo ( $p < 0.01$ ) con relación al número de bacterias por gramo de pulmón en ambos grupos de ratones (cuadro 18). En el número de bacterias por ratón (COLRATON) sin ajustarlo al peso pulmonar, el efecto del peso del pulmón también resultó significativo ( $p < 0.05$ ) en los dos grupos (cuadro 17) (apéndice 4 ).

El número de bacterias por gramo de pulmón mostró diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en las réplicas experimentales de los ratones inoculados con S. aureus (cuadro 18). Estas diferencias se presentaron entre las tres réplicas (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ). El número de bacterias por gramo de pulmón no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las réplicas de los ratones inoculados con P. haemolytica (cuadro 18).

El número de bacterias por gramo de pulmón fue influenciado significativamente ( $p < 0.01$ ) por los intervalos de tiempo postinoculación en los dos grupos de ratones estudiados (cuadro 18). La interacción de réplica y tiempo (Rep\*Hora) mostró un efecto significativo tanto en el grupo expuesto a P. haemolytica ( $p < 0.05$ ) como en el de S. aureus ( $p < 0.01$ ) (cuadro 18).

Las medias del número de bacterias por gramo de pulmón en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación mostraron diferencias significativas (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ) sobre todo en las primeras ocho horas con respecto a las demás en el grupo inoculado con P. haemolytica (apéndice 5 ). En las medias del número de bacterias por gramo de pulmón en el grupo expuesto a S. aureus las diferencias se presentaron entre la mayoría de los intervalos de tiempo postinoculación, excepto en las cero

y primera horas (apéndice 6 ). El número de bacterias por gramo de pulmón, presentó una correlación negativa ( $r = -0.56$ ) con respecto a los diferentes intervalos de tiempo postinoculación en los ratones del grupo P. haemolytica. La transformación logarítmica aumentó la correlación ( $r = -0.73$ ) (cuadro 23). El coeficiente de correlación entre el número de bacterias por gramo de pulmón y el tiempo fue negativo ( $r = -0.55$ ) en el grupo expuesto a S. aureus. La transformación logarítmica aumentó el grado de asociación ( $r = -0.93$ ) (cuadro 23).

El número de bacterias por gramo de pulmón a través de los diferentes intervalos de tiempo postinoculación presentó efecto lineal, cuadrático y cúbico significativo ( $p < 0.01$ ) en ambos grupos de ratones.

El patrón de remoción de P. haemolytica (figs. 3 y 4 ) a través del tiempo fue de una manera más rápida pero con mayores variaciones que en el caso de S. aureus (cuadros 19 y 20). A la primera hora fue eliminado el 60.1% de las P. haemolytica inoculadas, sin embargo a la segunda hora se presentó un aumento en el número de bacterias en el pulmón con respecto a la hora anterior, por lo que el porcentaje de remoción fue sólo el 10.2%, a las cuatro horas se eliminó el 84.6%, a las ocho horas el 82.2%, llegando a las 12 horas al 99.9% de remoción y finalmente a las 24 horas fue eliminado el 100% de las bacterias inoculadas (apéndices 7 y 8 ).

La remoción de S. aureus fue más consistente o uniforme aunque más lenta (figs. 3 y 4 ). A la primera hora se eliminó el 27.6% de las bacterias depositadas, a la segunda hora y cuarta horas se eliminó el 54.9% y 86.5% respectivamente, a las ocho horas el 95%; para llegar a las 12 horas al 99% y a las 24 horas al 99.8%. A partir de las 48 horas el índice de remoción fue del 100% (apéndices 7 y 8 ).

Utilizando la transformación logarítmica, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los índices de retención y remoción bacteriana entre los grupos de ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica y de S. aureus (figs. 5 y 6).

Se observó que el peso del pulmón analizado como covariable, influyó significativamente en la retención ( $p < 0.01$ ) y en la remoción ( $p < 0.05$ ) de las dos bacterias estudiadas (cuadros 21 y 22). Los índices de retención y remoción no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las réplicas experimentales de S. aureus; sin embargo sí se detectaron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre las réplicas de P. haemolytica (cuadros 21 y 22). Los intervalos de tiempo postinoculación tuvieron un efecto altamente significativo ( $p < 0.01$ ) en los índices de retención y remoción para las dos bacterias inoculadas (cuadros 21 y 22).

Las medias de retención y remoción mostraron diferencias significativas (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ) en las primeras ocho horas con respecto a las demás en el caso de P. haemolytica y entre la mayoría de las horas en el caso de S. aureus (apéndices 9 y 10). El efecto de la interacción réplica y tiempo (Rep\*Hora) fue significativo ( $p < 0.01$ ) en el caso del índice de retención pero no en el de remoción de S. aureus. Este efecto no fue significativo ( $p > 0.05$ ) en los animales inoculados con P. haemolytica (cuadros 21 y 22). Las medias de retención de P. haemolytica en los pulmones de los ratones mostraron una asociación negativa ( $r = -0.56$ ) con respecto al tiempo postinoculación; la transformación logarítmica aumentó el coeficiente de correlación ( $r = -0.60$ ). Para S. aureus el grado de asociación fue también negativo ( $r = -0.56$ ) y su transformación logarítmica también aumentó la correlación ( $r = -0.71$ ) (cuadro 23).



Las medias de los índices de remoción de P. haemolytica mostraron una asociación positiva ( $r = 0.56$ ) con el tiempo postinoculación, siendo más bajo el coeficiente para la transformación logarítmica ( $r = 0.45$ ). En el grupo expuesto a S. aureus los índices de remoción mostraron una correlación positiva ( $r = 0.56$ ), disminuyendo también con la transformación logarítmica ( $r = 0.41$ ) (cuadro 23).

Las curvas de retención y remoción de las dos bacterias a través del tiempo postinoculación presentaron un comportamiento lineal, cuadrático y cúbico significativo ( $p < 0.05$ ).

El peso de los ratones expuestos a los aerosoles de bacterias tuvieron una media de 24.72 g. Los pesos de los ratones inoculados con P. haemolytica presentaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) con respecto a los inoculados con S. aureus (apéndice 11).

El peso promedio de los pulmones de los ratones utilizados en los estudios de remoción bacteriana fue de 278.3 mg; encontrándose diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre los pesos pulmonares de los ratones inoculados con P. haemolytica y los de S. aureus (apéndice 11).

El peso del pulmón con respecto al peso vivo del ratón, mostró una correlación baja ( $r = 0.29$ ). El porcentaje que representó el peso del pulmón con respecto al peso vivo (PORPVIVO) fue de 1.14% en promedio para la población total y no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los dos grupos de ratones (apéndice 11). El porcentaje que representa el peso del pulmón con respecto al peso vivo (PORPVIVO) mostró una correlación aceptable ( $r = 0.55$ ) con el peso del pulmón.

CUADRO 15. CONCENTRACIONES DE INOCULO Y DEPOSITO DE P. HAEMOLYTICA Y S. AUREUS EN LOS PULMONES DE RATONES INOCULADOS POR AEROSOL.

Grupo	Nº de réplica	Inóculo (Nº de UFC/ml)	Depósito a las cero horas (Nº de UFC/g de pulmón)	Coefficiente de correlación
<u>P. haemolytica</u>	1	$6.4 \times 10^9$	$3.5 \times 10^5$	r = -0.99
	2	$3.7 \times 10^9$	$7.4 \times 10^5$	
	3	$3.8 \times 10^9$	$7.3 \times 10^5$	
	total media ± D.E. ±	$4.6 \times 10^9$ $1.5 \times 10^9$	$6.06 \times 10^5$ $\pm 2.2 \times 10^5$	
<u>S aureus</u>	1	$7.5 \times 10^8$	$8.11 \times 10^5$	r = -0.47
	2	$4.8 \times 10^8$	$1.16 \times 10^6$	
	3	$1.0 \times 10^9$	$1.0 \times 10^6$	
	total media ± D.E.	$7.4 \times 10^8$ $2.6 \times 10^8$	$9.9 \times 10^5$ $1.7 \times 10^5$	
TOTAL	media	$2.6 \times 10^9$	$7.9 \times 10^5$	r = -0.91
	± D.E.	$2.3 \times 10^9$	$2.7 \times 10^5$	

D.E. = Desviación estándar

UFC = Unidades formadoras de colonias

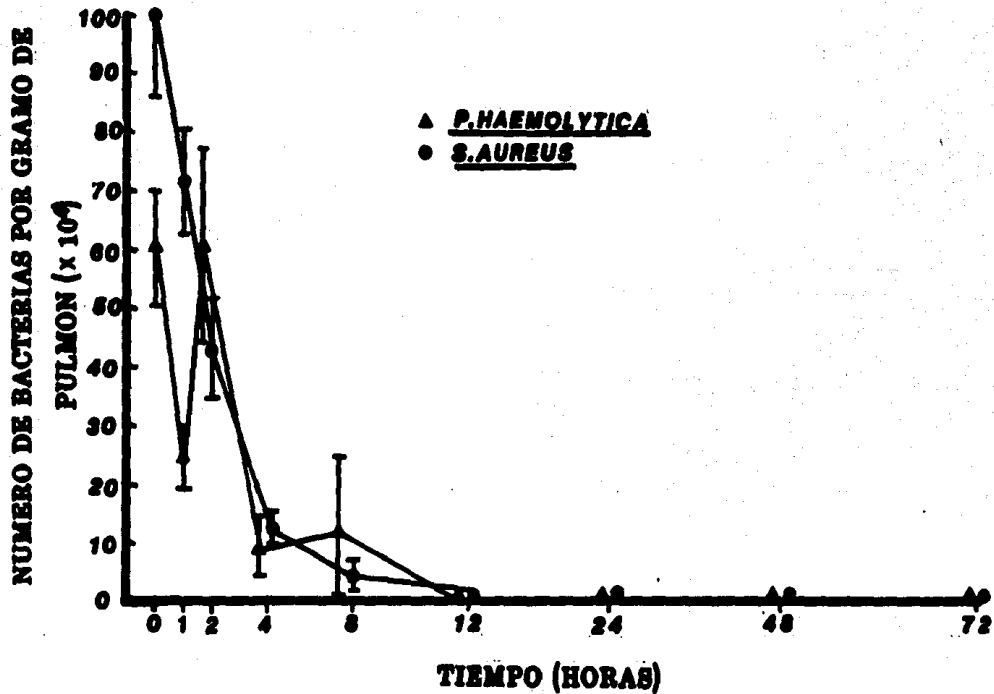


Fig.1 . Número de bacterias por gramo de pulmón (COLGRPUL) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica o de S. aureus (media ± error estándar).

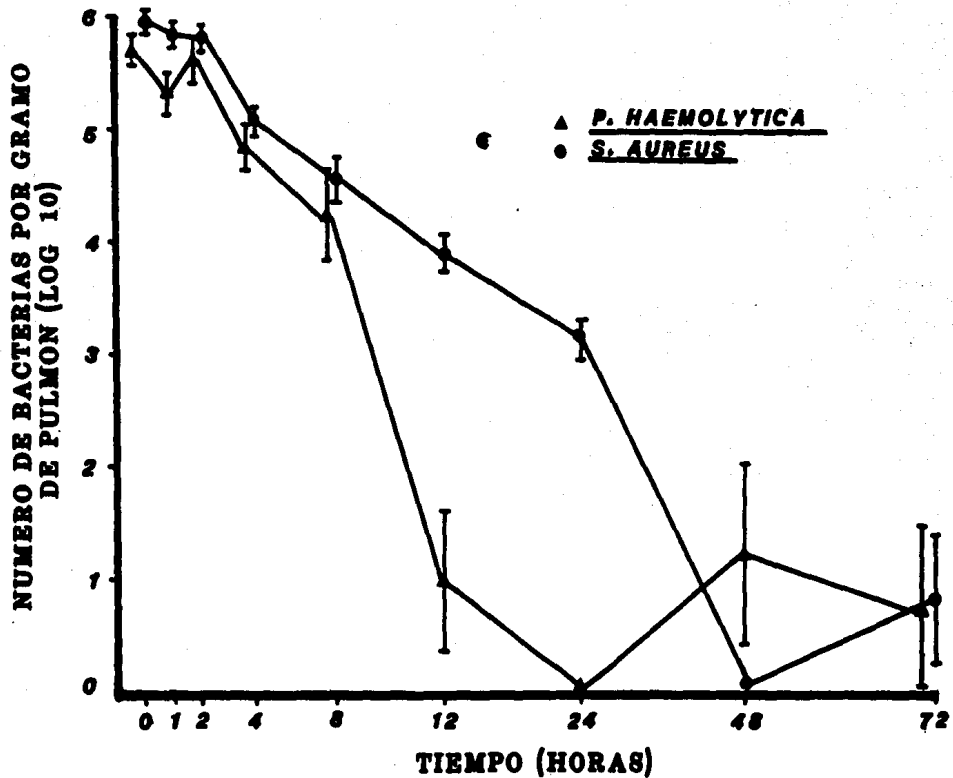


Fig. 2 . Número de bacterias por gramo de pulmón (COLLOG) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica o de S. aureus (media  $\pm$  error estándar).

CUADRO 16. NUMERO DE BACTERIAS POR GRAMO DE PULMON (COLGRPUL) DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLE DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P) Y DE S. AUREUS (GRUPO S) EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	N		Intervalos de tiempo postinoculación (horas)								
			0	1	2	4	8	12	24	48	72
P	63	media	6.09x10 <sup>5</sup>	2.4x10 <sup>5</sup>	5.9x10 <sup>5</sup>	9.1x10 <sup>4</sup>	1.2x10 <sup>5</sup>	2.7x10 <sup>2</sup>	0	3.8x10 <sup>3</sup>	3.1x10 <sup>3</sup>
		± D.E.	3.5 x10 <sup>5</sup>	1.2x10 <sup>5</sup>	3.8x10 <sup>5</sup>	1.0x10 <sup>5</sup>	2.7x10 <sup>5</sup>	4.3x10 <sup>2</sup>	0	8.7x10 <sup>3</sup>	7.6x10 <sup>3</sup>
S	63	media	9.9 x10 <sup>5</sup>	7.1x10 <sup>5</sup>	4.3x10 <sup>5</sup>	1.2x10 <sup>5</sup>	4.8x10 <sup>4</sup>	9.7x10 <sup>3</sup>	1.7x10 <sup>3</sup>	0	8.4x10 <sup>1</sup>
		± D.E.	4.8 x10 <sup>5</sup>	2.0x10 <sup>5</sup>	1.8x10 <sup>5</sup>	4.7x10 <sup>4</sup>	3.7x10 <sup>4</sup>	6.1x10 <sup>3</sup>	1.2x10 <sup>3</sup>	0	1.3x10 <sup>2</sup>

D.E = Desviación estándar

CUADRO 17. NUMERO DE BACTERIAS POR RATON (COLRATON) OBTENIDO DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLE DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P) Y DE S. AUREUS (GRUPO S) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	N		Intervalos de tiempo postinoculación (horas)								
			0	1	2	4	8	12	24	48	72
P	63	media	1.5x10 <sup>5</sup>	7.4x10 <sup>4</sup>	1.7x10 <sup>5</sup>	2.4x10 <sup>4</sup>	2.4x10 <sup>4</sup>	5.5x10 <sup>1</sup>	0	1.5x10 <sup>3</sup>	1.0x10 <sup>3</sup>
		± D.E.	9.8x10 <sup>4</sup>	3.1x10 <sup>4</sup>	1.1x10 <sup>5</sup>	2.1x10 <sup>4</sup>	5.2x10 <sup>4</sup>	8.8x10 <sup>1</sup>	0	3.7x10 <sup>3</sup>	2.4x10 <sup>3</sup>
S	63	media	2.1x10 <sup>5</sup>	1.7x10 <sup>5</sup>	8.5x10 <sup>4</sup>	2.8x10 <sup>4</sup>	1.2x10 <sup>4</sup>	2.3x10 <sup>3</sup>	4.5x10 <sup>2</sup>	0	3.3x10 <sup>1</sup>
		± D.E.	7.8x10 <sup>4</sup>	2.6x10 <sup>4</sup>	4.1x10 <sup>4</sup>	7.6x10 <sup>3</sup>	6.9x10 <sup>3</sup>	8.9x10 <sup>2</sup>	3.0x10 <sup>2</sup>	0	5.5x10 <sup>1</sup>

D.E. = Desviación estándar

CUADRO 18. ANALISIS DE VARIANZA DEL NUMERO DE BACTERIAS POR GRAMO DE PULMON, TRANSFORMADO A LOGARITMOS; BASE 10 (COLLOG) EN RATONES INOCULADOS CON AEROSOL DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P) Y S. AUREUS (GRUPO S).

Grupo	F.V.	G.L.	Tipo I S.C.	C M	PR > F	r <sup>2</sup>
P	modelo	27	639.69	23.69	0.0001	0.91
	*peso pulmón	1	55.89		0.0001	
	réplica	2	4.80		0.2423	
	hora	8	522.52		0.0001	
	Rep*Hora	16	56.47		0.0275	
	error	35	56.91	1.62		
	total corregido	62	696.6			
S	modelo	27	470.95	17.44	0.0001	0.99
	*peso pulmón	1	0.25		0.0047	
	réplica	2	2.430		0.0001	
	hora	8	442.92		0.0001	
	Rep*Hora	16	25.34		0.0001	
	error	35	0.99	0.028		
	total corregido	62	471.95			

\* = Covariable

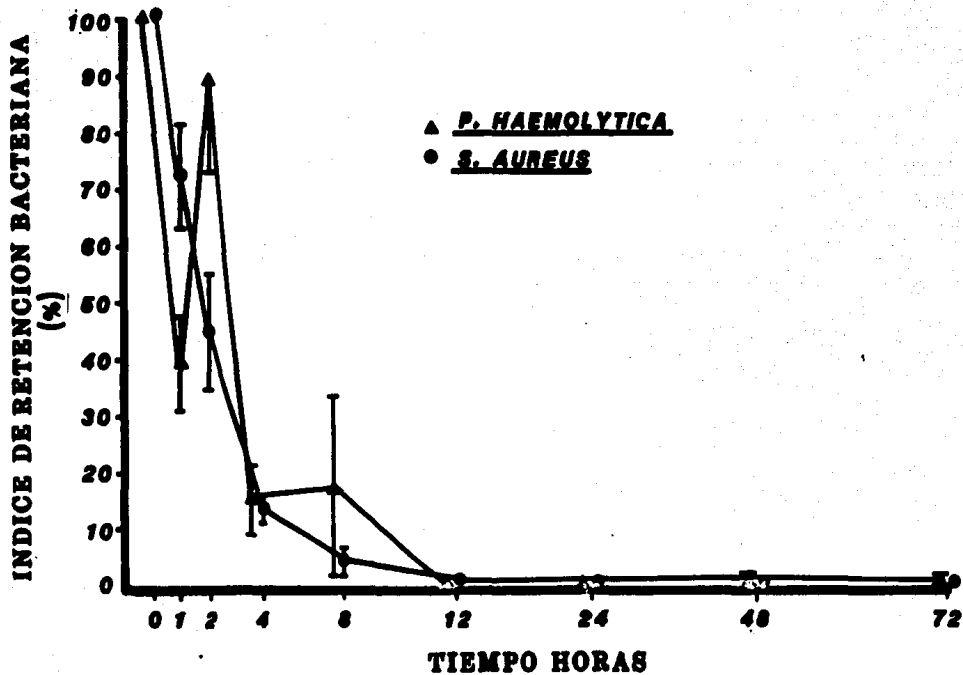


Fig. 3 . Indice de retención bacteriana del pulmón (INRET) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica o de S. aureus (media  $\pm$  error estándar).

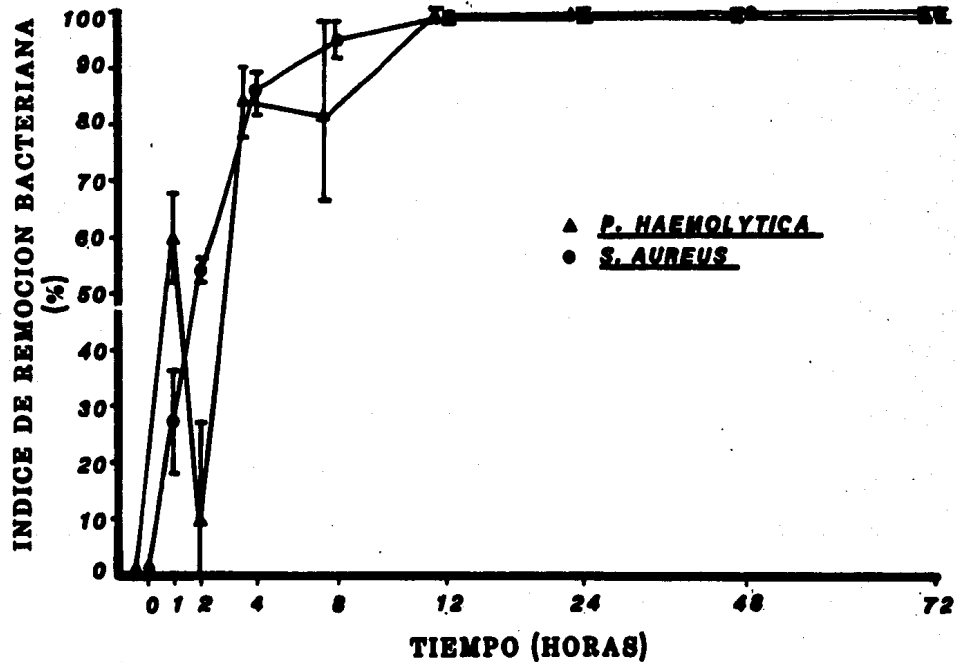


Fig. 4 . Indice de remoción bacteriana del pulmón (INREM) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica o de S. aureus (media  $\pm$  error estándar).



CUADRO 19. INDICES O PORCENTAJES DE RETENCION BACTERIANA (INRET) OBTENIDOS DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA Y DE S. AUREUS EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	N		0	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)							
				1	2	4	8	12	24	48	72
P	63	media	100	39.83	89.74	15.38	17.70	0.036	0	1.04	0.883
		± D.E.	0	18.85	43.45	14.16	37.72	0.059	0	2.49	2.16
S	63	media	100	72.39	45.06	13.48	4.96	0.959	0.164	0	0.008
		± D.E.	0	20.87	22.48	6.03	4.12	0.514	0.095	0	0.013

D.E. = Desviación estándar

CUADRO 20. INDICES O PORCENTAJES DE REMOCION BACTERIANA (INREM) OBTENIDOS DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P) Y DE S. AUREUS (GRUPO S) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	N		0	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)							
				1	2	4	8	12	24	48	72
P	63	media	0	60.16	*10.28	84.61	82.29	99.96	100	98.95	99.11
		± D.E.	0	18.85	-----	14.16	37.32	0.05	0	2.49	2.16
S	63	media	0	28.05	54.93	86.51	95.03	99.04	99.83	100	99.99
		± D.E.	0	20.10	22.48	6.03	4.12	0.51	0.09	0	0.01

D.E. = Desviación estándar

\* El índice de remoción se ajustó de acuerdo al de retención debido a valores negativos en dos ratones.

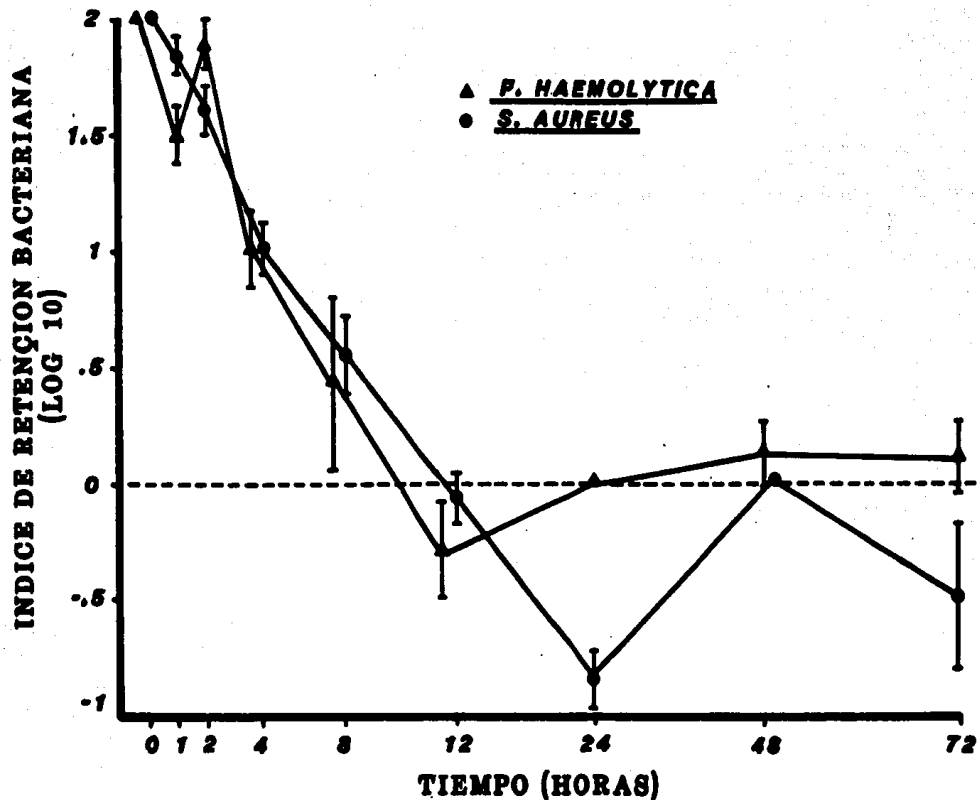


Fig. 5 . Indice de retención bacteriana del pulmón (INRETLOG) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica o de S. aureus (media  $\pm$  error estándar).

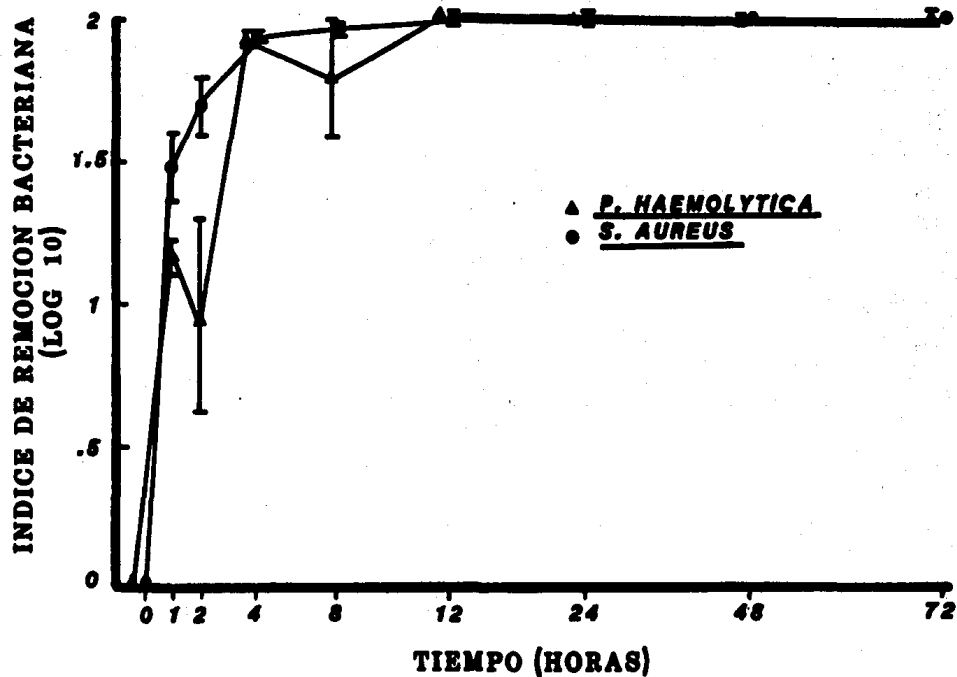


Fig. 6 . indice de remoción bacteriana del pulmón (INREMLOG) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica o de S. aureus (media  $\pm$  error estándar).

CUADRO 21. ANALISIS DE VARIANZA DEL INDICE DE RETENCION PULMONAR;  
 TRANSFORMACION LOGARITMICA BASE 10 (INRETLOG) DE RATONES  
 INOCULADOS CON AEROSOL DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P)  
 Y DE S. AUREUS (GRUPO S)

Grupo	F.V.	G.L.	Tipo I S.C.	C M	PR > F	r <sup>2</sup>
P	modelo	27	166.09	6.15	0.0001	0.92
	*peso pulmón	1	12.08		0.0001	
	réplica	2	2.51		0.0458	
	hora	8	144.95		0.0001	
	Rep*Hora	16	6.53		0.3947	
	error	35	13.05	0.372		
	total corregido	62	179.14			
S	modelo	27	135.89	5.03	0.0001	0.99
	*peso pulmón	1	3.70		0.0001	
	réplica	2	0.12		0.1285	
	hora	8	130.74		0.0001	
	Rep*Hora	16	1.31		0.0041	
	error	35	0.98	0.028		
	total corregido	62	136.88			

\* = Covariable

CUADRO 22. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL ÍNDICE DE REMOCIÓN PULMONAR;  
 TRANSFORMADO A LOGARITMOS; BASE 10 (INREMGLOG) DE RATONES  
 EXPOSTOS A P. HAEMOLYTICA (P) Y A S. AUREUS (S) EN AEROSOL.

Grupo	F.V.	G.L.	Tipo I S.C.	C M	PR > F	r <sup>2</sup>
P	modelo	27	69.12	2.56	0.1237	0.53
	*peso pulmón	1	7.49		0.0425	
	rép. lica	2	0.71		0.8108	
	hora	8	54.76		0.0017	
	Rep. Hora	16	6.15		0.9987	
	error	35	59.20	1.69		
	total corregido	62	128.33			
S	modelo	27	75.01	2.77	0.0048	0.66
	*peso pulmón	1	7.96		0.0104	
	rép. lica	2	1.73		0.4585	
	hora	8	57.29		0.0001	
	Rep. Hora	16	8.01		0.9498	
	error	35	38.00	1.085		
	total corregido	62	113.02			

\* = Covariable

CUADRO 23. COEFICIENTES DE CORRELACION ENTRE LAS MEDIAS DE LAS VARIABLES DE REMOCION BACTERIANA PULMONAR ESTUDIADAS CON RESPECTO A TIEMPO POSTINOCULACION (HORAS).

Grupo	I / J		COLGRPUL	COLLOG	COLRATON	INRET	INRETLOG	INREM	INREMLOG
P	horas	r =	-0.569	-0.733	-0.489	-0.567	-0.604	0.567	0.455
		*p =	0.008	0.000	0.009	0.003	0.000	0.002	0.029
S	horas	r =	-0.557	-0.933	-0.550	-0.562	-0.712	0.562	0.412
		*p =	0.003	0.000	0.002	0.002	0.000	0.001	0.035

\*p = prob > |R| bajo Ho:RHo=0

## B. Poblaciones celulares en los lavados bronquio-alveolares

El número de células nucleadas por ml de lavado bronquio-alveolar (NUCENUC) en los diferentes intervalos de tiempo después de exponer a los ratones a aerosoles fue proporcionalmente el mismo en las primeras dos horas en los tres grupos estudiados (fig. 7) (cuadro 24). Sin embargo, el número de células nucleadas mostró un incremento marcado a las cuatro horas postinoculación en el grupo de ratones inoculado con P. haemolytica. Este aumento permaneció hasta las 12 horas para luego descender progresivamente, aunque se presentó otro incremento moderado a las 150 horas para descender nuevamente a las 300 horas. El número de células nucleadas no mostró variaciones a través de los intervalos de tiempo en el grupo inoculado con S. aureus. En el grupo testigo expuesto a solución amortiguadora se presentó el mismo patrón de comportamiento celular que en el grupo P. haemolytica aunque en mínimo grado (apéndice 12) (fig. 15).

El número de células nucleadas por gramo de peso vivo (CEGRPV) mostró el mismo patrón de comportamiento a través del tiempo que el número no ajustado a peso vivo (NUCENUC) en los tres grupos experimentales (cuadro 25) (apéndice 13).

El número de células nucleadas por ml de lavado bronquio-alveolar analizado por medio de transformación logarítmica (NUCENLOG) fue diferente significativamente ( $p < 0.01$ ) entre el grupo de ratones inoculado con P. haemolytica y el de S. aureus, así como entre el grupo P. haemolytica y el grupo testigo. El número de células nucleadas no mostró diferencias ( $p > 0.05$ ) entre el grupo expuesto a S. aureus y el grupo testigo (fig. 8).

El efecto del peso vivo de los ratones analizado como covariable, en relación al número de células nucleadas por ml de lavado fue significativo ( $p < 0.01$ ) en el grupo inoculado con S. aureus, pero no significativo

( $p > 0.05$ ) en el grupo P. haemolytica y en el testigo (cuadro 26). El número de células nucleadas ajustado por gramo de peso vivo (CEGRPV) mostró un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de peso, sólo en el grupo P. haemolytica.

Mediante la transformación logarítmica del número de células nucleadas se observó que el volumen recuperado de lavado analizado como covariable influyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en los ratones inoculados con P. haemolytica, no así en los otros dos grupos (cuadro 26).

El número de células nucleadas fue significativamente diferente ( $p < 0.01$ ) en las réplicas experimentales del grupo P. haemolytica, pero no en el de S. aureus (cuadro 26). El efecto de réplica no se determinó en el grupo testigo por contar sólo con una réplica experimental. Las diferencias en las réplicas del grupo expuesto a P. haemolytica fueron entre la réplica 1 con respecto a la 2 y 3 (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ).

El número de células nucleadas se incrementó significativamente ( $p < 0.01$ ) en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación (horas) en los animales inoculados con P. haemolytica y en menor grado ( $p < 0.05$ ) en el grupo S. aureus. Este incremento no fue significativo ( $p > 0.05$ ) en el grupo testigo (cuadro 26). El efecto de la interacción réplica y tiempo (Rep\*Hora) en relación al número de células nucleadas no fue significativo ( $p > 0.05$ ) en los grupos expuestos a aerosoles bacterianos y no determinable en el grupo testigo.

Las diferencias en el número de células nucleadas a través de los diferentes intervalos de tiempo postinoculación en el grupo expuesto a P. haemolytica, se presentaron entre las 4,8,12,24 y 150 horas con respecto a las demás (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ). El número de células nucleadas en los ratones expuestos a S. aureus mostró menores variaciones entre los diferentes intervalos de tiempo (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ) y no siguió un



comportamiento entre grupos definidos de horas. En el grupo testigo las mayores diferencias se presentaron a las 4 y 150 horas postinoculación (apéndice 14).

El número de células nucleadas presentó una correlación positiva ( $r = 0.83$ ) con respecto a los intervalos de tiempo de las 0 a las 12 horas en el grupo de ratones inoculados con P. haemolytica. El coeficiente de correlación se tornó negativo ( $r = -0.28$ ) tomando en cuenta los intervalos de las 0 a 300 horas. La transformación logarítmica disminuyó ligeramente la correlación. En el grupo expuesto a S. aureus el grado de asociación del número de células nucleadas y tiempo fue negativo tanto de las 0 a 12 horas ( $r = -0.35$ ) como de las 0 a 300 horas ( $r = -0.07$ ). La transformación logarítmica modificó ligeramente los coeficientes de correlación pero fueron también negativos. Para el grupo testigo la correlación fue positiva ( $r = 0.61$ ) de las 0 a 12 horas y disminuyó de las 0 a 300 horas ( $r = 0.29$ ). La transformación logarítmica aumentó el grado de asociación (cuadro 38).

El número de células nucleadas a través del tiempo en el grupo de ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica mostró un comportamiento lineal y cuadrático significativo ( $p < 0.05$ ). En los otros dos grupos el comportamiento lineal y cuadrático no fue significativo ( $p > 0.05$ ).

El porcentaje de neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (CUDIFN) obtenido en las cuentas diferenciales de los ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica presentó un aumento marcado desde la primera hora después de la inoculación (fig. 9, 16). A partir de las cuatro horas el porcentaje de neutrófilos aumentó hasta llegar a más del 90%, posteriormente descendió progresivamente hasta llegar a menos del 10% a las 300 horas postinoculación (cuadro 27). El porcentaje de neutrófilos en el grupo inoculado con S. aureus, se mantuvo menor al 7% en los

diferentes intervalos de tiempo (fig. 9 ). El porcentaje de neutrófilos en el grupo testigo nunca fue mayor al 2% en ninguno de los intervalos de tiempo (apéndice 17).

El porcentaje de macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (CUDIFM) en los ratones expuestos a P. haemolytica descendió rápidamente en la primera hora después de la inoculación. El porcentaje llegó a menos del 10% a las cuatro horas y permaneció así hasta las 12 horas. A partir de estas horas el porcentaje de macrófagos ascendió progresivamente hasta llegar al 90% a las 300 horas (fig.10 ). En el grupo inoculado con S. aureus el porcentaje de macrófagos se mantuvo arriba del 93% a través del tiempo (cuadro 28) (fig. 17). En el grupo testigo inoculado con solución amortiguadora el porcentaje de macrófagos nunca descendió a menos del 98% (apéndice 16).

Los porcentajes de neutrófilos y macrófagos presentaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en el grupo de ratones inoculado con P. haemolytica con respecto al inoculado con S. aureus y con el testigo. Los porcentajes mostraron menores diferencias ( $p < 0.05$ ) entre el grupo S. aureus y el testigo.

El peso de los ratones de acuerdo al modelo estadístico utilizado presentó un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en los porcentajes de neutrófilos y macrófagos en el grupo P. haemolytica, pero no en el grupo S. aureus ni en el grupo testigo (cuadro 29).

Los porcentajes de neutrófilos y macrófagos no fueron influenciados significativamente ( $p > 0.05$ ) por el volumen de lavado bronquio-alveolar recuperado en ninguno de los grupos (cuadro 29).

Las cuentas diferenciales de neutrófilos y macrófagos en los ratones expuestos a S. aureus mostraron diferencias significativas

( $p < 0.05$ ) en las réplicas experimentales, esto no ocurrió en los ratones de P. haemolytica ( $p > 0.05$ ). El efecto de réplica no fue determinable en el grupo testigo por contar con sólo una réplica experimental (cuadro 29). Las diferencias entre las réplicas de S. aureus fueron entre la réplica 1 y 3 (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ).

Los intervalos de tiempo postinoculación influyeron significativamente ( $p < 0.01$ ) en los porcentajes de neutrófilos y macrófagos sólo en el grupo inoculado con P. haemolytica. En los otros dos grupos este efecto no resultó significativo ( $p > 0.05$ ) (cuadro 29).

La interacción réplica y tiempo (Rep\*Hora) no fue significativa ( $p > 0.05$ ) en los grupos expuestos a aerosoles bacterianos y no determinable en el grupo testigo (cuadro 29).

Las medias de los porcentajes de neutrófilos y macrófagos recobrados de los pulmones de los ratones expuestos a P. haemolytica fueron significativamente diferentes (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ) en los diversos intervalos de tiempo. Estas diferencias se presentaron en agrupaciones de horas, siendo mayores las diferencias en el grupo de las 2 a 48 horas con respecto a las demás. Los porcentajes de neutrófilos y macrófagos no mostraron diferencias en los intervalos de tiempo en el grupo S. aureus ni en el testigo (apéndice 17).

Las cuentas diferenciales de neutrófilos en relación al tiempo postinoculación en el grupo P. haemolytica presentaron una correlación positiva ( $r = 0.78$ ) de las 0 a las 12 horas. El coeficiente fue negativo ( $r = -0.48$ ) tomando en cuenta de las 0 a las 300 horas. En el grupo S. aureus los coeficientes de correlación del porcentaje de neutrófilos y tiempo fueron negativos tanto para el período de las 0 a 12 horas ( $r = -0.04$ ) como para el de las 0 a 300 horas ( $r = -0.21$ ). En el grupo

testigo la correlación para el primer y segundo período fueron también negativas ( $r = -0.42$  y  $-0.00$  respectivamente) (cuadro 38). Los coeficientes de correlación de los porcentajes de macrófagos y tiempo en los tres grupos corresponden a los mismos coeficientes de los porcentajes de neutrófilos pero con signo diferente (cuadro 38).

Los porcentajes de neutrófilos y macrófagos obtenidos en los lavados bronquio-alveolares a través del tiempo postinoculación presentaron un comportamiento lineal significativo ( $p < 0.01$ ) solo en el grupo de ratones inoculado con P. haemolytica. Los efectos cuadrático y cúbico no fueron significativos para ninguno de los grupos.

El número absoluto de neutrófilos (NUABSN) en los lavados bronquio-alveolares en los ratones inoculados con P. haemolytica fue más alto y con mayores variaciones a través de los intervalos de tiempo (figs. 11 y 16). El número absoluto de neutrófilos en los ratones expuestos a S. aureus y en el grupo testigo se mantuvo a través del tiempo sin fluctuaciones marcadas (cuadro 30) (apéndice 18).

Utilizando la transformación logarítmica del número absoluto de neutrófilos (NABNLOG) se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre el grupo P. haemolytica con respecto al grupo S. aureus y al testigo. Se presentaron también diferencias ( $p < 0.01$ ) entre el grupo S. aureus y el testigo (fig. 12).

El efecto del peso vivo y del volumen de lavado recuperado en relación al número absoluto de neutrófilos no fue significativo ( $p > 0.05$ ) en el modelo estadístico en ninguno de los grupos (cuadro 32).

El número absoluto de neutrófilos fue significativamente diferente ( $p < 0.01$ ) en los intervalos de tiempo postinoculación sólo en el grupo inoculado con P. haemolytica (cuadro 32). La interacción réplica

y tiempo (Rep\*Hora) no mostró significancia en los grupos expuestos a aerosoles bacterianos (cuadro 32).

Las medias del número absoluto de neutrófilos en el grupo P. haemolytica fueron significativamente diferentes (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ) sobre todo en la agrupación de las 4 a las 24 horas con respecto al resto de intervalos de tiempo. En el grupo S. aureus las diferencias en el número absoluto de neutrófilos fueron menores, presentándose solamente en las 12 y 150 horas. En el grupo testigo las diferencias fueron mayores a las 4 y 48 horas con respecto a las demás (apéndice 19).

El número absoluto de neutrófilos en el grupo P. haemolytica mostró una asociación positiva ( $r = 0.84$ ) con respecto al tiempo en las primeras 12 horas, pero cambiando a negativa ( $r = -0.35$ ) en el período completo de las 0 a 300 horas. La transformación logarítmica disminuyó ligeramente la asociación. En el grupo S. aureus el coeficiente de correlación fue negativo tanto para las primeras 12 horas ( $r = -0.14$ ) como para el período completo hasta las 300 horas ( $r = -0.45$ ). Su transformación logarítmica cambió el coeficiente a positivo en el primer período y mantuvo igual el del período completo. En el grupo testigo el grado de asociación fue negativo para el primer período, aumentando la correlación negativa con su transformación logarítmica. En el período completo el coeficiente de correlación fue negativo ( $-0.01$ ) pero positivo para su transformación logarítmica ( $0.28$ ) (cuadro 38).

El número absoluto de macrófagos (NUABSM) mostró pocas variaciones en los tres grupos a través de los diferentes intervalos de tiempo (fig. 13). Utilizando la transformación logarítmica del número absoluto de macrófagos (NABMLOG) se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo P. haemolytica y el S. aureus. Estas no se

observaron entre estos grupos y el testigo (fig. 14 ) (apéndice 20).

El efecto ejercido por el peso vivo en el número absoluto de macrófagos resultó significativo ( $p < 0.01$ ) sólo en el grupo expuesto a S. aureus (cuadro 33).

El volumen recuperado de lavado influyó significativamente ( $p < 0.01$ ) en el grupo inoculado con P. haemolytica, pero no en los otros grupos (cuadro 33).

El número absoluto de macrófagos fue significativamente diferente ( $p < 0.01$ ) en las réplicas experimentales de los ratones expuestos a P. haemolytica, principalmente entre la réplica 1 con respecto a las otras (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ). En el grupo S. aureus no se encontraron diferencias entre las réplicas ( $p > 0.05$ ).

El número absoluto de macrófagos en los intervalos de tiempo fue significativamente diferente ( $p < 0.01$ ) tanto en los ratones del grupo P. haemolytica como en los del grupo S. aureus ( $p < 0.05$ ). Estas diferencias no ocurrieron en el grupo testigo ( $p > 0.05$ ) (cuadro 33).

La interacción réplica y tiempo (Rep\*Hora) ejerció efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sólo en el grupo P. haemolytica (cuadro 33).

La comparación de las medias del número absoluto de macrófagos en los intervalos de tiempo en el grupo P. haemolytica mostró diferencias significativas (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ) sobre todo en la agrupación de las 2 a las 12 horas con respecto al período de las 48 a 150 horas. En el grupo S. aureus las diferencias se presentaron en varios intervalos pero sin una agrupación definida de horas. En el grupo testigo las mayores diferencias fueron entre las 2,4 y 150 horas (apéndice 21).

El número absoluto de macrófagos en el grupo P. haemolytica mostró una correlación negativa ( $r = -0.53$ ) con respecto a las primeras

12 horas postinoculación, pero positiva tomando en cuenta de las 0 a las 300 horas ( $r = 0.40$ ); su transformación logarítmica aumentó el grado de asociación. En el grupo S. aureus el coeficiente de correlación fue negativo para ambos períodos, manteniéndose en forma negativa con la transformación logarítmica. En el grupo testigo el grado de asociación fue positivo para los dos períodos y aumentó ligeramente con la transformación logarítmica (cuadro 38).

El número absoluto de macrófagos a través del tiempo mostró un comportamiento lineal y cuadrático significativo ( $p < 0.01$ ) sólo en el grupo de ratones expuestos a P. haemolytica.

El índice generado al dividir el porcentaje de neutrófilos entre el de macrófagos (INM) mostró diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre el grupo expuesto a P. haemolytica en relación al grupo S. aureus y al testigo. Este índice mostró también diferencias ( $p < 0.05$ ) entre el grupo S. aureus y el testigo (cuadro 34) (apéndice 22).

El índice de neutrófilos/macrófagos no fue influenciado significativamente ( $p > 0.05$ ) por el peso vivo ni por el volumen de lavado recuperado en ninguno de los grupos (cuadro 36).

El índice de neutrófilos/macrófagos fue diferente significativamente ( $p < 0.05$ ) en las réplicas de los ratones expuestos a S. aureus, pero no en los otros grupos (cuadro 36). Las diferencias se manifestaron entre la réplica 1 y 3 (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ).

El índice de neutrófilos/macrófagos en el grupo P. haemolytica fue significativamente diferente ( $p < 0.01$ ) en los intervalos de tiempo postinoculación (cuadro 36). Las diferencias se presentaron entre las 8 y 12 horas con respecto a las demás (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ) (apéndice 24). Estas diferencias no se presentaron entre los otros grupos.

El efecto de la interacción réplica y tiempo (Rep\*Hora) no fue significativo ( $p > 0.05$ ) para los dos grupos expuestos a aerosoles bacterianos (cuadro 36).

La asociación del índice de neutrófilos/macrófagos en relación al tiempo fue positiva ( $r = 0.95$ ) en las primeras 12 horas en el grupo P. haemolytica. El coeficiente del periodo completo hasta las 300 horas fue negativo ( $r = -0.33$ ) (cuadro 38). Los coeficientes de correlación fueron negativos y no variaron marcadamente en el grupo S. aureus para ambos periodos. En el grupo testigo la asociación fue negativa en las primeras 12 horas y aumentó ligeramente en el periodo completo (cuadro 38).

El índice de neutrófilos/macrófagos a través del tiempo no mostró un efecto lineal, cuadrático y cúbico significativo ( $p > 0.05$ ).

El índice del porcentaje de macrófagos entre el de neutrófilos (IMI) fue diferente significativamente ( $p < 0.01$ ) tanto en el grupo inoculado con P. haemolytica con respecto al grupo S. aureus y al testigo, como entre el grupo S. aureus y el testigo (cuadro 35) (apéndice 23).

El peso vivo y el volumen de lavado recuperado no ejercieron un efecto significativo ( $p > 0.05$ ) en el índice de macrófagos/neutrófilos (cuadro 37).

El índice de macrófagos/neutrófilos mostró diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en las réplicas del grupo S. aureus únicamente (cuadro 37). Estas diferencias se presentaron entre la réplica 3 y las demás.

Los intervalos de tiempo y la interacción réplica y tiempo (Rep\*Hora) no influyeron significativamente ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los grupos (cuadro 37).

La comparación de las medias del índice de macrófagos/neutrófilos



a través del tiempo mostró diferencias (Durkan,  $\alpha = 0.05$ ) solamente en el grupo P. haemolytica y estas se presentaron principalmente entre las primeras 24 horas con respecto a las demás (apéndice 24).

La asociación del índice de macrófagos/neutrófilos y tiempo fue negativo para las primeras 12 horas tanto en el grupo P. haemolytica como para el grupo S. aureus y cambió a positiva en el período completo en ambos grupos. En el grupo testigo el coeficiente fue positivo para el primer período y ascendió en el período comprendido de las 0 a las 300 horas (cuadro 38).

El índice de macrófagos/neutrófilos a través del tiempo no mostró comportamiento lineal, cuadrático y cúbico significativo ( $p > 0.05$ ).

El peso vivo promedio de los ratones utilizados en los lavados bronquio-alveolares fue de 25.10 g, presentándose diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre el peso vivo de los tres grupos experimentales (apéndice 25).

El volumen recuperado total (VOL.RECT) obtenido en los tres lavados bronquio-alveolares en cada ratón tuvo una media de 2.29 ml para la población total. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los volúmenes recuperados totales en los tres grupos de ratones (apéndice 25).

El volumen de lavado bronquio-alveolar promedio (VOLRECML) de los tres lavados por pulmón tuvo una media de 0.76 ml en el total de ratones; no encontrándose diferencias significativas en los tres grupos (apéndice 25).

El porcentaje total de volumen recuperado (PTVOLREC) por ratón fue en promedio el 76.59% en la población total; no observándose diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el porcentaje total de los tres grupos de ratones (apéndice 26).

Los porcentajes de volúmenes recuperados individuales (PVOLREI<sub>1,2,3</sub>)

en cada uno de los tres lavados bronquio-alveolares realizados por ratón tuvieron un promedio para la población total de 71.37% en el primer lavado, 79.51% en el segundo lavado y 78.90% en el tercer lavado. Los porcentajes de volúmenes recuperados individuales no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los grupos estudiados (apéndice 26).

El índice o relación del volumen total recuperado transformado a  $\mu\text{l}$  con respecto al peso vivo de los ratones tuvo una media de 30.91 en el total de ratones; encontrándose diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre los grupos (apéndice 25).

La correlación existente entre el volumen de lavado recuperado con respecto al peso vivo de los ratones fue positiva tanto para el grupo P. haemolytica ( $r = 0.18$ ), como para el grupo S. aureus ( $r = 0.55$ ) y para el testigo ( $r = 0.27$ ). La asociación entre el volumen de lavado recuperado y tiempo (horas) fue positiva para el grupo P. haemolytica ( $r = 0.10$ ) y para el grupo S. aureus ( $r = 0.10$ ), pero negativa para el testigo ( $r = -0.18$ ).

El número de células nucleadas totales, de neutrófilos y de macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar presentó una correlación negativa con respecto al número de bacterias retenidas en el pulmón y positiva en relación a las bacterias eliminadas en el grupo de ratones inoculados con P. haemolytica (cuadro 39). En el grupo expuesto a S. aureus la correlación entre la respuesta celular y las bacterias retenidas fue positiva, pero negativa en relación a las bacterias eliminadas (cuadro 39).

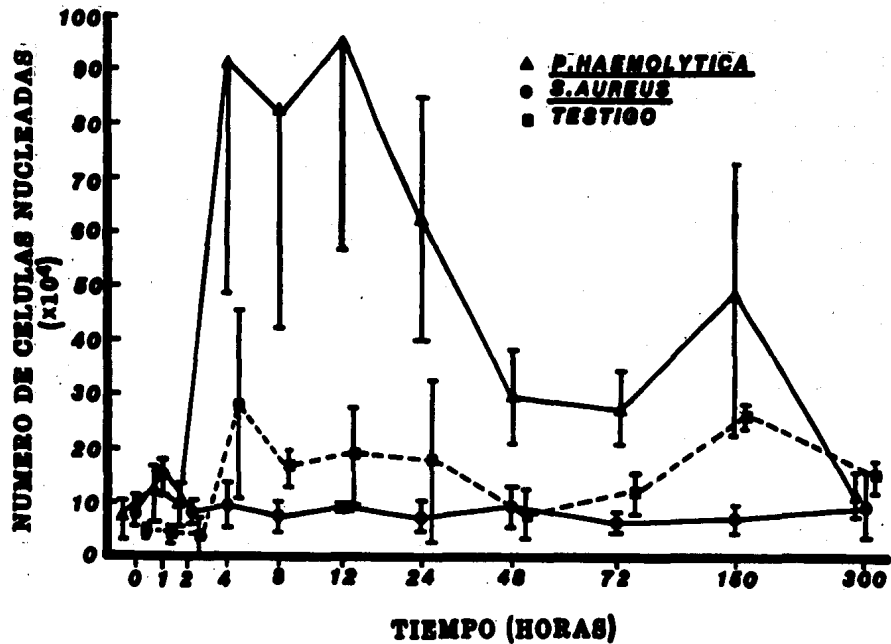


Fig.7 . Número de células nucleadas por ml de lavado bronquio-alveolar (NUCENUC) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica, de S. aureus y testigos (media  $\pm$  error estándar).

CUADRO 24. NUMERO DE CELULAS NUCLEADAS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (NUCENUC) DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	N		Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
			0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	63	media	$7.2 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$9.2 \times 10^4$	$9.1 \times 10^5$	$8.2 \times 10^5$	$9.4 \times 10^5$	$6.2 \times 10^5$	$2.9 \times 10^5$	$2.7 \times 10^5$	$4.8 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$
		± D.E.	$6.1 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$6.9 \times 10^4$	$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$9.1 \times 10^5$	$5.1 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$5.4 \times 10^5$	$5.7 \times 10^4$
S	66	media	$8.6 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$	$8.7 \times 10^4$	$9.7 \times 10^4$	$7.4 \times 10^4$	$9.3 \times 10^4$	$7.8 \times 10^4$	$9.0 \times 10^4$	$6.0 \times 10^4$	$7.1 \times 10^4$	$9.6 \times 10^4$
		± D.E.	$5.4 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$	$3.0 \times 10^4$	$7.1 \times 10^4$	$6.3 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$	$4.4 \times 10^4$	$6.0 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	$5.1 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$
T	22	media	$4.8 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$	$4.0 \times 10^4$	$2.8 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$8.3 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$
		± D.E.	$0.7 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$3.7 \times 10^4$	$1.6 \times 10^5$	$4.0 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$5.1 \times 10^4$	$4.4 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$

D.E. = Desviación estándar

106

CUADRO 25. NUMERO DE CELULAS NUCLEADAS POR GRAMO DE PESO VIVO (CEGRPV) OBTENIDO DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P) , S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	N		Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
			0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	63	media	$2.8 \times 10^3$	$4.3 \times 10^3$	$3.8 \times 10^3$	$3.5 \times 10^4$	$3.0 \times 10^4$	$4.4 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$4.1 \times 10^3$
		± D.E.	$2.2 \times 10^3$	$4.8 \times 10^3$	$2.5 \times 10^3$	$4.1 \times 10^4$	$3.8 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$6.5 \times 10^3$	$6.5 \times 10^3$	$1.9 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$
S	66	media	$3.4 \times 10^3$	$6.5 \times 10^3$	$3.5 \times 10^3$	$4.5 \times 10^3$	$3.1 \times 10^3$	$3.9 \times 10^3$	$3.2 \times 10^3$	$3.6 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	$2.7 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$
		± D.E.	$1.8 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3$	$8.2 \times 10^2$	$3.3 \times 10^3$	$2.5 \times 10^3$	$6.1 \times 10^2$	$1.9 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$	$8.5 \times 10^2$	$2.0 \times 10^3$	$3.2 \times 10^3$
T	22	media	$1.8 \times 10^3$	$1.7 \times 10^3$	$1.7 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$	$7.6 \times 10^3$	$7.5 \times 10^3$	$7.4 \times 10^3$	$3.6 \times 10^3$	$5.2 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	$5.8 \times 10^3$
		± D.E.	$9.2 \times 10^1$	$4.0 \times 10^2$	$1.6 \times 10^3$	$8.2 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$4.1 \times 10^3$	$8.0 \times 10^3$	$2.1 \times 10^3$	$1.9 \times 10^3$	$1.2 \times 10^2$	$6.0 \times 10^2$

D.E. = Desviación estándar

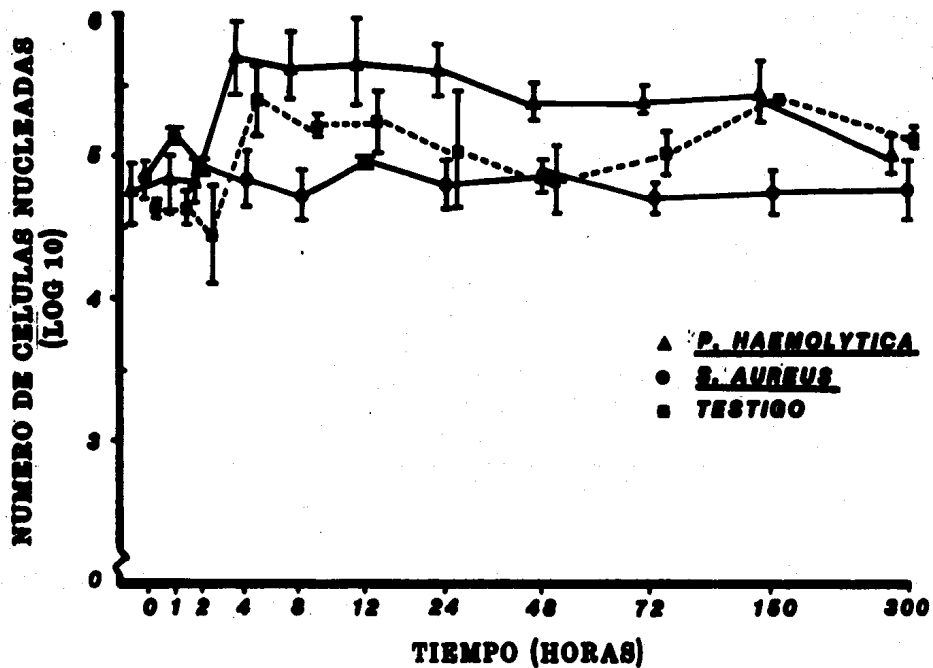


Fig. 8 . Número de células nucleadas por ml de lavado bronquio-alveolar (NUCENLOG) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica, de S. aureus y testigos (media  $\pm$  error estándar).

CUADRO 26. ANALISIS DE VARIANZA DEL NUMERO DE CELULAS NUCLEADAS TRANSFORMADO A LOGARITMOS (NUCENLOG) DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T).

Grupo	Fuente de variación	G.L.	Tipo I.S.C.	CM	PR > F	r <sup>2</sup>
P	modelo	33	14.729	0.446	0.0001	0.85
	*peso	1	0.023		0.6119	
	*volumen	1	0.404		0.0408	
	réplica	2	2.677		0.0001	
	hora	10	8.999		0.0001	
	Rep*Hora	19	2.624		0.1348	
	error	29	2.558	0.088		
	total corregido	62	17.288			
S	modelo	34	3.885	0.114	0.0268	0.68
	*peso	1	0.827		0.0006	
	*volumen	1	0.000		0.9740	
	réplica	2	0.248		0.1304	
	hora	10	1.345		0.0329	
	Rep*Hora	20	1.464		0.2601	
	error	31	1.768	0.057		
	total corregido	65	5.654			
T	modelo	12	2.145	0.178	0.1554	0.72
	*peso	1	0.000		0.9713	
	*volumen	1	0.000		0.9977	
	réplica	0	0.000		ND	
	hora	10	2.145		0.1042	
	Rep*Hora	0	0.000		ND	
	error	9	0.812	0.090		
	total corregido	21	2.957			

ND = No determinable

\* = Covariable

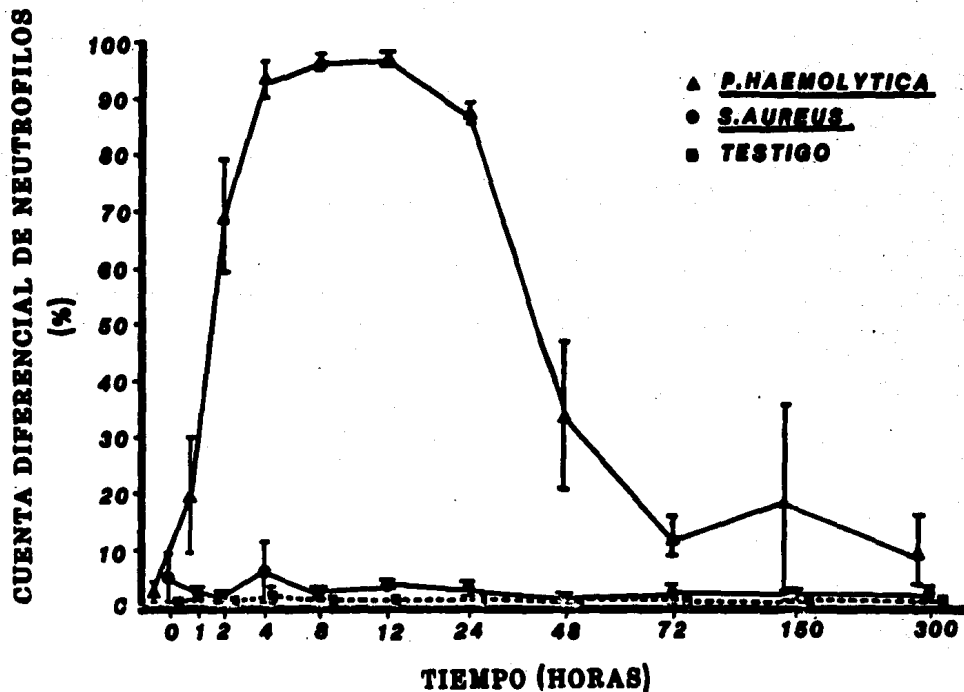


Fig. 9 . Porcentaje de neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (CUDIFN) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica, de S. aureus y testigos (media  $\pm$  error estándar).

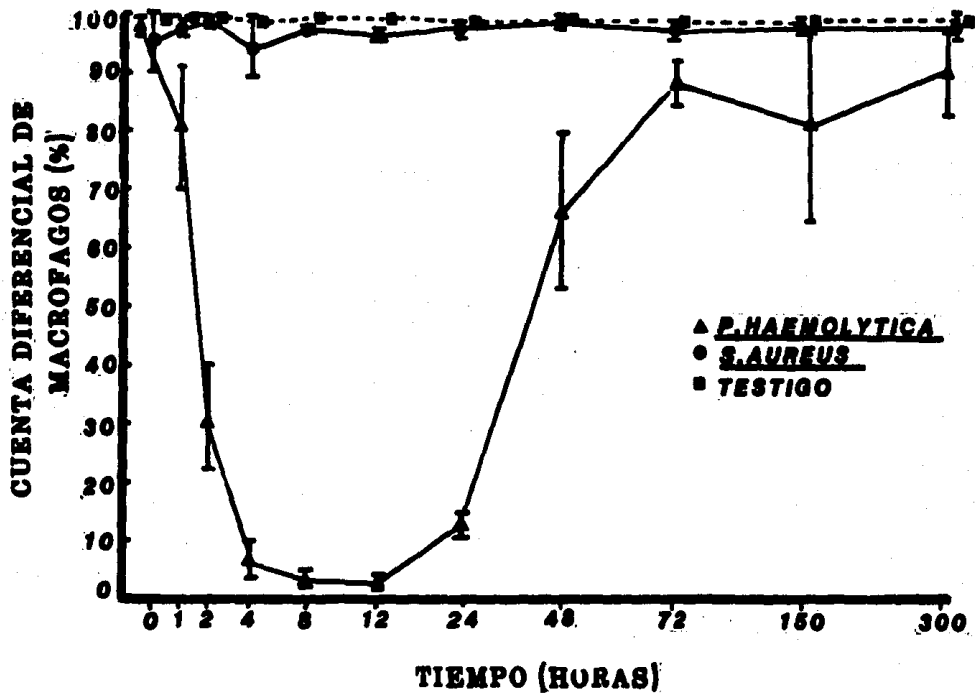


Fig. 10 . Porcentaje de macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (CUDIFM) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica, de S. aureus y testigos (media  $\pm$  error estándar).



CUADRO 27. PORCENTAJE DE NEUTROFILOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (CUDIFN) OBTENIDO DE RATONES EXPUESTOS A AEROSOLES DE *P. HAEMOLYTICA* (GRUPO P), *S. AUREUS* (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	N		Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
			0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	63	media	2.00	19.77	69.02	93.22	96.44	96.88	87.55	33.81	11.48	19.73	9.58
		± D.E.	2.97	27.01	22.40	4.10	2.78	2.28	2.83	30.77	8.03	37.85	11.85
S	66	media	4.93	2.08	1.37	6.00	2.04	3.61	2.50	1.20	2.20	1.56	2.70
		± D.E.	9.40	2.04	1.90	8.97	1.55	2.64	2.40	1.20	4.31	1.79	2.91
T	22	media	0.62	0.50	0.25	1.62	0	0	1.00	0	0.25	0.62	0.54
		± D.E.	0.53	0.70	0.35	1.50	0	0	0.70	0	0.35	0.88	0.41

D.E. = Desviación estándar

111

CUADRO 28. PORCENTAJE DE MACROFAGOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (CUDIFM) OBTENIDO DE RATONES EXPUESTOS A AEROSOLES DE *P. HAEMOLYTICA* (GRUPO P), *S. AUREUS* (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	N		Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
			0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	63	media	97.99	80.22	30.97	6.77	3.55	3.11	12.44	66.19	88.51	80.28	90.41
		± D.E.	2.97	27.01	22.40	4.10	2.78	2.28	2.83	30.77	8.03	37.85	11.85
S	66	media	95.07	97.91	98.62	94.00	97.95	96.39	97.50	98.79	97.79	98.44	97.29
		± D.E.	9.40	2.04	1.90	8.97	1.55	2.64	2.40	1.20	4.31	1.79	2.91
T	22	media	99.38	99.50	99.75	98.38	100.0	100.0	99.0	100.0	99.75	99.38	99.46
		± D.E.	0.53	0.70	0.35	1.59	0	0	0.70	0	0.35	0.88	0.41

D.E. = Desviación estándar

CUADRO 29. ANALISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE NEUTROFILOS (CUDIFN) Y DE MACROFAGOS (CUDIFM) DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOL DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T).

Grupo	Fuente de variación	G.L.	Tipo I. S.C.	CM	PR > F	r <sup>2</sup>
P	modelo	33	95840.2	2904.2	0.0001	0.90
	*peso	1	1919.0		0.0294	
	*volumen	1	3.5		0.9224	
	réplica	2	512.5		0.5040	
	hora	10	86862.7		0.0001	
	Rep*Hora	19	6542.3		0.5441	
	error	29	10593.9	365.3		
	total corregido	62	106434.2			
S	modelo	34	795.9	23.4	0.1028	0.63
	*peso	1	10.5		0.4067	
	*volumen	1	0.0		0.9921	
	réplica	2	154.9		0.0112	
	hora	10	132.8		0.5501	
	Rep*Hora	20	497.5		0.0966	
	error	31	461.1	14.8		
	total corregido	65	1257.1			
T	modelo	12	4.9	0.41	0.6856	0.49
	*peso	1	0.01		0.8872	
	*volumen	1	0.15		0.6100	
	réplica	0	0.0		ND	
	hora	10	4.7		0.5876	
	Rep*Hora	0	0.0		ND	
	error	9	4.9	0.54		
	total corregido	21	9.8			

ND = No determinable

\* = Covariable

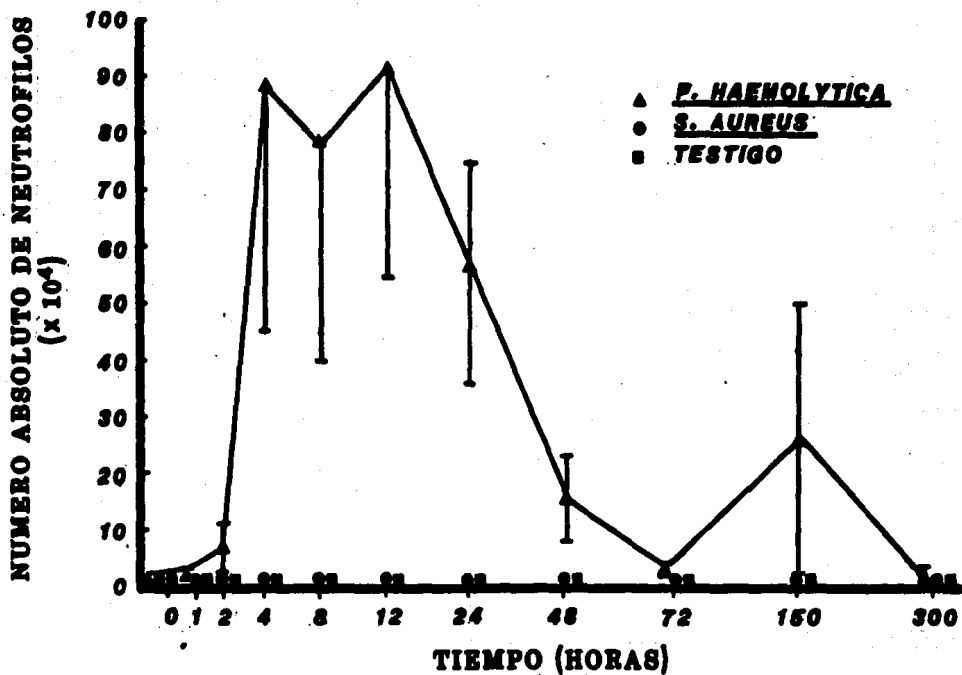


Fig. 11. Número absoluto de neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (NUABS) en ratones inoculados con aerosoles de *P. haemolytica*, de *S. aureus* y testigos (media  $\pm$  error estándar).

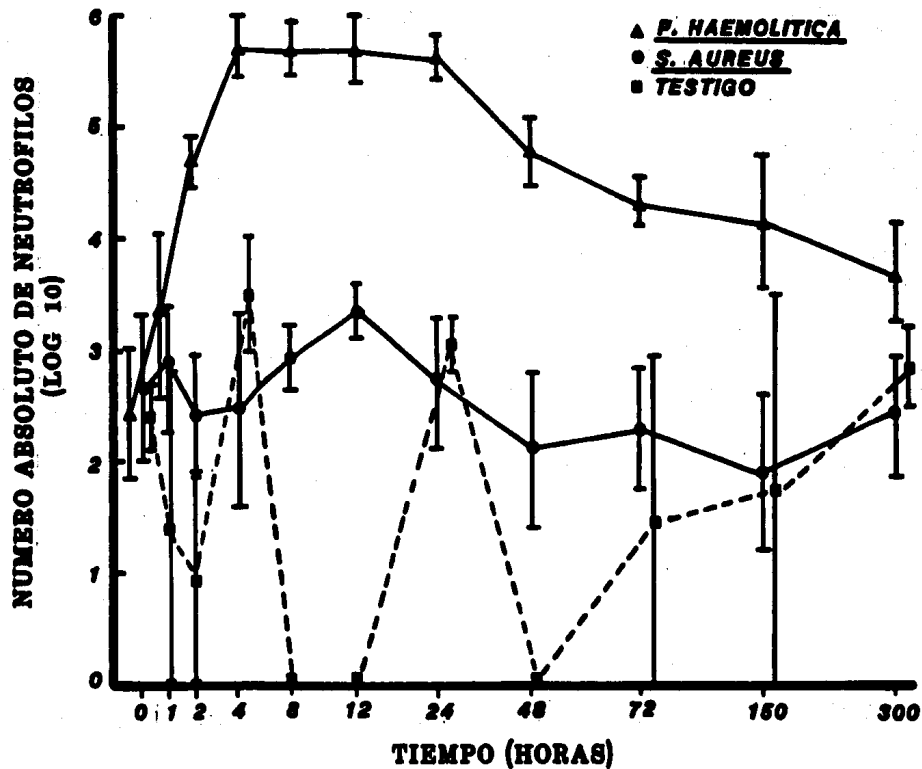


Fig. 12 . Número absoluto de neutrófilos por ml de lavado bronquio-alveolar (NABNLOG) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica, de S. aureus y testigos (media  $\pm$  error estándar).

CUADRO 30. NUMERO ABSOLUTO DE NEUTROFILOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (NUABS<sub>N</sub>) OBTENIDO DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE *P. HAEMOLYTICA* (GRUPO P), *S. AUREUS* (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	N		Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
			0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	63	media	$2.8 \times 10^3$	$1.2 \times 10^4$	$6.9 \times 10^4$	$8.8 \times 10^5$	$7.8 \times 10^5$	$9.1 \times 10^5$	$5.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$2.9 \times 10^4$	$2.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$
		± D.E.	$5.8 \times 10^3$	$1.4 \times 10^4$	$6.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^6$	$9.5 \times 10^5$	$8.8 \times 10^5$	$4.6 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$2.8 \times 10^4$	$5.5 \times 10^5$	$2.4 \times 10^4$
S	66	media	$4.0 \times 10^1$	$3.8 \times 10^3$	$1.4 \times 10^3$	$8.4 \times 10^3$	$1.8 \times 10^3$	$3.2 \times 10^3$	$2.6 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	$9.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$	$9.1 \times 10^2$
		± D.E.	$6.5 \times 10^1$	$4.1 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$1.4 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	$3.1 \times 10^3$	$9.0 \times 10^2$	$1.5 \times 10^3$	$1.9 \times 10^3$	$8.3 \times 10^2$
T	22	media	$2.8 \times 10^2$	$2.8 \times 10^2$	$3.3 \times 10^1$	$5.9 \times 10^3$	0	0	$1.1 \times 10^3$	0	$3.8 \times 10^2$	$1.5 \times 10^3$	$8.8 \times 10^2$
		± D.E.	$2.1 \times 10^2$	$4.0 \times 10^2$	$4.7 \times 10^1$	$7.2 \times 10^3$	0	0	$6.5 \times 10^2$	0	$5.4 \times 10^2$	$2.2 \times 10^3$	$7.8 \times 10^2$

D.E. = Desviación estándar

CUADRO 31. NUMERO ABSOLUTO DE MACROFAGOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (NUABSM) OBTENIDO DE RATONES EXPUESTOS A AEROSOLES DE *P. HAEMOLYTICA* (GRUPO P), *S. AUREUS* (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	N		Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
			0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	63	media	$6.9 \times 10^4$	$9.7 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$	$3.6 \times 10^4$	$3.3 \times 10^4$	$3.4 \times 10^4$	$6.8 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$9.5 \times 10^4$
		± D.E.	$5.5 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$	$5.4 \times 10^4$	$3.7 \times 10^4$	$4.7 \times 10^4$	$3.4 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$	$3.3 \times 10^4$
S	66	media	$8.2 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5$	$8.5 \times 10^4$	$8.9 \times 10^4$	$7.2 \times 10^4$	$9.0 \times 10^4$	$7.6 \times 10^4$	$8.9 \times 10^4$	$5.9 \times 10^4$	$7.0 \times 10^4$	$9.5 \times 10^4$
		± D.E.	$5.3 \times 10^4$	$4.7 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$	$6.4 \times 10^4$	$6.1 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$	$4.1 \times 10^4$	$6.0 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$
T	22	media	$4.8 \times 10^4$	$4.4 \times 10^4$	$3.9 \times 10^4$	$2.7 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$8.3 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$
		± D.E.	$7.2 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$3.7 \times 10^4$	$1.6 \times 10^5$	$4.0 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$5.1 \times 10^4$	$4.4 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$

D.E. = Desviación estándar

CUADRO 32. ANALISIS DE VARIANZA DEL NUMERO ABSOLUTO DE NEUTROFILOS TRANSFORMADO A LOGARITMOS (NABNLOG) DE RATONES EXPUESTOS A AEROSOL DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T).

Grupo	Fuente de variación	G.L.	Tipo I.S.C.	CM	PR > F	r <sup>2</sup>
P	modelo	33	79.95	2.42	0.0003	0.80
	*peso	1	0.31		0.4937	
	*volumen	1	1.24		0.1810	
	réplica	2	1.99		0.2390	
	hora	10	66.82		0.0001	
	Rep*Hora	19	9.56		0.7329	
	error	29	19.2	0.66		
	total corregido	62	99.2			
S	modelo	34	55.78	1.64	0.0028	0.75
	*peso	1	0.68		0.2926	
	*volumen	1	1.02		0.1989	
	réplica	2	29.86		0.0001	
	hora	10	8.42		0.2215	
	Rep*Hora	20	15.78		0.2374	
	error	31	18.51	0.59		
	total corregido	65	74.30			
T	modelo	12	14.87	1.23	0.3189	0.64
	*peso	1	1.04		0.3079	
	*volumen	1	0.85		0.3543	
	réplica	0	0.00		ND	
	hora	10	12.97		0.2955	
	Rep*Hora	0	0.00		ND	
	error	9	8.07	0.89		
	total corregido	21	22.95			

ND = No determinable  
 \* = Covariable

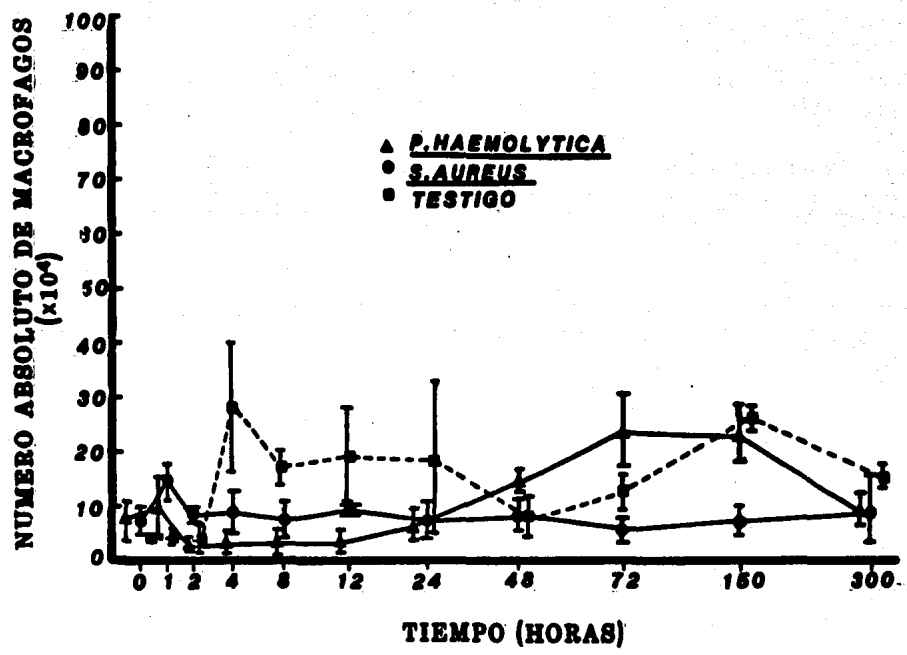


Fig.13. Número absoluto de macrófagos por ml de lavado bronquio-alveolar (NUABSM) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica, de S. aureus y testigos (media ± error estándar).

NUMERO ABSOLUTO DE MACROFAGOS  
(LOG 10)

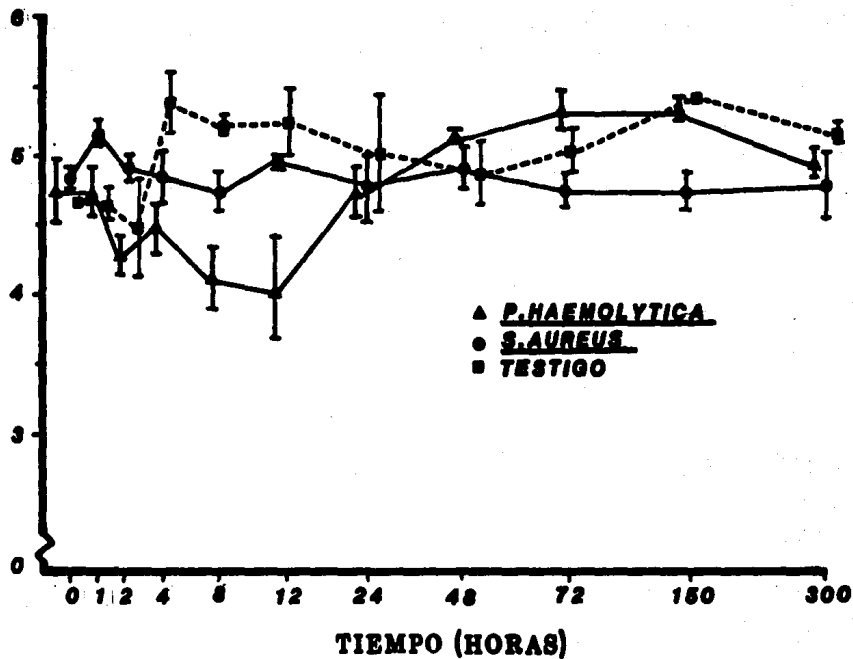


Fig. 14. Número absoluto de macrófagos por ml de lavado bronquifo-alveolar (NABMLOG) en ratones inoculados con aerosoles de P. haemolytica, de S. aureus y testigos (media  $\pm$  error estándar).



CUADRO 33. ANALISIS DE VARIANZA DEL NUMERO ABSOLUTO DE MACROFAGOS TRANSFORMADO A LOGARITMOS (NABMLOG) DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T).

Grupo	Fuente de variación	G.L.	Tipo I. S.C.	CM	PR > F	r <sup>2</sup>
P	modelo	33	18.01	0.54	0.0001	0.85
	*peso	1	0.28		0.1097	
	*volumen	1	1.35		0.0011	
	réplica	2	3.80		0.0001	
	hora	10	8.58		0.0001	
	Rep*Hora	19	3.98		0.0420	
	error	29	3.00	0.10		
	total corregido	62	21.01			
S	modelo	34	3.81	0.11	0.0324	0.68
	*peso	1	0.85		0.0006	
	*volumen	1	0.00		0.9715	
	réplica	2	0.19		0.2020	
	hora	10	1.31		0.0385	
	Rep*Hora	20	1.44		0.2807	
	error	31	1.78	0.05		
	total corregido	65	5.59			
T	modelo	12	2.13	0.17	0.1564	0.72
	*peso	1	0.00		0.9724	
	*volumen	1	0.00		0.9933	
	réplica	0	0.00		ND	
	hora	10	2.13		0.1049	
	Rep*Hora	0	0.00		ND	
	error	9	0.81	0.09		
	total corregido	21	2.94			

ND = No determinable

\* = Covariable

CUADRO 34. INDICE DE NEUTROFILOS ENTRE MACROFAGOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (INM) DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE *P. HAEMOLYTICA* (GRUPO P), *S. AUREUS* (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	N		Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
			0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	63	media	0.024	0.478	3.751	17.920	45.850	46.380	7.343	1.121	0.135	1.363	0.124
		± D.E.	0.030	0.836	2.630	10.280	31.154	30.444	1.836	1.668	0.105	2.978	0.165
S	66	media	0.066	0.024	0.018	0.078	0.022	0.040	0.029	0.015	0.028	0.022	0.033
		± D.E.	0.122	0.018	0.017	0.114	0.016	0.027	0.024	0.008	0.046	0.017	0.027
T	22	media	0.010	0.010	0.010	0.020	0.010	0.010	0.015	0.010	0.010	0.010	0.010
		± D.E.	0.000	0.000	0.000	0.014	0	0	0.007	0	0.000	0.000	0.000

D.E. = Desviación estándar

CUADRO 35. INDICE DE MACROFAGOS ENTRE NEUTROFILOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (IMN) DE RATONES EXPUESTOS A AEROSOLES DE *P. HAEMOLYTICA* (GRUPO P), *S. AUREUS* (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	N		Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
			0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	63	media	76.250	28.060	0.628	0.076	0.037	0.033	0.143	4.815	20.066	38.229	34.745
		± D.E.	37.550	37.210	0.680	0.047	0.033	0.025	0.036	4.729	22.445	38.181	43.709
S	66	media	63.916	58.333	77.666	57.279	66.221	39.305	54.323	79.888	84.181	66.721	59.213
		± D.E.	41.822	45.173	35.132	47.439	37.143	32.391	36.776	30.839	37.280	37.673	44.445
T	22	media	99.500	99.500	99.500	65.665	100	100	74.000	100	99.500	99.500	99.500
		± D.E.	0.707	0.707	0.707	47.142	0	0	35.355	0	0.707	0.707	0.707

D.E. = Desviación estándar

CUADRO 36. ANALISIS DE VARIANZA DEL INDICE DE NEUTROFILOS ENTRE MACROFAGOS POR ML. DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (INM) DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLE DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T).

Grupo	Fuente de variación	G.L.	Tipo I. S.C.	CM	PR > F	r <sup>2</sup>
P	modelo	33	24301.9	736.4	0.0019	0.77
	*peso	1	576.5		0.1380	
	*volumen	1	941.3		0.0610	
	réplica	2	1006.8		0.1494	
	hora	10	17266.1		0.0001	
	Rep*Hora	19	4511.0		0.5288	
	error	29	7187.0	247.8		
	total corregido	62	31489.0			
S	modelo	34	0.12	0.003	0.1304	0.62
	*peso	1	0.00		0.4231	
	*volumen	1	0.00		0.9421	
	réplica	2	0.02		0.0265	
	hora	10	0.02		0.5261	
	Rep*Hora	20	0.08		0.1054	
	error	31	0.07	0.002		
	total corregido	65	0.20			
T	modelo	12	0.00	0.00	0.6866	0.49
	*peso	1	0.00		0.9022	
	*volumen	1	0.00		0.6129	
	réplica	0	0.00		ND	
	hora	10	0.00		0.5879	
	Rep*Hora	0	0.00		ND	
	error	9	0.00	0.00		
	total corregido	21	0.00			

ND = No determinable

\* = Covariable

CUADRO 37. ANALISIS DE VARIANZA DEL INDICE DE MACROFAGOS ENTRE NEUTROFILOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (IMN) DE RATONES EXPUESTOS A AEROSLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P) S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T).

Grupo	Fuente de variación	G.L.	Tipo I. S.C.	CM	PR > F	r <sup>2</sup>
P	modelo	33	1052645.9	31898.3	0.4749	0.53
	*peso	1	5289.3		0.6830	
	*volumen	1	24955.1		0.3777	
	réplica	2	124723.2		0.1528	
	hora	10	396512.1		0.2891	
	Rep*Hora	19	501165.9		0.6398	
	error	29	901564.8	31088.4		
	total corregido	62	1954210.8			
S	modelo	34	5975058.1	175737.0	0.0192	0.69
	*peso	1	2903.2		0.8531	
	*volumen	1	269055.9		0.0820	
	réplica	2	3244496.8		0.0001	
	hora	10	804084.9		0.4911	
	Rep*Hora	20	1654517.0		0.4944	
	error	31	2580675.2	83247.5		
	total corregido	65	8555733.3			
T	modelo	12	2330295.3	194191.2	0.4458	0.59
	*peso	1	218291.8		0.2924	
	*volumen	1	171208.1		0.3479	
	réplica	0	0.0		ND	
	hora	10	1940795.2		0.4415	
	Rep*Hora	0	0.0		ND	
	error	9	1571141.7	174571.3		
	total corregido	21	3901437.0			

ND = No determinable

\* = Covariable

CUADRO 38. COEFICIENTES DE CORRELACION ENTRE LAS VARIABLES OBTENIDAS DE LOS LAVADOS BRONQUIO-ALVEOLARES CON RESPECTO AL TIEMPO POSTINOCULACION (HORAS).

Grupo	I / J	NUCENUC	NUCENLOG	CEGRPV	CUDIFN	CUDIFM	NUABSN	NABNLOG	NUABSM	NABMLOG	INM	IMN
P	0-12 H	r = 0.836	0.825	0.890	0.788	-0.788	0.840	0.777	-0.532	-0.859	0.959	-0.618
	0-300	r = -0.288	-0.123	-0.300	-0.483	0.483	-0.356	-0.259	0.408	0.516	-0.332	0.283
		*p = 0.378	0.820	0.357	0.010	0.010	0.214	0.214	0.017	0.011	0.108	0.671
S	0-12 H	r = -0.357	-0.273	-0.318	-0.040	0.040	-0.149	0.764	-0.345	-0.242	-0.149	-0.639
	0-300	r = -0.074	-0.398	-0.338	-0.210	0.210	-0.456	-0.442	-0.104	-0.389	-0.190	0.041
		*p = 0.680	0.238	0.268	0.626	0.626	0.176	0.490	0.766	0.248	0.585	0.602
T	0-12 H	r = 0.614	0.709	0.602	-0.425	0.425	-0.084	-0.614	0.628	0.715	-0.052	0.069
	0-300	r = 0.298	0.360	0.148	-0.000	0.000	-0.018	0.288	0.233	0.357	-0.229	0.225
		*p = 0.372	0.214	0.603	0.943	0.943	0.964	0.403	0.366	0.214	0.951	0.637

\*p = prob > |R| bajo Ho: Rho=0

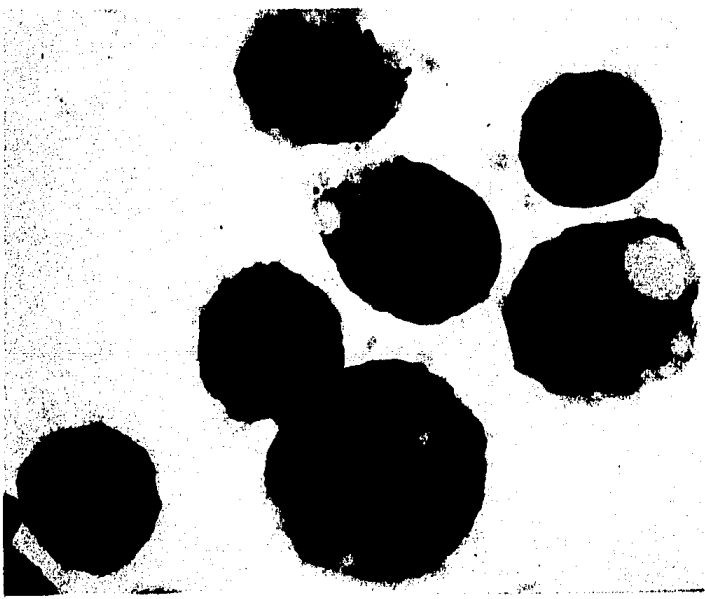
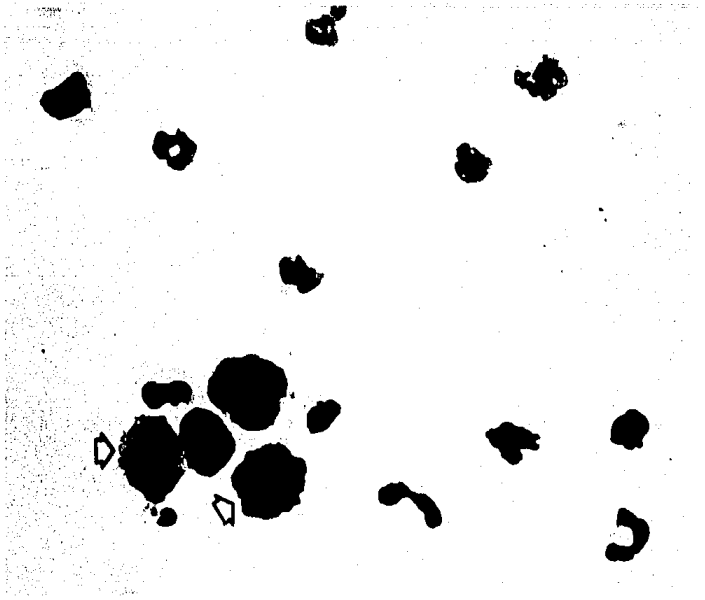
CUADRO 39. COEFICIENTES DE CORRELACION ENTRE EL NUMERO DE CELULAS NUCLEADAS (NUCENUC), DE NEUTROFILOS (NUABSN) Y DE MACROFAGOS (NUABSM) CON RESPECTO A LA RETENCION (INRET) Y REMOCION (INREM) BACTERIANA.

Grupo	I / J		NUCENUC	NUABSN	NUABSM
<u>P. haemolytica</u>	INRET	r =	-0.633	-0.519	-0.342
		p =	0.034	0.076	0.184
	INREM	r =	0.632	0.519	0.343
		p =	0.033	0.077	0.169
<u>S. aureus</u>	INRET	r =	0.493	0.218	0.480
		p =	0.296	0.286	0.095
	INREM	r =	-0.494	-0.215	-0.484
		p =	0.295	0.287	0.063

p = prob > |R| bajo Ho=0

**Figura 15.** Células bronquio-alveolares recuperadas después de la inoculación con P. haemolytica. Población predominante de neutrófilos y algunos macrófagos (flechas). Tinción Wright. (x 400)

**Figura 16.** Células bronquio-alveolares recuperadas después de la inoculación con S. aureus. Macrófagos alveolares con vacuolas en citoplasma. Tinción Wright. (x 1000)





### C. Lesiones macroscópicas y microscópicas

No se observaron lesiones macroscópicas atribuibles a las bacterias inoculadas en el total de ratones utilizados.

Histológicamente se observaron lesiones sólo en los animales inoculados con P. haemolytica. Las lesiones consistieron en una discreta infiltración de neutrófilos en la lámina propia y espacios aéreos de bronquios, bronquiolos y alvéolos (figs. 18 y 19).

La infiltración de neutrófilos se presentó a partir de la primera hora después de la inoculación en el 66% de los ratones. A la segunda hora se presentó en el 100% de los ratones inoculados, manteniéndose hasta las 48 horas en donde sólo se encontró en el 33% de los ratones. A partir de las 72 horas postinoculación no se observó infiltración de neutrófilos (cuadro 40).

En los pulmones del grupo de animales expuestos a S. aureus y en el grupo testigo no se observó infiltración de neutrófilos en ninguno de los intervalos de tiempo postinoculación (fig. 20)

CUADRO 40. PORCENTAJE DE RATONES QUE PRESENTARON CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO DESPUÉS DE LA INOCULACION CON P. HAEMOLYTICA.

		Intervalos de tiempo postinoculación (horas)								
0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
0	66	100	100	100	66	100	33	0	0	0

En los ratones inoculados con S. aureus y en los testigos no se presentaron cambios.

**Figura 17.** Pulmón de ratón cuatro horas después de la inoculación con aerosoles de P. haemolytica. Migración de neutrófilos a través de la lámina propia y del epitelio ciliado de bronquiolo (flechas). H & E. (x 400)

**Figura 18.** Pulmón de ratón cuatro horas después de la inoculación con aerosoles de P. haemolytica. Neutrófilos con alvéolos. H & E. (x 400)



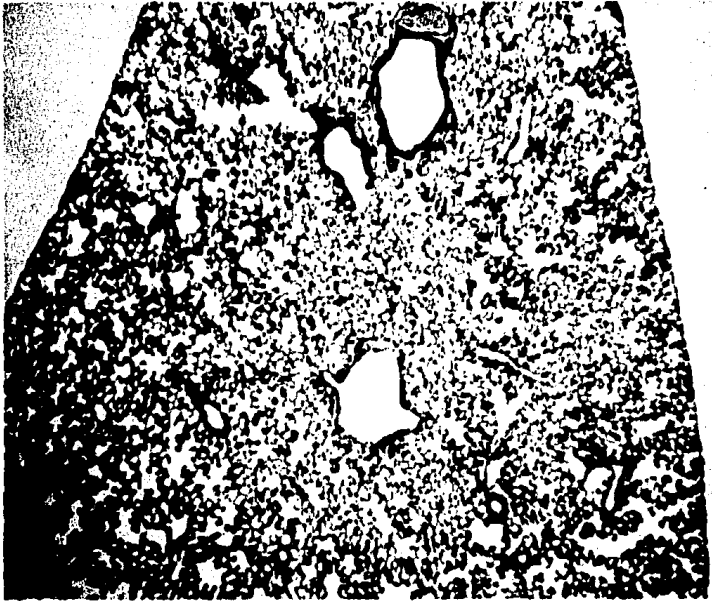


Figura 19. Pulmón de ratón después de la inoculación con aerosoles de *S. aureus*. Espacios aéreos sin exudación celular. H & E. (x 25)

## VI. DISCUSION

En el modelo utilizado, se encontró que a mayor número de P. haemolytica contenidas en el inóculo inicial, un menor número de ellas mismas se depositó en los pulmones de los ratones al concluir la inoculación (correlación negativa,  $r = -0.99$ ). Esto es consistente aunque con más alta correlación que la obtenida por López en 1981 ( $r = -0.10$ ) (118). Este bajo depósito de P. haemolytica en los pulmones de ratones concuerda también con la observada por Lillie y Thomson en 1972 (116).

La asociación negativa en el depósito de P. haemolytica no concuerda con la observada por Goldstein y Green en 1967 (45) en ratones inoculados con Pasteurella pneumotropica ya que en este caso se presentó una asociación positiva.

La correlación negativa ( $r = -0.47$ ) observada entre la concentración de inóculo inicial de Staphylococcus aureus y su depósito en los pulmones de los ratones, coincide con los hallazgos de Laurenzi et al. en 1964 (113). Estos investigadores mencionan que a mayores concentraciones de inóculo de S. aureus, un menor porcentaje de los mismos son retenidos en los pulmones de ratones.

Las marcadas diferencias que se obtuvieron entre los coeficientes de correlación de P. haemolytica ( $r = -0.99$ ) y de S. aureus ( $r = -0.47$ ) con respecto a la concentración de inóculo inicial y depósito en los pulmones de los ratones al concluir la inoculación, son consistentes con las encontradas por Lillie y Thomson en 1972 (116). Estos investigadores encontraron que P. haemolytica se depositó en menor grado que S. aureus. Se desconoce el mecanismo exacto de este fenómeno, pero existen varias hipótesis que tratan de explicarlo. Laurenzi et al. en 1964 (113) proponen que cuando las bacterias en el inóculo y en el aire se encuentran

en altas concentraciones predisponen la formación de aglomerados bacterianos. Estos aglomerados bacterianos por su mayor tamaño son más fácilmente retenidos en cavidad nasal y no alcanzan a penetrar al pulmón. Este fenómeno puede ser de mayor importancia en las bacterias que presentan tendencia a la aglomeración. Por ejemplo, Lillie y Thomson en 1972 (116) sugieren que P. haemolytica tiende a formar aglomerados en aerosoles debido a las características de su cápsula mucoide. Otra posibilidad a considerar sería que los aglomerados bacterianos reflejen un número irreal de unidades formadoras de colonias al realizar la cuenta en los medios de cultivo sembrados. Sin embargo, esto no ha sido bien documentado.

Se ha postulado por otro lado que algunas bacterias son muy susceptibles al "stress" de la inoculación por aerosol. En una revisión realizada por Lillie y Thomson en 1972 (116) en relación al efecto del "stress" sobre las bacterias, concluyeron que en general las bacterias gram negativas son más susceptibles al "stress" de la inoculación por aerosol que las gram positivas. Este fenómeno se debe principalmente a fluctuaciones en la humedad relativa, temperatura, exposición a oxígeno, deshidratación y rehidratación. Estos mismos autores determinaron que S. aureus resiste más las condiciones de "stress" que P. haemolytica. Esto podría explicar el por qué en la presente investigación los ratones expuestos a P. haemolytica tuvieron un menor depósito en los pulmones a mayores concentraciones del inóculo inicial que en los expuestos a S. aureus.

La fase de crecimiento en la que se encuentren las bacterias utilizadas en el inóculo puede también tener también efecto sobre el número de bacterias depositadas después de un aerosol. Goodlow y Leonard

en 1961 ( 49) demostraron que las bacterias en la fase logarítmica de crecimiento son más susceptibles a influencias ambientales y a la inoculación por aerosol que en la fase lag o en la fase estacionaria. En el presente estudio el inóculo utilizado se preparó a partir de bacterias en fase logarítmica, lo cual pudo haber influido en el número de bacterias depositadas en los pulmones de los ratones.

La curva de remoción de P. haemolytica se llevó a cabo con un patrón similar al descrito en ratones por Lillie y Thomson en 1972 (116). Sin embargo la velocidad de eliminación de P. haemolytica encontrada por Lillie y Thomson fue menor que la observada en esta investigación. El patrón de eliminación rápido y progresivo de P. haemolytica coincide con el descrito por Campbell et al. en 1983 ( 15) para esta bacteria en ratones.

El patrón de eliminación de P. haemolytica coincide también con el de P. pneumotropica en ratones observado por Goldstein y Green en 1967 ( 45), por Jakab y Dick en 1973 ( 84) y por Jakab en 1974 ( 85). Sin embargo, la velocidad de eliminación de P. pneumotropica descrita por Goldstein y Green en 1967 ( 45) fue menor a la observada en P. haemolytica en el presente trabajo.

El patrón de eliminación de P. haemolytica en ratones fue similar pero con menor velocidad al descrito en esta bacteria en bovinos por Lillie y Thomson en 1972 (116).

La curva de eliminación de P. haemolytica fue consistente con las obtenidas por otros investigadores utilizando algunas bacterias gram negativas. Se han descrito curvas de eliminación similares a la de P. haemolytica en ratones con E. coli, Flavobacterium sp y Proteus mirabilis por Jackson et al. en 1967 ( 80) y por Green y Green en 1968

( 54 ). Southern et al. en 1971 (158) encontraron el mismo patrón de eliminación para dos cepas diferentes de Serratia marcescens en ratones, aunque con mayor lentitud que los resultados obtenidos en el presente estudio con P. haemolytica.

Por otro lado, existen descripciones de remoción de bacterias gram negativas en ratones que no concuerdan con los resultados de este trabajo. Por ejemplo, Jay et al. en 1976 ( 91 ) utilizando E. coli, encontraron una eliminación de sólo el 21.5% a las cuatro horas postinoculación, mientras que en esta investigación P. haemolytica fue eliminada en un 85% en el mismo tiempo. Se han descrito patrones de remoción muy erráticos en ratones utilizando Klebsiella pneumoniae por Jay et al. en 1976 ( 91 ). Después de inocular esta bacteria no fue eliminada y se multiplicó en los pulmones de los ratones.

Es interesante hacer notar que el patrón de remoción general de P. haemolytica encontrado concuerda con el descrito para otras bacterias gram negativas en ratones. Sin embargo, P. haemolytica presentó un aumento en el número de bacterias a la segunda hora postinoculación, pero se normalizó el patrón de eliminación a las cuatro horas de acuerdo al patrón de S. aureus. Este comportamiento ha sido descrito también con Pseudomonas spp en ratones. Jackson et al. en 1967 ( 80 ) y Southern et al. en 1971 (159) encontraron un incremento en el número de Pseudomonas spp a la primera hora después de la inoculación, pero la eliminación se normalizó a la cuarta hora , siguiendo el mismo patrón de otras bacterias gram negativas.

El patrón de remoción de P. haemolytica en ratones es consistente con los de otras bacterias gram negativas estudiadas en algunas especies animales. Concuerda con la eliminación de E. coli y P. mirabilis en



cobayos ( 147, 82 ). Coincide también con la observada en conejos y bovinos con S. marcescens ( 18 , 172) y en cerdos con E. coli ( 19 , 28 ).

La curva de remoción de S. aureus encontrada en este trabajo, coincide con las descritas en otras investigaciones con ratones, ya que siguen un mismo patrón y velocidad de eliminación, habiéndose eliminado más del 95% de las bacterias inhaladas a las 8 horas postinoculación. Concuera con los estudios de Laurenzi et al. en 1964 (113), Green y Kass en 1965 ( 53 ), Lillie y Thomson en 1972 (116), Hsieh et al. en 1978 ( 72 ), Jay et al en 1976 ( 91 ) y Nugent y Pesanti en 1982 (136).

El patrón de remoción de S. aureus fue el mismo, pero más lento comparado con el descrito para Staphylococcus albus ( 54 ) y para Streptococcus pneumoniae ( 91 ).

La curva de eliminación de S. aureus en los ratones de esta investigación es similar a la descrita en cobayos ( 82 ) sin embargo en bovinos la remoción fue ligeramente más rápida en las primeras horas (116) y en ratas fue más lenta ( 47 ). También coincide con el patrón de eliminación de otras bacterias gram positivas, como Bacillus subtilis en cerdos (150) aunque este último es más rápido que S. aureus.

En el grupo inoculado con P. haemolytica es interesante hacer notar la gran variación en los valores de remoción tanto en los animales de una misma réplica como entre réplicas. Este grado de variación no se encontró en el grupo de ratones expuestos a S. aureus. Variaciones similares han sido descritas también en animales expuestos a P. haemolytica (116). Por otro lado se han encontrado también pequeñas variaciones en los valores de remoción de S. aureus (113, 54 ,116, 52 ) y de P. mirabilis en condiciones normales (54).

La gran variación encontrada en los valores de remoción podría

deberse a la mayor susceptibilidad de algunos ratones a la inoculación con P. haemolytica, o sea a una variación individual ( 3 ). Otra posible explicación sería que algunos de los animales con valores erráticos estuvieran padeciendo una enfermedad subclínica que alterara los mecanismos de defensa. Existen varios reportes de procesos subclínicos que afectan los mecanismos de remoción (167 ,118). Tampoco se puede descartar la posibilidad de variaciones en las técnicas utilizadas en los estudios con P. haemolytica. Sin embargo, es difícil pensar que casualmente el mayor número de animales con valores erráticos se presentó en el grupo inoculado con P. haemolytica y no en S. aureus. Pero por otro lado, sí sería posible explicarlo, dado que de acuerdo al análisis estadístico la réplica 1 fue diferente a las demás en el grupo expuesto a P. haemolytica. Esta diferencia pudo deberse a que fue la primer réplica experimental de la investigación y es probable que sea la réplica donde menor homogeneidad se haya tenido en las técnicas utilizadas.

Es necesario mencionar que aunque en esta investigación se demostró la capacidad del pulmón de ratones normales para eliminar P. haemolytica y S. aureus de una manera progresiva y predecible, existen diferencias en el depósito y en la eliminación de bacterias en los pulmones de diferentes especies animales (bovinos y ratones) expuestos incluso al mismo aerosol (118 ). También se han descrito diferencias en la remoción de diferentes bacterias por el pulmón de una misma especie animal (159) como también diferencias en la eliminación entre cepas de una misma bacteria (158).

A pesar de las marcadas variaciones en los valores de remoción entre animales y entre réplicas en el grupo inoculado con P. haemolytica, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre este grupo

y el expuesto a S. aureus. Esto se debe probablemente a que el análisis de varianza se realizó con valores transformados a escala logarítmica. La transformación logarítmica, en general, aumentó también los coeficientes de correlación y los de determinación de los modelos estadísticos utilizados. Holt en 1980 ( 70 ) sugiere que la transformación logarítmica reduce las variaciones dentro del grupo (grupo P. haemolytica y grupo S. aureus) consiguiendo así una distribución normal de los valores, una independencia entre la media y la varianza y logrando la aditividad de los efectos ( 21 ). Aunque otros autores ( 21 ) recomiendan la transformación arco seno para el análisis de datos en escalas de índice expresados como porcentajes, esta transformación no funcionó para el estudio de los índices de remoción y retención.

En el análisis de los valores de remoción se observó que el peso del pulmón tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ), también se observó una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) entre el peso del pulmón de los ratones inoculados con P. haemolytica con respecto a los expuestos a S. aureus, siendo proporcionalmente más pesados los pulmones de los ratones expuestos a P. haemolytica. Esto podría explicarse por la marcada respuesta inflamatoria encontrada en el grupo P. haemolytica y no en el grupo S. aureus. Esta respuesta inflamatoria, caracterizada por una marcada exudación (importación de células de la sangre al pulmón) pudo contribuir significativamente a aumentar el peso del pulmón. Otros autores, también han observado que la respuesta inflamatoria a la inoculación de bacterias aumenta el peso de los pulmones. Jackson et al. en 1967 ( 80 ) observó este fenómeno en ratones expuestos a Pseudomonas spp; Johnson et al. en 1983 (100) encontraron lo mismo en pulmones de equino inoculados con Corynebacterium equi.

En el estudio de las células bronquio-alveolares, las cuentas diferenciales de células fagocíticas de los pulmones de ratones testigo inoculados únicamente con aerosoles de solución amortiguadora de fosfatos fueron de 99% de macrófagos y 1% de neutrófilos. Estos valores coinciden o son muy similares a los encontrados en otras especies animales en condiciones normales (ver cuadro 7). Es interesante hacer notar que los animales expuestos a aerosoles bacterianos, inmediatamente después de la inoculación (cero horas) ya presentaban un aumento en el número de neutrófilos.

La exposición de ratones a aerosoles de P. haemolytica indujo un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) tanto en el número de células totales por ml de lavado bronquio-alveolar, como en el número de neutrófilos y por lo tanto en el índice de neutrófilos/macrófagos, de las cero a las 12 horas postinoculación. El número de macrófagos alveolares permaneció sin cambios a través del tiempo en este grupo.

El aumento en el número de células totales y específicamente de neutrófilos encontrado en el grupo de ratones expuestos a P. haemolytica es similar a lo observado por López en 1981 en bovinos inoculados con la misma bacteria (118) y en cobayos inoculados con Pseudomonas aeruginosa (139). Coincide también con los resultados obtenidos en ratones inoculados con Klebsiella pneumoniae y E. coli aunque con una metodología diferente, ya que en dicha investigación se realizó la cuenta de neutrófilos en cortes de pulmón (141).

Por otro lado, en los ratones expuestos a S. aureus el número de células totales fue inferior al del grupo testigo, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ); a pesar de esto, la relación neutrófilos-macrófagos sí fue diferente a la del grupo testigo,

ya que se observó un aumento en el número de neutrófilos, mientras los macrófagos alveolares no mostraron cambios a través del tiempo. Estos hallazgos coinciden en lo descrito con S. aureus en ratones (137) y en cobayos (77).

La hipótesis planteada de migración de neutrófilos a espacios aéreos después de la inoculación bacteriana, es aceptada tanto para P. haemolytica como para S. aureus ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, cabe mencionar que la afluencia de neutrófilos fue mayor en P. haemolytica y que en S. aureus fue mínima.

En ratones testigo inoculados solamente con solución amortiguadora de fosfatos, se observó un leve aumento en el número de células totales a través del tiempo postinoculación; no obstante, el número de neutrófilos permaneció más bajo que en los grupos expuestos a aerosoles bacterianos. En contraste, el número de macrófagos fue mayor en el grupo testigo comparado con los otros grupos en las primeras 12 horas, por lo que se podría pensar que el aumento observado en las células totales en los ratones testigo correspondió principalmente a macrófagos alveolares. Estos resultados coinciden con otras descripciones en las que no se observaron incrementos marcados en las células totales ni en neutrófilos después de exponer cobayos y hamsters con solución salina o agua estéril (77, 74). Concuerta también con lo descrito en cobayos expuestos a aerosoles de agua destilada (157). Por otro lado, existen descripciones de aumento en el número de polimorfonucleares después de la inoculación únicamente con solución salina en ratones (137). La conclusión obtenida con el uso de testigos inoculados con soluciones inocuas para el estudio de las poblaciones celulares del pulmón concuerda con la consideración general de que son el testigo apropiado para ratones expuestos a

bacterias (141).

Las marcadas diferencias en la afluencia de neutrófilos a espacios aéreos entre los ratones inoculados con P. haemolytica, S. aureus y los testigos en los lavados bronquio-alveolares fueron reflejadas de igual forma en los estudios histopatológicos. Solamente en el grupo expuesto a P. haemolytica se presentaron cambios microscópicos demostrables. Los cambios consistieron en una discreta infiltración de neutrófilos en lámina propia y espacios aéreos de bronquios, bronquiolos y alvéolos, a partir de la primera hora postinoculación.

Los cambios histopatológicos en los ratones expuestos a P. haemolytica son similares a los observados en bovinos inoculados con esta misma bacteria, aunque en esta última especie animal la respuesta neutrofilica fue mucho más severa (118).

Los mecanismos por los cuales P. haemolytica induce en ratones una mayor afluencia de neutrófilos a espacios aéreos que S. aureus después de haber sido expuestos a aerosoles bacterianos no se han esclarecido por completo. Estas diferencias pueden deberse a variaciones en las características de estos dos microorganismos o generalizando, a diferencias entre bacterias gram negativas y gram positivas. La exposición a bacterias gram negativas como Klebsiella pneumoniae y E. coli en ratones indujo una notable afluencia de neutrófilos a espacios aéreos, mientras que este efecto quimiotáctico no fue observado en la inoculación de una bacteria gram positiva como S. aureus (141). El incremento en el número de neutrófilos en el pulmón ha sido descrito también en cobayos después de inocularlos con E. coli y K. pneumoniae, pero no con Bacillus subtilis (149).

Las características bacterianas que determinan la capacidad de

inducir la movilización de neutrófilos a los espacios aéreos, son debidas en las bacterias gram negativas al lipopolisacárido (LPS) presente en su pared celular (65). Las fracciones de LPS que mayor efecto quimiotáctico hacia neutrófilos han demostrado son heptosa y lípido A. También se ha postulado que las propiedades biológicas de los lípidos dependen a la vez de su composición en ácidos grasos (65).

La inoculación con bacterias gram negativas ha demostrado inducir una respuesta celular similar a la obtenida con la administración de LPS (libre de bacterias) en varias especies animales. Se ha descrito con LPS de Pseudomonas putida, de Enterobacter agglomerans, de Klebsiella oxytoca y de Salmonella thyphosa en cobayos y hamsters (65, 74).

Se han descrito diferentes mecanismos mediante los cuales el LPS bacteriano ejerce efecto quimiotáctico sobre los neutrófilos. Uno de estos mecanismos es el propuesto por Snella et al. en 1982 (157), quienes sugieren que el efecto del LPS en los neutrófilos es mediado por macrófagos. Se sugiere que después de la fagocitosis de LPS o bacterias por macrófagos, es probable que estos liberen otros factores quimiotácticos que producen el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección (106, 77).

Por otro lado, se ha descrito que las endotoxinas bacterianas son capaces de activar la vía clásica y alterna del complemento en cobayos (74), lo que podría contribuir a la atracción de neutrófilos. Otras investigaciones han cuestionado esta idea ya que se ha demostrado que en animales descomplementados y expuestos a LPS, la migración de neutrófilos no se vio alterada (157). No obstante, los macrófagos pueden secretar  $C_3$  y  $C_5$ , los cuales son factores quimiotácticos para neutrófilos y ejercer este efecto sin participación del complemento sérico (157).

Otros autores sugieren que el LPS bacteriano es quimiotáctico

para neutrófilos a través de sistemas biológicos complejos, pero que también puede actuar directamente sobre ellos, tal como se ha demostrado in vitro (74).

En esta investigación no fue posible establecer cuál fue el mecanismo de atracción de neutrófilos en los ratones expuestos a P. haemolytica. Son necesarias futuras investigaciones que permitan dilucidar este fenómeno.

Por lo que respecta a las bacterias gram positivas, aunque su capacidad quimiotáctica es muy inferior a la comparada con las gram negativas, se ha postulado que el efecto quimiotáctico es mediado a través de macrófagos activados o mediante el sistema de complemento (111). Se ha demostrado recientemente que sí es posible producir con S. aureus una afluencia de neutrófilos a espacios aéreos de ratones utilizando altas concentraciones de inóculo (137). Es probable que la concentración utilizada de S. aureus en la presente investigación no haya sido la suficiente para establecer una clara respuesta neutrofflica. Esta dependencia de concentración de inóculo de S. aureus para producir una respuesta de neutrófilos puede ser la causa de los variables efectos sobre los neutrófilos encontrados con esta bacteria por otros investigadores.

Es interesante mencionar que en los ratones expuestos a aerosoles de P. haemolytica y en los testigo, el aumento en el número de células totales a partir de las 48 horas, correspondió a macrófagos alveolares. Una posible explicación al respecto es que el aumento en los macrófagos alveolares haya sido para substituir progresivamente a la población de neutrófilos presentes en las primeras 24 horas en los ratones expuestos a P. haemolytica. Se ha descrito que la substitución de neutrófilos en



un sitio inflamatorio por células mononucleares se efectuó cuando los neutrófilos tenían cierto tiempo de edad. Esto pudo contribuir a que se presentara este patrón de aumento de macrófagos en el periodo mencionado. En los ratones testigo el mecanismo pudo haber sido el mismo, debido a una mínima afluencia de neutrófilos quizá no perceptible con la metodología utilizada. En los ratones expuestos a S. aureus, no se observó el aumento de macrófagos a partir de las 48 horas, posiblemente debido a que con la concentración inoculada, los macrófagos alveolares fueron capaces de eliminar esta bacteria sin la cooperación de neutrófilos (137) por lo que no fue necesario substituir a estos últimos.

De la segunda hipótesis planteada en relación a la existencia de una posible correlación entre la respuesta inflamatoria medida por la afluencia de células al pulmón y la remoción bacteriana, se concluyó lo siguiente. En el grupo de ratones expuestos a P. haemolytica, la correlación existente entre neutrófilos y macrófagos con respecto a la retención de esta bacteria, fue negativa. En otras palabras, el aumento en el número de neutrófilos y macrófagos se asociaba con un menor número de bacterias en el pulmón. Estos resultados podrían sugerir que las bacterias inhaladas eran fagocitadas y destruidas, reduciéndose su número a través del tiempo. Sin embargo, en los ratones inoculados con S. aureus, las bacterias también eran eliminadas con el mismo patrón que P. haemolytica a través del tiempo, a pesar de no haber un incremento en el número de células fagocíticas (correlación positiva). Por lo tanto, las correlaciones entre remoción bacteriana y respuesta inflamatoria fueron totalmente opuestas en las bacterias estudiadas.

La diferencia entre los ratones expuestos a P. haemolytica y a S. aureus en relación al número de neutrófilos y su asociación con la

eliminación de estas bacterias inhaladas, puede tener varias explicaciones. Existe la posibilidad de que la presencia de neutrófilos en los espacios aéreos en los animales expuestos a P. haemolytica haya sido accidental, debida al efecto quimiotáctico ejercido por el LPS de esta bacteria pero que los neutrófilos no hayan participado activamente en su eliminación.

En esta investigación no se estudiaron los índices fagocíticos, por lo que no se pudo determinar si los neutrófilos realmente participaron en forma activa en la fagocitosis y eliminación de P. haemolytica tal como habfa sido sugerido por López en 1981 (118) con esta misma bacteria o por Pierce et al. en 1977 (141) con otras. Aunque algunos investigadores piensan que la simple observación microscópica de células recuperadas en los lavados es suficiente para estudiar el índice fagocítico, estudios in vivo han demostrado que esta técnica puede ser poco confiable por lo que hay que recurrir a otras técnicas como microscopía electrónica, inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa entre otras ( 89).

Otra posible explicación del incremento marcado de neutrófilos en los pulmones de los ratones expuestos a P. haemolytica podría ser que los macrófagos alveolares no fueron capaces de eliminar esta bacteria por sí solos como en el caso de S. aureus. Se ha descrito la presencia de una substancia tóxica para macrófagos alveolares con P. haemolytica y se sugiere que los macrófagos en presencia de un gran número de estas bacterias son afectados ( 6,123, 36). Esta disminución de la capacidad de eliminar P. haemolytica pudo haber contribuido a que se reclutaran neutrófilos a espacios aéreos.

## VII. REFERENCIAS

1. Ansfield, M.J., Woods, D.E. and Johanson, W.G.: Lung bacterial clearance in murine pneumococcal pneumonia. Infect. Immun., 17:195-204 (1977).
2. Armed Forces Institute of Pathology: Manual of Histology Staining Methods. 3rd ed. McGraw-Hill, New York, 1968.
3. Bairey, M.H.: Suceptibility and resistance variations in mice. Memorias I Simposium Internacional de Laboratorios de Diagnóstico. Tomo I. Asociación de Veterinarios Especialistas en Patología Diagnóstica, 191-216. Guanajuato, México, 1977.
4. Bang, F.B.: Mucociliary function as a protective mechanism in upper respiratory tract. Bact. Rev., 25:228-236 (1961).
5. Beard, C.W. and Easterday, B.C: An aerosol apparatus for the exposure of large and small animals: description and operation characteristics. Am. J. Vet. Res., 26:174-182 (1965).
6. Benson, M.L., Thomson, R.G. and Valli, V.E.O.: The bovine alveolar macrophage II. In vitro studies with Pasteurella haemolytica. Can. J. Comp. Med., 42:358-369 (1978).
7. Berendt, R.F.: Relationship of method of administration to respiratory virulence of Klebsiella pneumoniae for mice and squirrel monkeys. Infect. Immun., 20:581-583 (1978).
8. Bice, D.E., Harris, D.L., Hill, J.O. and Muggenburg, B.A.: Local and systemic immunity following localized deposition of antigen in the lung. Chest, 75:246-248 (1979).
9. Blaxter, K.: The limits of animal production. Vet. Rec., 105:5-9 (1979).
10. Bloomfield, A.L. Am. J. Med. Sci., 164:854 (1922) cited by Stillman, E.G.: The presence of bacteria in the lungs of mice following inhalation. J. Exp. Med., 38:117-126 (1923).
11. Bowden, D.H. and Adamson, Y.R.: Adaptive responses of the pulmonary macrophagic system to carbon. I. Kinetic studies. Lab. Invest., 38:422-429 (1978).
12. Boorman, G.A., Schwartz, L.W. and Wilson, F.D.: In vitro macrophage colony formation by free lung cells during pulmonary injury. J. Reticuloendothel. Soc., 26:867-872 (1979).
13. Brody, A.R., Roe, M.W., Evans, J.N. and Davis, G.S.: Deposition and translocation of inhaled silica in rats. Lab. Invest., 47:533-542 (1982).
14. Bryson, D.G., McFerran, J.B., Ball, H.J. and Neill, S.D.: Observation on outbreak of respiratory diseases in housed calves. 2. Pathological and microbiological findings. Vet. Rec., 103:503-509 (1978).

15. Campbell, S.G., Mtero, S.S., Niderbuhl, C.J. and Collin, F.M.: Fate of Pasteurella haemolytica in conventionally raised and germfree mice. Infect. Immun., 39:202-207 (1983).
16. Church, T.L. and Radostits, O.M.: A retrospective survey of diseases of feedlot cattle in Alberta. Can. Vet. J., 22:27-30 (1981).
17. Cohen, A.B. and Batra, G.K.: Bronchoscopy and lung lavage induced bilateral pulmonary neutrophil influx and blood leukocytosis in dogs and monkeys. Am. Rev. Respir. Dis., 122:239-247 (1980).
18. Cralley, L.J.: Factors affecting retention and removal of bacteria from the tracheal tree and lungs. Am. J. Hyg., 36:303-310 (1942).
19. Curtis, S.E., Kingdom, D.A., Simon, J. and Drummond, J.G.: Effects of age and cold on pulmonary bacterial clearance in the young pig. Am. J. Vet. Res., 37:299-301 (1976).
20. Damiano, V.V., Cohen, A., Tsang, A.L., Batra, G. and Petersen, R.: A morphologic study of the influx of neutrophils in to dog lung alveoli after lavage with sterile saline. Am. J. Path., 100:349-354 (1980).
21. Daniels, W.W.: Bioestadística. Editorial Limusa, México, 1980.
22. Dannenberg, A.M.: Influence of environmental factors on the respiratory tract. summary and perspectives. J. Reticuloendothel. Soc., 22:273-290 (1977).
23. Davis, G.S., Brody, A.R. and Craighead, J.E.: Analysis of airspace and interstitial mononuclear cell populations in human diffuse interstitial lung disease. Am. Rev. Respir. Dis., 118:7-16 (1978).
24. Davis, G.S., Giancola, M.S., Costanza, M.C. and Low, R.B.: Analyses of sequential bronchoalveolar lavage samples from healthy human volunteers. Am. Rev. Respir. Dis., 126:611-616 (1982).
25. Davis, G.S., Winn, W.C., Gump, D.W., Craighead, J.E. and Beaty H.N.: Legionnaires' pneumonia after aerosol exposure in guinea pigs and rats. Am. Rev. Respir. Dis., 126:1050-1057 (1982).
26. DeMaria, T.G. and Kapral, F.A.: Pulmonary infection of mice with Staphylococcus aureus. Infect. Immun., 21:114-123 (1978).
27. Desai, V., Kreuzer, D.L., Showell, H., Arroyave, C.V., and Ward, P.A.: Acute inflammatory pulmonary reactions induced by chemotactic factors. Am. J. Path., 96:71-82 (1979).
28. Drummond, J.G., Curtis, S.E. and Simon, J.: Effects of atmospheric ammonia on pulmonary bacterial clearance in the young pig. Am. J. Vet. Res., 39:211-212 (1978).
29. Dunnill, M.S.: Some aspects of pulmonary defence. J. Path., 128:221-236 (1979).

30. Ehrlich, R.: Effect of nitrogen dioxide on the resistance to respiratory infection. Bact. Rev., 30:604-614 (1966).
31. Eichenwald, H.F., Kotsevalov, O. and Fasso, L.A.: The "Cloud Baby": An example of bacterial-viral interaction. Am. J. Dis. Child., 100: 31-43 (1960).
32. El Azhary, M.A.S.V.: Aerosol stability of some bovine respiratory viruses, PhD. Thesis. Faculty of Graduate Studies. University of Guelph. Ontario, Canada, 1977.
33. Eyckmans, L. and Billiau, A.: Inhibition of bacterial capacity in mice after administration of Newcastle disease virus. Scand. J. Infect. Dis., 4:101-104 (1972).
34. Feeley, T.W., duMoulin, G.C., Hedley, J., Bushnell, L.S., Gilbert, J.P. and Feingold, D.S.: Aerosol polymyxin and pneumonia in seriously ill patients. N. Engl. J. Med., 293:471-475 (1975).
35. First, M.W.: Aerosols in nature. Arch. Intern. Med., 131:24-32 (1973).
36. Fox, M.L.: The bovine alveolar macrophage. 1. Isolation, *in vitro* cultivation, ultrastructure and phagocytosis. Can. J. Microb., 19:1207-1210 (1973).
37. Friend, S.C., Thomson, R.G. and Wilkie, B.N.: Pulmonary lesions induced by Pasteurella haemolytica in cattle. Can. J. Comp. Med., 41:219-223 (1977).
38. Friend, S.C., Wilkie, B.N., Thomson, R.G. and Barnum, D.A.: Bovine pneumonic pasteurellosis: Experimental induction in vaccinated and nonvaccinated calves. Can. J. Comp. Med., 41:77-83 (1977).
39. Galindo, B. and Myrvik, Q.N.: Migratory response of granulomatous alveolar cells from BCG-sensitized rabbits. J. Immun., 105:227-237 (1970).
40. Gerrity, T.R., Cotromanes, E., Garrard, C.S., Yeates, D.B. and Lourenco, R.V.: The effect of aspirin on lung mucociliary clearance. N. Engl. J. Med., 308:139-141 (1983).
41. Gilka, F., Thomson, R.G. and Savan, M.: Microscopic findings in the lungs of calves aerosolized with Pasteurella haemolytica and treated to alter pulmonary clearance. Zbl. Vet. Med., 21:774-786 (1974).
42. Gilka, F., Thomson, R.G. and Savan, M.: The effect of edema, hydrocortisone acetate, concurrent viral infection and immunization on the clearance of Pasteurella haemolytica from the bovine lung. Can. J. Comp. Med., 38:251-259 (1974).
43. Goldberg, I.S. and Lourenco, R.V.: Deposition of aerosols in pulmonary disease. Arch. Intern. Med., 131:88-91 (1973).

44. Goldstein, E. and Green, G.M.: Inhibition of pulmonary bacterial clearance during acute renal failure. Antimicrob. Ag. Chemother., 22-25 (1965).
45. Goldstein, E. and Green, G.M.: Alteration of the pathogenicity of Pasteurella pneumotropica for the murine lung caused by changes in pulmonary antibacterial activity. J. Bact., 93:1651-1656 (1967).
46. Goldstein, E., Green, G.M. and Seamans, C.: The effect of silicosis on the antibacterial defense mechanisms of the murine lung. J. Infect. Dis., 120:210-216 (1969).
47. Goldstein, E., Lippert, W. and Warshaver, D.: Pulmonary alveolar macrophage. Defender against bacterial infection in the lung. J. Clin. Invest., 54:519-528 (1974).
48. Goldstein, E., Bartlema, H.C., Ploeg, van der, M., Duijn, van, P., Stap, van der, J.G.M. and Lippert, W.: Effect of ozone on lysosomal enzymes of alveolar macrophages engaged in phagocytosis and killing of inhaled Staphylococcus aureus. J. Infect. Dis., 138:299-311 (1978).
49. Goodlow, R.J. and Leonard, F.A.: Viability and infectivity of microorganisms in experimental airborne infection. Bact. Rev., 25: 182-187 (1961).
50. Green, G.M. and Kaas, E.H.: The role of the alveolar macrophage in the clearance of bacteria from the lung. J. Exp. Med., 119:167 (1964).
51. Green, G.M. and Kaas, E.H.: Factors influencing the clearance of bacteria by the lung. J. Clin. Invest., 43:769-776 (1964).
52. Green, G.M.: Patterns of bacterial clearance in murine influenza. Antimicrob. Ag. Chemoter., 26-29 (1965).
53. Green, G.M. and Kaas, E.H.: The influence of bacterial species on pulmonary resistance to infection in mice subjected to hypoxia, cold stress, and ethanolic intoxication. Br. J. Exp. Path., 46:360-366 (1965).
54. Green, L.H. and Green, G.M.: Differential suppression of pulmonary antibacterial activity as the mechanism of selection of a pathogen in the mixed bacterial infection of the lung. Am. Rev. Respir. Dis., 98:819-824 (1968).
55. Green, G.M.: The response of the alveolar macrophage system to host and environmental changes. Arch. Environ. Hlth., 18:548-550 (1969).
56. Green, G.M., Jakab, G.J., Low, R.B. and Davis, G.S.: Defense mechanisms of the respiratory membrane. Am. Rev. Respir. Dis., 115:479-514 (1977).
57. Grogan, J.B.: Acute alteration in the bactericidal capacity of rabbit alveolar macrophages following stress. J. Trauma., 13:877-883 (1973).

58. Gross, G.N., Rehm, S.R. and Pierce, A.K.: The effect of complement depletion on lung clearance of bacteria. J. Clin. Invest., 62: 373-378 (1978).
59. Gross, G.N., Rehm, S.R., Toews, G.B., Hart, D.A. and Pierce, A.K.: Lung clearance of Staphylococcus aureus strains with differing protein A content: protein A effect on in vivo clearance. Infect. Immun., 21: 7-9 (1978).
60. Harford, C.G., Leidler, V. and Hara, M.: Effect of the lesion due to influenza virus on the resistance of mice to inhaled pneumococci. J. Exp. Med., 89:53-67 (1949).
61. Harford, C.G. and Hara, M.: Pulmonary edema in influenzal pneumonia of the mouse and the relation of fluid in the lung to the inception of pneumococcal pneumoniae. J. Exp. Med., 91:245-259 (1950).
62. Harmsen, A.G., Birmingham, J.R., Engen, R.L. and Jeska, E.L.: A method for obtaining swine alveolar macrophages by segmental pulmonary lavage. J. Immunol. Meth., 27:199-202 (1979).
63. Harris, G.D., Johanson, W.G. and Pierce, A.K.: Determinants of lung bacterial clearance in mice acute hypoxia. Am. Rev. Respir. Dis., 116:671-677 (1977).
64. Hatch, M.T.: Distribution and deposition of inhaled particles in the respiratory tract. Bact. Rev., 25:237-240 (1961).
65. Helander, I., Salonen, M.S. and Rylander, R.: Chemical structure and inhalation toxicity of lipopolysaccharides from bacteria on cotton. Infect. Immun., 29:859-862 (1980).
66. Henderson, D.W.: An apparatus for the study of airborne infection. J. Hyg., 50:53-69 (1952).
67. Henderson, R.F. and Lowrey, J.S.: Effect of anesthetic agents on lavage fluid parameters used as indicators of pulmonary injury. Lab. Anim. Sci., 33:60-62 (1983).
68. Hicks, C.R.: Fundamental concepts in the design of experiments. 2nd ed. Holt Rinehart and Winston, New York, 1973.
69. Hocking, W.G. and Golde, D.W.: The pulmonary-alveolar macrophage. N. Engl. J. Med., 301:580-587 (1979).
70. Holt, J., Lumsden, J.H. and Mullen, K.: On transforming biological data to Gaussian form. Can. J. Comp. Med., 44:43-51 (1980).
71. Holub, M. and Hauser, R.E.: Lung alveolar histiocytes engaged in antibody production. Immunology, 17:207-226 (1969).

72. Hsieh, S., Goldstein, E., Lippert, W. and Margulies, L.: The effect of protein A on the antistaphylococcal defense mechanisms of the murine lung. J. Infect. Dis., 138:754-757 (1978).
73. Huber, G.L., LaForce, F.M., Mason, R.J. and Monaco, A.P.: Progressive impairment of pulmonary antibacterial mechanisms associated with prolonged oxygen administration. Ann. Intern. Med., 72:808 (1970).
74. Hudson, A.R., Kilburn, K.H., Halprin, G.M. and McKenzie, W.N.: Granulocyte recruitment to airways exposed to endotoxin aerosols. Am. Rev. Respir. Dis., 115:89-95 (1977).
75. Hugh, R., Huang, K.Y. and Elliot, T.B.: Enhancement of bacterial infections in mice by Newcastle disease virus. Infect. Immun., 3:488-493 (1971).
76. Hulbert, W. C., Walker, D.C. and Hogg, J.C.: The site of leukocyte migration through the tracheal mucosa in the guinea pig. Am. Rev. Respir. Dis., 124:310-316 (1981).
77. Hunnighake, G.W., Gallin, J.I. and Fauci, A.S.: Immunologic reactivity of the lung. The *in vivo* and *in vitro* generation of a neutrophil chemotactic factor by alveolar macrophages. Am. Rev. Respir. Dis., 117:15-23 (1978).
78. Hunnighake, G.W., Gadek, J.E., Kawanami, O., Ferrans, V.J. and Crystal, R.G.: Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease. Evaluation by bronchoalveolar lavage. Am. J. Path., 97:149-206 (1979).
79. Hyde, D., Orthofer, J., Dungworth, D., Tyler, W., Carter, R. and Lum, H.: Morphometric and morphologic evaluation of pulmonary lesions in beagle dogs chronically exposed to high ambient levels of air pollutants. Lab. Invest., 38:455-469 (1978).
80. Jackson, A. E., Southern, P.M., Pierce, A.K., Fallis, B.D. and Sanford, J.P.: Pulmonary clearance of gram-negative bacilli. J. Lab. Clin. Med., 69:833-841 (1967).
81. Jakob, G.J. and Green, G.M.: The effect of Sendai virus infection on bactericidal and transport mechanisms of the murine lung. J. Clin. Invest., 51:1989-1998 (1972).
82. Jakob, G.J. and Green, G.M.: Regional defense mechanisms of the guinea pig lung. Am. Rev. Respir. Dis., 107:776-783 (1973).
83. Jakob, G.J. and Green, G.M.: Immune enhancement of pulmonary bactericidal activity in murine virus pneumonia. J. Clin. Invest., 52:2878-2884 (1973).



84. Jakab,G.J. and Dick,E.C.: Synergistic effect in viral-bacterial infection: Combined infection of the murine respiratory tract with Sendai virus and Pasteurella pneumotropica. Infect. Immun., 8: 762-768 (1973).
85. Jakab,G.J.: Effect of sequential inoculations of Sendai virus and Pasteurella pneumotropica in mice. J. Am. Vet. Med. Ass., 164:723-728 (1974).
86. Jakab,G.J. and Green,G.M.: Pulmonary defense mechanisms in consolidated and non-consolidated regions of lungs infected with Sendai virus. J. Infect. Dis., 129:263-270 (1974).
87. Jakab,G.J.: Factors influencing the immune enhancement of intrapulmonary bactericidal mechanisms. Infect. Immun., 14:389-398 (1976).
88. Jakab,G.J.: Pulmonary defense mechanisms and the interaction between viruses and in acute respiratory infections. Bull. Eur. Physiopath., 13:119-135 (1977).
89. Jakab,G.J., Warr,G.A. and Sannes,P.L.: Alveolar macrophages ingestion and phagosome-lysosome fusion defect associated with virus pneumonia. Infect. Immun., 27:960-968 (1980).
90. Jakab,G.J.: Mechanisms of virus induced bacterial superinfections of the lung. Clin. Chest Med., 2:59-66 (1981).
91. Jay,S.J., Johanson,W.G., Pierce,A.K. and Reisch,J.S.: Determinants of lung bacterial clearance in normal mice. J. Clin. Invest., 57:811-817 (1976).
92. Jensen,R., Pierson,R.E., Braddy,P.M., Saari,D.A., Lauerman,L.H., England,J.J., Horton,D.P. and McChesney,A.E.: Diseases of yearling feedlot cattle in Colorado. J. Am. Vet. Med. Ass., 169:497-499 (1976).
93. Jericho,K.W.F.: Interpretation of the histopathological changes of porcine enzootic pneumonia. Vet. Bull., 47:887-890 (1977).
94. Jericho,K.W.F. and Langford,E.V.: Pneumonia in calves produced with aerosols of bovine Herpesvirus 1 and Pasteurella haemolytica. Can. J. Comp. Med., 42:269-277 (1977).
95. Jericho,K.W.F.: Update on pasteurellosis in young cattle. Can. Vet. J., 20:333-335 (1979).
96. Jericho,K.W.F. and Langford,E.V.: Aerosol vaccination of calves with Pasteurella haemolytica against experimental respiratory disease. Can. J. Comp. Med., 46:287-292 (1982).
97. Jericho,K.W.F.: Histological changes in the respiratory tract of calves exposed to aerosols of bovine Herpesvirus 1 and Pasteurella haemolytica. J. Comp. Path., 93:73-82 (1983).

98. Johanson, W.G., Jay, S.J. and Pierce, A.K.: An important determinant of the pulmonary clearance of Diplococcus pneumoniae in rats. J. Clin. Invest., 53:1320-1325 (1974).
99. Johnson, J.D., Hand, W.L., King, N.L. and Hughes, C.G.: Activation of alveolar macrophages after lower respiratory tract infection. J. Immunol., 115:80-84 (1975).
100. Johnson, J.A., Prescott, J.F. and Markham, R.J.F.: The pathology of experimental Corynebacterium equi infection in foals following intrabronchial challenge. Vet. Path., 20:440-449 (1983).
101. Johnston, W.W. and Frable, W.J.: The cytopathology of the respiratory tract. A review. Am. J. Path., 84:372-414 (1976).
102. Kaltreider, H.B., Kyselka, L. and Salmon, S.E.: Immunology of the lower respiratory tract. II. The plaque-forming response of canine lymphoid tissues to sheep erythrocytes after intrapulmonary or intra-immunization. J. Clin. Invest., 54:263-270 (1974).
103. Kaltreider, H.B., Turner, F.N. and Salmon, S.E.: A canine model for comparative study of respiratory and systemic immunological reactions. Am. Rev. Respir. Dis., 111:257-265 (1975).
104. Castello, M.D., Emmert, A.D., Denson, R.F. and Kishimoto, R.A.: Recovery of alveolar macrophages from rhesus and cynomolgus macaques by lung lavage. Am. J. Vet. Res., 40:271-273 (1979).
105. Kass, E.H., Green, G.M. and Goldstein, E.: Mechanisms of antibacterial action in the respiratory system. Bact. Rev., 30:488-496 (1966).
106. Kazmierowski, J.A., Gallin, J.T. and Reynolds, H.Y.: Mechanism for the inflammatory response in primate lungs. Demonstration and partial characterization of an alveolar macrophage-derived chemotactic factor with preferential activity for polymorphonuclear leukocytes. J. Clin. Invest., 59:273-281 (1977).
107. Kim, M., Goldstein, E., Lewis, J.P., Lippert, W. and Warshaver, D.: Murine pulmonary alveolar macrophages: Rates of bacterial ingestion, inactivation and destruction. J. Infect. Dis., 133:310-320 (1976).
108. Kolb, E.: Fisiología Veterinaria. 2a ed. Editorial Acribia, Zaragoza, 1976.
109. LaForce, F.M. and Huber, G.L.: Effect of a subacute extrapulmonary infection on antibacterial defense mechanism of the lung. Antimicrob. Ag. Chemother., 10:332-334 (1970).
110. LaForce, F.M., Mullane, J.F., Boehme, R.F., Kelly, W.J. and Huber, G.L.: The effect of pulmonary edema on bacterial defenses of the lung. J. Lab. Clin. Med., 82:631-648 (1973).

111. Larsen, G.L., Parrish, D.A. and Henson, P.M.: Lung defense. The paradox of inflammation. Chest, 83:1-5 (1983).
112. Laurenzi, G.A., Guarnieri, J.J., Endriga, R.B. and Carey, J.P.: Clearance of bacteria by the lower respiratory tract. Science, 142:1572-1573 (1963).
113. Laurenzi, G.A., Berman, L., First, M. and Kass, E.H.: A quantitative study of the deposition and clearance of bacteria in the murine lung. J. Clin. Invest., 43:759-768 (1964).
114. Laurenzi, G.A., Guarnieri, J.J. and Endriga, R.B.: Important determinants in pulmonary resistance to bacterial infection. Med. Thorac., 22: 48-59 (1965).
115. Laurenzi, G.A. and Guarnieri, J.J.: A study of the mechanisms of pulmonary resistance to infection: the relationship of bacterial clearance to ciliary and alveolar macrophage function. Am. Rev. Respir. Dis., 93:134-141 (1966).
116. Lillie, L.E. and Thomson, R.G.: The pulmonary clearance of bacteria by calves and mice. Can. J. Comp. Med., 36:129-137 (1972).
117. Lopez, A., Thomson, R.G. and Savan, M.: The pulmonary clearance of Pasteurella haemolytica in calves infected with Bovine Parainfluenza-3 virus. Can. J. Comp. Med., 40:385-391 (1976).
118. Lopez, A.: The pulmonary clearance of Pasteurella haemolytica and the bronchoalveolar cell morphology in calves infected with BVD virus or Mycoplasma bovis. Ph.D. Thesis. Faculty of Graduate Studies. University of Guelph. Ontario, Canada, 1981.
119. Lopez, A., Gilka, F., Lillie, L.E., Thomson, R.G., Maxie, M.G. and McMillan, I.: A mouse model for estimation of Pasteurella haemolytica deposition in calf lungs following aerosol exposure. Can. J. Comp. Med., 46:314-316 (1982).
120. Lopez, A., Maxie, M.G., Savan, M., Ruhnke, H.L., Thomson, R.G., Barnum, D.A. and Geissinger, H.D.: The pulmonary clearance of Pasteurella haemolytica in calves infected with Bovine Virus Diarrhea or Mycoplasma bovis. Can. J. Comp. Med., 46:302-306 (1982).
121. Lourenco, R.V.: Inhaled aerosols. Arch. Intern. Med., 131:21-22 (1973).
122. Loosli, C.G.: The pathogenesis and pathology of experimental type I pneumococcal pneumonia in the monkey. J. Exp. Med., 76:79 (1942).
123. Markham, R.J.F. and Wilkie, B.N.: Interaction between Pasteurella haemolytica and bovine alveolar macrophages: cytotoxic effect on macrophages and impaired phagocytosis. Am. J. Vet. Res., 41:18-22 (1980).

124. Markham, R.J.F. and Wilkie, B.N.: Influence of bronchoalveolar washing supernatant and stimulated lymphocyte supernatants on uptake of *P. haemolytica* by cultured bovine alveolar macrophages. Am. J. Vet. Res., 41:443-446 (1980).
125. Martin, S.W., Meek, A.H., Davis, D.G., Thomson, R.G., Johnson, J.A., Lopez, A., Stephens, L., Curtis, R.A., Prescott, J.F., Rosendal, S., Savan, M., Zubaidy, A.J. and Bolton, M.R.: Factors associated with mortality in feedlot cattle: The Bruce County beef cattle project. Can. J. Comp. Med., 44:1-10 (1980).
126. Martin, S.W., Meek, A.H., Johnson, J.A. and Curtis, R.A.: Factors associated with mortality and treatment costs in feedlot calves: The Bruce County beef project. Can. J. Comp. Med., 46:341-349 (1982).
127. Mauderly, J.L.: Bronchopulmonary lavage of small laboratory animals. Lab. Anim. Sci., 27:255-261 (1977).
128. McKercher, D.G.: Bovine respiratory infections. J. Am. Vet. Med. Ass., 152:729-737 (1968).
129. Medin, N.I., Osebold, J.W. and Zee, V.C.: A procedure for pulmonary lavage in mice. Am. J. Vet. Res., 37:237-238 (1976).
130. Mercer, T.T.: Production and characterization of aerosols. Arch. Intern. Med., 131:39-49 (1973).
131. Mims, C.A.: The pathogenesis of infectious disease. Academic Press, New York, 1977.
132. Muir, D.C.F. and Davies, C.N.: The deposition of 0.5  $\mu$  diameter aerosols in the lungs of man. Ann. Occupat. Hyg., 10:161-174 (1967).
133. Muscoplat, C.C., Johnson, D.W. and Stevens, J.B.: Abnormalities of *in vitro* lymphocyte response during Bovine Viral Diarrhea virus infection. Am. J. Vet. Res., 34:753-755 (1973).
134. Myrvik, Q.N., Leake, E.S., and Fariss, B.: Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit: a technique to produce them in a high state of purity. J. Immun., 86:128-132 (1961).
135. Newhouse, M., Sanchis, J. and Bienenstock, J.: Lung defense mechanisms. N. Engl. J. Med., 295:990-998 (1976).
136. Nugent, K.M. and Pesanti, E.L.: Staphylococcal clearance and pulmonary macrophage function during influenza infection. Infect. Immun., 38:1256-1262 (1982).
137. Onofrio, J.M., Toews, G.B., Lipscomb, M.F. and Pierce, A.K.: Granulocyte-alveolar-macrophage interaction in the pulmonary clearance of *Staphylococcus aureus*. Am. Rev. Respir. Dis., 127:335-341 (1983).
138. Palmes, E.D.: Measurement of pulmonary air spaces using aerosols. Arch. Intern. Med., 131:76-79 (1973).

139. Pennington, J.E.: Bronchoalveolar cell response to bacterial challenge in the immuno-suppressed lung. Am. Rev. Respir. Dis., 116:885-893 (1977).
140. Phillis, J.W.: Veterinary Physiology. W.B. Saunders. Philadelphia, 1976.
141. Pierce, A.K., Reynolds, R.C. and Harris, G.D.: Leukocytic response to inhaled bacteria. Am. Rev. Respir. Dis., 116:679-684 (1977).
142. Pierson, R.E. and Kainer, R.A.: Clinical classification of pneumonias in cattle. Bov. Pract., 15:73-79 (1980).
143. Raktoc, B.L. and Hubert, J.J.: Basic Applied Statistics. Marcel Dekker, New York, 1979.
144. Reynolds, H.Y., Kazmierowsky, J.A. and Newball, H.H.: Specificity of opsonic antibodies to enhance phagocytosis of Pseudomonas aeruginosa by human alveolar macrophages. J. Clin. Invest., 56:376-385 (1975).
145. Robertson, O.H.: Phagocytosis of foreign material in the lung. Phys. Rev., 21:112-139 (1941).
146. Rylander, R.: Measurement of different mechanisms for elimination of bacteria from the lung. Bact. Rev., 30:514-517 (1966).
147. Rylander, R.: Pulmonary defense mechanisms to airborne bacteria. Acta Phys. Scand., suppl. 306:1-89 (1968).
148. Rylander, R.: Alterations of lung defense mechanism against airborne bacteria. Arch. Environ. Hlth., 18:551-555 (1969).
149. Rylander, R., Snella, M.C. and Garcia, I.: Pulmonary cell response patterns after exposure to airborne bacteria. Scand. J. Respir. Dis., 56:195 (1975).
150. Saunders, J.R., Sebunya, T.N.K. and Osborne, A.D.: Pulmonary clearance of Bacillus subtilis spores in pigs. Can. J. Comp. Med., 47:43-47 (1983).
151. Schiefer, B., Ward, G.E. and Moffatt, R.E.: Correlation of microbiological and histopathological findings in bovine fibrinous pneumonia. Vet. Path., 15:313-321 (1978).
152. Schwartz, L.W. and Christman, C.A.: Alveolar macrophage migration, influence of lung lining material and acute lung insult. Am. Rev. Respir. Dis., 120:429-439 (1979).
153. Sebunya, T.N.K. and Saunders, J.R.: Studies on immunity to Haemophilus pleuropneumoniae infections in mice. Am. J. Vet. Res., 43:1793-1798 (1982).

154. Sebunya, T.N.K., Saunders, J.R. and Osborne, A.D.: Dose response relationship of Haemophilus pleuropneumoniae aerosols in pigs. Can. J. Comp. Med., 47:54-56 (1983).
155. Shurin, P.A., Permutt, S. and Riley, R.L.: Pulmonary antibacterial defenses with pure oxygen breathing. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 137: 1202-1208 (1971).
156. Sieger, L.: Pulmonary alveolar macrophages in pre- and post-natal rabbits. J. Reticuloendothel. Soc., 23:389-395 (1978).
157. Snella, M.C. and Rylander, R.: Lung cell reactions after inhalation of bacterial lipopolysaccharides. Eur. J. Respir. Dis., 63:550-557 (1982).
158. Southern, P.M., Pierce, A.K. and Sanford, J.P.: Clearance of Serratia marcescens from lungs of normal mice. Infect. Immun., 3:187-188 (1971).
159. Southern, P.M., Pierce, A.K. and Sanford, J.P.: Comparison of the pulmonary bactericidal capacity of mice and rats against strains of Pseudomonas aeruginosa. Appl. Microb., 21:377-378 (1971).
160. Spencer, J.C., Waldman, R.H. and Johnson, J.E.: III. Local and systemic cell mediated immunity after immunization of guinea pigs with live or killed M. tuberculosis by various routes. J. Immun., 112:1322-1328 (1974).
161. Stillman, E.G.: The presence of bacteria in the lungs of mice following inhalation. J. Exp. Med., 38:117-126 (1923).
162. Stillman, E.G. and Branch, A.: Experimental production of Pneumococcus pneumonia in mice by the inhalation method. J. Exp. Med., 40:733-742 (1924).
163. Stillman, E.G.: The susceptibility of mice to inhaled type III Pneumococci. J. Infect. Dis., 62:65-69 (1938).
164. Straw, B.E., Neubauer, G.D. and Leman, A.D.: Factors affecting mortality in finishing pigs. J. Am. Vet. Med. Ass., 183:452-455 (1983).
165. Stuart, B.O.: Deposition of inhaled aerosols. Arch. Intern. Med., 131: 60-73 (1973).
166. Swenson, M.J.: Dukes' Physiology of Domestic Animals. 9th ed. Comstock Publishing, Ithaca, 1977.
167. Thomson, R.G. and Gilka, F.: A brief review of pulmonary clearance of bacterial aerosols emphasizing aspects of particular relevance to veterinary medicine. Can. Vet. J., 15:99-107 (1974).
168. Thrall, R.S., Barton, R.W., D'Amato, D.A. and Sulavik, S.B.: Differential cellular analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained at various stages during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. Am. Rev. Respir. Dis., 126:488-492 (1982).

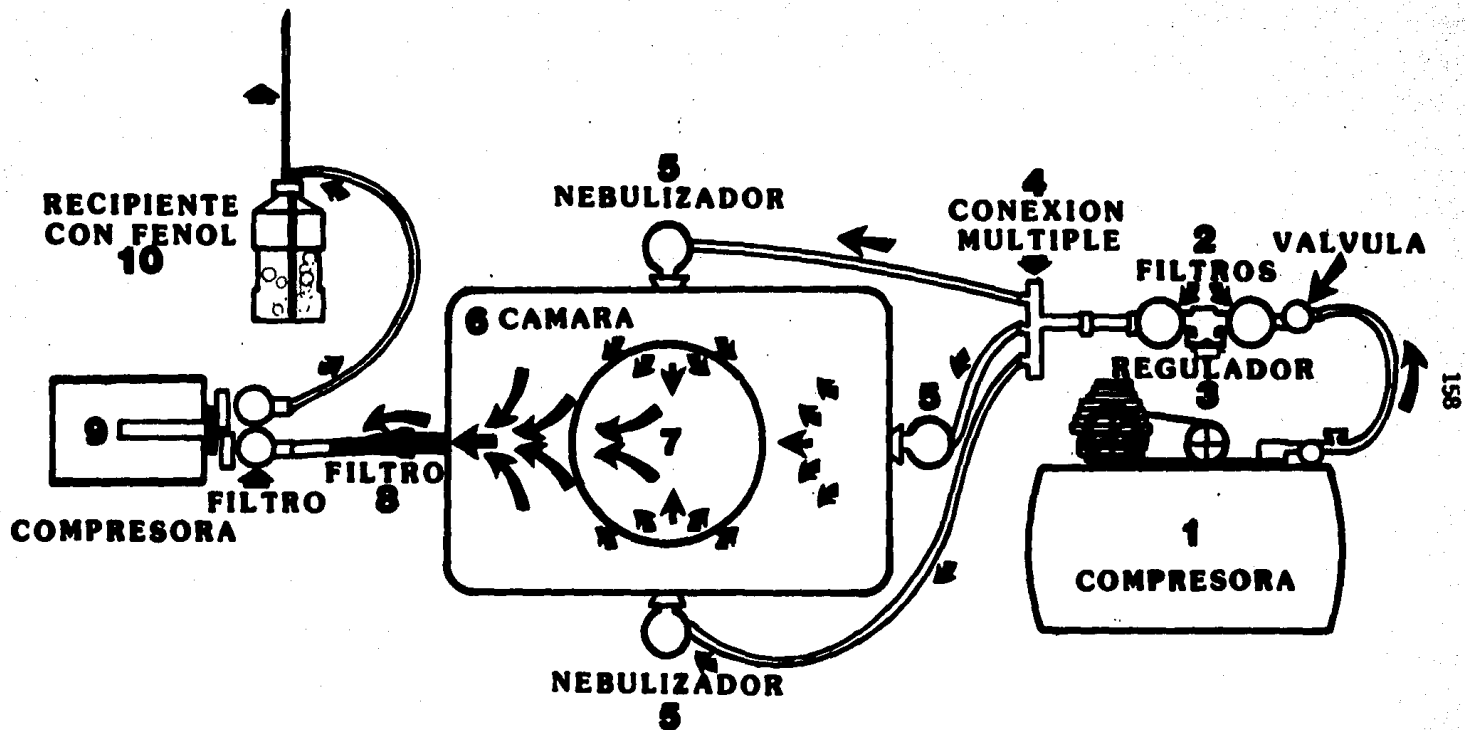
169. Toews, G.B., Gross, G.N. and Pierce, A.K.: The effect of inoculum size on bacterial clearance. Am. Rev. Respir. Dis., suppl. 117:406 (1978).
170. Trigo, E., Trigo, F., Hernández, G., Ramírez, C. y Berruecos, M.: Patología y bacteriología de pulmones neumónicos de becerros. Vet. Méx., 13: 131-140 (1982).
171. Veit, H.P. and Farrell, R.L.: The anatomy and physiology of the bovine respiratory system relating to pulmonary disease. Cornell Vet., 68: 555-581 (1978).
172. Veit, H.P., Farrell, R.L. and Troutt, H.F.: Pulmonary clearance of Serratia marcescens in calves. Am. J. Vet. Res., 39:1646-1650 (1978).
173. Waldman, R.H. and Henney, C.S.: Cell mediated immunity and antibody response in the respiratory tract after local and systemic immunization. J. Exp. Med., 134:482-494 (1971).
174. Walker, R.D., Corstuet, R.E., Lessley, B.A. and Panciera, R.J.: Study of bovine pulmonary response to Pasteurella haemolytica: specificity of immunoglobulins isolated from the bovine lung. Am. J. Vet. Res., 41: 1015-1023 (1980).
175. Warr, G.A., Martin, R.R., Sharp, P.M. and Rossen, R.D.: Normal human bronchial immunoglobulins and proteins. Effect of cigarette smoking. Am. Rev. Respir. Dis., 116:25-30 (1977).
176. Wells, W.F.: Airborne infection. II. Droplets and droplet nuclei. Am. J. Hyg., 20:611-618 (1934). Cited by Thomson, R.G. and Gilka, F.: A brief review of pulmonary clearance of bacterial aerosols emphasizing aspects of particular relevance to veterinary medicine. Can. Vet. J., 15:99-107 (1974).
177. Wells, W.F. and Wells, M.W.: Airborne infection. J. Am. Med. Ass., 107:1698-1703 (1936).
178. Williams, P.P.: Collection and cultivation of and phagocytosis by pulmonary alveolar macrophages obtained from hysterectomy-derived pigs. Am. J. Vet. Res., 39:485-489 (1978).
179. Wood, W.B.: Studies on the mechanism of recovery in pneumococcal pneumonia. I. The action of type specific antibody upon the pulmonary lesion of experimental pneumonia. J. Exp. Med., 73:201 (1941). Cited by Pierce, A.K., Reynolds, R.C. and Harris, G.D.: Leukocytic response to inhaled bacteria. Am. Rev. Respir. Dis., 116:679-684 (1977).
180. Wood, W.B. and Irons, E.N.: Studies on the mechanism of recovery in pneumococcal pneumonia. II. The effect of sulfonamide therapy upon the pulmonary lesion of experimental pneumonia. J. Exp. Med., 84:365 (1946).

**A P E N D I C E**





Apéndice 1. Aparato de inoculación por aerosol



Apéndice 2. Aparato de inoculación por aerosol (Diagrama de flujo de aire)

APENDICE 3. NUMERO DE BACTERIAS POR GRAMO DE PULMON (COLGRPUL) DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P) Y DE S. AUREUS (GRUPO S) EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	Nº de réplica	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)								
		0	1	2	4	8	12	24	48	72
P	1	$3.5 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$6.0 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$	0	0	$1.0 \times 10^4$	$9.3 \times 10^3$
P	2	$7.4 \times 10^5$	$3.4 \times 10^5$	$8.3 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$3.4 \times 10^5$	$8.1 \times 10^2$	0	0	0
P	3	$7.3 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$7.9 \times 10^5$	$4.4 \times 10^4$	$5.5 \times 10^3$	0	0	$5.5 \times 10^2$	0
Total de grupo	media ± D.E.	$6.09 \times 10^5$ $3.5 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$ $1.2 \times 10^5$	$5.9 \times 10^5$ $3.8 \times 10^5$	$9.1 \times 10^4$ $1.0 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$ $2.7 \times 10^5$	$2.7 \times 10^2$ $4.3 \times 10^2$	0 0	$3.8 \times 10^3$ $8.7 \times 10^3$	$3.1 \times 10^3$ $7.6 \times 10^3$
S	1	$8.1 \times 10^5$	$5.8 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$5.8 \times 10^4$	$5.8 \times 10^3$	$6.8 \times 10^2$	0	0
S	2	$1.1 \times 10^6$	$7.8 \times 10^5$	$4.3 \times 10^5$	$7.6 \times 10^4$	$7.1 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$	$3.2 \times 10^3$	0	0
S	3	$1.0 \times 10^6$	$7.7 \times 10^5$	$3.3 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$1.4 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$1.2 \times 10^3$	0	$2.5 \times 10^2$
Total de grupo	media ± D.E.	$9.9 \times 10^5$ $4.8 \times 10^5$	$7.1 \times 10^5$ $2.0 \times 10^5$	$4.3 \times 10^5$ $1.8 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$ $4.7 \times 10^4$	$4.8 \times 10^4$ $3.7 \times 10^4$	$9.7 \times 10^3$ $6.1 \times 10^3$	$1.7 \times 10^3$ $1.2 \times 10^3$	0 0	$8.4 \times 10^1$ $1.3 \times 10^2$

D.E. = Desviación estándar

APENDICE 4. NUMERO DE BACTERIAS POR RATON (COLRATON) OBTENIDO DESPUES DE LA INOCULACION CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P) Y DE S. AUREUS (GRUPO S) EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	Nº de réplica	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)								
		0	1	2	4	8	12	24	48	72
P	1	$8.4 \times 10^4$	$4.8 \times 10^4$	$4.8 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$5.9 \times 10^3$	0	0	$4.5 \times 10^3$	$3.0 \times 10^3$
P	2	$1.6 \times 10^5$	$9.9 \times 10^4$	$2.6 \times 10^5$	$4.0 \times 10^4$	$6.6 \times 10^4$	$1.6 \times 10^2$	0	0	0
P	3	$1.9 \times 10^5$	$7.6 \times 10^4$	$2.0 \times 10^5$	$1.7 \times 10^4$	$1.6 \times 10^3$	0	0	$1.0 \times 10^2$	0
Total de grupo	media ± D.E.	$1.5 \times 10^5$ $9.8 \times 10^4$	$7.4 \times 10^4$ $3.1 \times 10^4$	$1.7 \times 10^5$ $1.1 \times 10^5$	$2.4 \times 10^4$ $2.1 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$ $5.2 \times 10^4$	$5.5 \times 10^1$ $8.8 \times 10^1$	0 0	$1.5 \times 10^3$ $3.7 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$ $2.4 \times 10^3$
S	1	$2.1 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$9.2 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$	$1.7 \times 10^3$	$2.0 \times 10^2$	0	0
S	2	$2.2 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$9.8 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$	$3.0 \times 10^3$	$7.6 \times 10^2$	0	0
S	3	$2.1 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$6.6 \times 10^4$	$3.4 \times 10^4$	$6.5 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	$4.0 \times 10^2$	0	$1.0 \times 10^2$
Total de grupo	media ± D.E.	$2.1 \times 10^5$ $7.8 \times 10^4$	$1.7 \times 10^5$ $2.6 \times 10^4$	$8.5 \times 10^4$ $4.1 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$ $7.6 \times 10^3$	$1.2 \times 10^4$ $6.9 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$ $8.9 \times 10^2$	$4.5 \times 10^2$ $3.0 \times 10^2$	0 0	$3.3 \times 10^1$ $5.5 \times 10^1$

D.E. = Desviación estándar

APENDICE 5 . PRUEBAS DE DUNCAN PARA COMPARACION DE MEDIAS DE LAS VARIABLES COLGRPUL, COLLOG Y COLRATON EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION (HORAS) DE RATONES EXPUESTOS A AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA.

Hora	N.	COLGRPUL	COLLOG	COLRATON
0	15	A	A	A
1	6	B	A B	B
2	6	A	A B	A
4	6	B	A B	B
8	6	B	B	B
12	6	B	C	B
24	6	B	D	B
48	6	B	C	B
72	6	B	C D	B

Medias en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )

Las medias de las variables COLGRPUL y COLRATON se encuentran en los cuadros 16y 17.

APENDICE 6 . PRUEBAS DE DUNCAN PARA COMPARACION DE MEDIAS DE LAS VARIABLES COLGRPUL, COLLOG Y COLRATON EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION (HORAS) DE RATONES EXPUESTOS A AEROSOLES DE S. AUREUS.

Hora	N.	COLGRPUL	COLLOG	COLRATON
0	15	A	A	A
1	6	A B	A	A
2	6	B C	B	B
4	6	C D	C	B C
8	6	D	D	C
12	6	D	E	C
24	6	D	F	C
48	6	D	G	C
72	6	D	H	C

Medias en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )

Las medias de las variables COLGRPUL Y COLRATON se encuentran en los cuadros 16y 17.

APENDICE 7. INDICES O PORCENTAJES DE RETENCION BACTERIANA (INRET) OBTENIDOS DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA Y DE S. AUREUS EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	Nº de réplica	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)								
		0	1	2	4	8	12	24	48	72
P	1	100	37.58	48.11	16.98	5.29	0	0	3.07	2.65
	2	100	46.31	112.24	23.08	47.05	0.11	0	0	0
	3	100	35.60	108.87	6.07	0.75	0.	0	0.08	0
Total de grupo	media	100	39.83	89.74	15.38	17.70	0.0368	0	1.04	0.883
	± D.E.	0	18.85	43.45	14.16	37.72	0.0591	0	2.49	2.16
S	1	100	72.40	64.42	17.88	7.22	0.726	0.084	0	0
	2	100	67.31	37.63	6.59	6.17	1.09	0.280	0	0
	3	100	77.47	33.15	15.96	1.49	1.06	0.127	0	0.025
Total de grupo	media	100	72.39	45.06	13.48	4.96	0.959	0.164	0	0.0084
	± D.E.	0	20.87	22.48	6.03	4.12	0.514	0.095	0	0.013

D.E. = Desviación estándar

APENDICE 8. INDICES O PORCENTAJES DE REMOCION BACTERIANA (INREM) OBTENIDOS DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P) Y S. AUREUS (GRUPO S) EN DOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	Nº de réplica	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)								
		0	1	2	4	8	12	24	48	72
P	1	0	62.41	51.88	83.01	94.70	100	100	96.92	97.35
	2	0	53.68	13.20	76.91	52.94	99.89	100	100	100
	3	0	64.39	4.47	93.93	99.24	100	100	99.92	100
Total de grupo	media	0	60.16	*10.28	84.61	82.29	99.96	100	98.95	99.11
	D.E.	0	18.85	-----	14.16	37.32	0.059	0	2.49	2.16
S	1	0	28.94	35.57	82.11	92.77	99.27	99.91	100	100
	2	0	32.68	62.36	93.40	93.82	98.91	99.72	100	100
	3	0	22.52	66.85	84.03	98.50	98.93	99.87	100	99.97
Total de grupo	media	0	28.05	54.93	86.51	95.03	99.04	99.83	100	99.99
	D.E.	0	20.10	22.48	6.03	4.12	0.514	0.095	0	0.013

D.E. = Desviación estándar

\* El índice de remoción se ajustó con respecto al de retención, debido a valores negativos en las réplicas 2 y 3.

APENDICE 9. PRUEBAS DE DUNCAN PARA COMPARAR MEDIAS DE LAS VARIABLES INRET, INRETLOG, INREM E INREMLOG EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION (HORAS) EN RATONES EXPUESTOS A AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA.

Hora	N.	INRET	INRETLOG	INREM	INREMLOG
0	15	A	A	C	B
1	6	B	A B	B	A
2	6	A	A	C	B
4	6	B	B C	B A	A
8	6	B	C	B A	A
12	6	B	D	A	A
24	6	B	D	A	A
48	6	B	D	A	A
72	6	B	D	A	A

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )  
Las medias de las variables se encuentran en los cuadros 19y 20.

APENDICE 10. PRUEBAS DE DUNCAN PARA COMPARACION DE MEDIAS DE LAS VARIABLES INRET, INRETLOG, INREM E INREMLOG EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION (HORAS) EN RATONES EXPUESTOS A AEROSOLES DE S. AUREUS.

Hora	N.	INRET	INRETLOG	INREM	INREMLOG
0	15	A	A	C	B
1	6	A B	A	C	A
2	6	B C	B	B	A
4	6	C D	C	A	A
8	6	D	D	A	A
12	6	D	E	A	A
24	6	D	F	A	A
48	6	D	G	A	A
72	6	D	G	A	A

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )  
Las medias de las variables se encuentran en los cuadros 19y 20 .



APENDICE 11. PESOS DE LOS RATONES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE LA REMOCION BACTERIANA PULMONAR.

Grupo	Nº de ratones	peso vivo(g) media $\pm$ D.E.	peso del pulmón (mg) media $\pm$ D.E.	PORPVIVO(%) media $\pm$ D.E.
<u>P. haemolytica</u>	63	26.04 $\pm$ 5.05	296.79 $\pm$ 88.87	1.15 $\pm$ 0.32
<u>S. aureus</u>	63	23.41 $\pm$ 3.25	259.84 $\pm$ 102.01	1.12 $\pm$ 0.45
Población total	126	24.72 $\pm$ 4.43	278.31 $\pm$ 97.07	1.14 $\pm$ 0.39

D.E. = Desviación estándar

PORPVIVO = Porcentaje que representa el peso pulmonar respecto a peso vivo

APENDICE 12. NUMERO DE CELULAS NUCLEADAS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (NUCENUC) DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS CON SOLUCION AMORTIGUADORA (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	Nº de réplica	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)											
		0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300	
P	1	$1.8 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$	$1.9 \times 10^5$	$3.8 \times 10^5$	$9.3 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$3.3 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	ND	
P	2	$6.6 \times 10^4$	$1.8 \times 10^5$	$7.1 \times 10^4$	$3.9 \times 10^5$	$5.6 \times 10^5$	$1.1 \times 10^6$	$8.6 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	$8.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	
P	3	$1.3 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$2.1 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$	$8.3 \times 10^5$	$3.8 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$7.3 \times 10^4$	
Total de grupo	media	$7.2 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$9.2 \times 10^4$	$9.1 \times 10^5$	$8.2 \times 10^5$	$9.4 \times 10^5$	$6.2 \times 10^5$	$2.9 \times 10^5$	$2.7 \times 10^5$	$4.8 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	
	± D.E.	$6.1 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$6.9 \times 10^4$	$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$9.1 \times 10^5$	$5.1 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$5.4 \times 10^5$	$5.7 \times 10^4$	
S	1	$1.3 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$	$9.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$6.3 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$	$6.6 \times 10^4$	$4.0 \times 10^4$	
S	2	$5.3 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$7.3 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$4.6 \times 10^4$	$8.6 \times 10^4$	$8.0 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5$	$8.5 \times 10^4$	$8.3 \times 10^4$	$3.5 \times 10^4$	
S	3	$7.5 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$7.3 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	$8.6 \times 10^4$	$9.5 \times 10^4$	$3.3 \times 10^4$	$6.1 \times 10^4$	$4.6 \times 10^4$	$6.3 \times 10^4$	$2.1 \times 10^5$	
Total de grupo	media	$8.6 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$	$8.7 \times 10^4$	$9.7 \times 10^4$	$7.4 \times 10^4$	$9.3 \times 10^4$	$7.8 \times 10^4$	$9.0 \times 10^4$	$6.0 \times 10^4$	$7.1 \times 10^4$	$9.6 \times 10^4$	
	± D.E.	$5.4 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$	$3.0 \times 10^4$	$7.1 \times 10^4$	$6.3 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$	$4.4 \times 10^4$	$6.0 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	$5.1 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	
T	1	media	$4.8 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$	$4.0 \times 10^4$	$2.8 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$8.3 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$
		± D.E.	$0.70 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$3.7 \times 10^4$	$1.6 \times 10^5$	$4.0 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$5.1 \times 10^4$	$4.4 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$

D.E. = Desviación estándar

ND = No determinado

APENDICE 13. NUMERO DE CELULAS POR GRAMO DE PESO VIVO (CEGRPV) OBTENIDO POR LAVADOS BRONQUIO-ALVEOLARES DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	Nº de réplica	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
		0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	1	6.1x10 <sup>2</sup>	9.9x10 <sup>2</sup>	1.7x10 <sup>3</sup>	6.1x10 <sup>3</sup>	1.1x10 <sup>4</sup>	3.7x10 <sup>3</sup>	7.2x10 <sup>3</sup>	1.1x10 <sup>4</sup>	6.6x10 <sup>3</sup>	9.9x10 <sup>3</sup>	ND
P	2	2.8x10 <sup>3</sup>	7.9x10 <sup>3</sup>	3.3x10 <sup>3</sup>	1.5x10 <sup>4</sup>	2.1x10 <sup>4</sup>	4.6x10 <sup>4</sup>	3.2x10 <sup>4</sup>	6.7x10 <sup>3</sup>	1.8x10 <sup>4</sup>	2.8x10 <sup>4</sup>	5.5x10 <sup>3</sup>
P	3	5.1x10 <sup>3</sup>	4.0x10 <sup>3</sup>	6.3x10 <sup>3</sup>	8.4x10 <sup>4</sup>	5.9x10 <sup>4</sup>	8.4x10 <sup>4</sup>	2.7x10 <sup>4</sup>	1.6x10 <sup>4</sup>	7.0x10 <sup>3</sup>	8.1x10 <sup>3</sup>	2.8x10 <sup>3</sup>
Total de grupo	media	2.8x10 <sup>3</sup>	4.3x10 <sup>3</sup>	3.8x10 <sup>3</sup>	3.5x10 <sup>4</sup>	3.0x10 <sup>4</sup>	4.4x10 <sup>4</sup>	2.2x10 <sup>4</sup>	1.1x10 <sup>4</sup>	1.0x10 <sup>4</sup>	1.6x10 <sup>4</sup>	4.1x10 <sup>3</sup>
	± D.E.	2.2x10 <sup>3</sup>	4.8x10 <sup>3</sup>	2.5x10 <sup>3</sup>	4.1x10 <sup>4</sup>	3.8x10 <sup>4</sup>	4.5x10 <sup>4</sup>	1.6x10 <sup>4</sup>	9.1x10 <sup>3</sup>	6.5x10 <sup>3</sup>	1.9x10 <sup>4</sup>	2.0x10 <sup>3</sup>
S	1	4.7x10 <sup>3</sup>	9.0x10 <sup>3</sup>	4.1x10 <sup>3</sup>	6.2x10 <sup>3</sup>	4.2x10 <sup>3</sup>	4.1x10 <sup>3</sup>	5.4x10 <sup>3</sup>	2.4x10 <sup>3</sup>	2.2x10 <sup>3</sup>	2.5x10 <sup>3</sup>	1.7x10 <sup>3</sup>
S	2	2.2x10 <sup>3</sup>	5.9x10 <sup>3</sup>	3.1x10 <sup>3</sup>	6.1x10 <sup>3</sup>	2.0x10 <sup>3</sup>	3.8x10 <sup>3</sup>	3.0x10 <sup>3</sup>	5.9x10 <sup>3</sup>	3.1x10 <sup>3</sup>	3.6x10 <sup>3</sup>	1.3x10 <sup>3</sup>
S	3	3.3x10 <sup>3</sup>	4.5x10 <sup>3</sup>	3.1x10 <sup>3</sup>	1.3x10 <sup>3</sup>	3.2x10 <sup>3</sup>	3.7x10 <sup>3</sup>	1.4x10 <sup>3</sup>	2.5x10 <sup>3</sup>	1.7x10 <sup>3</sup>	2.1x10 <sup>3</sup>	6.8x10 <sup>3</sup>
Total de grupo	media	3.4x10 <sup>3</sup>	6.5x10 <sup>3</sup>	3.5x10 <sup>3</sup>	4.5x10 <sup>3</sup>	3.1x10 <sup>3</sup>	3.9x10 <sup>3</sup>	3.2x10 <sup>3</sup>	3.6x10 <sup>3</sup>	2.3x10 <sup>3</sup>	2.7x10 <sup>3</sup>	3.3x10 <sup>3</sup>
	± D.E.	1.8x10 <sup>3</sup>	2.2x10 <sup>3</sup>	8.2x10 <sup>2</sup>	3.3x10 <sup>3</sup>	2.5x10 <sup>3</sup>	6.1x10 <sup>2</sup>	1.9x10 <sup>3</sup>	2.4x10 <sup>3</sup>	8.5x10 <sup>2</sup>	2.0x10 <sup>3</sup>	3.2x10 <sup>3</sup>
T	1 media	1.8x10 <sup>3</sup>	1.7x10 <sup>3</sup>	1.7x10 <sup>3</sup>	1.3x10 <sup>4</sup>	7.6x10 <sup>3</sup>	7.5x10 <sup>3</sup>	7.4x10 <sup>3</sup>	3.6x10 <sup>3</sup>	5.2x10 <sup>3</sup>	1.0x10 <sup>4</sup>	5.8x10 <sup>3</sup>
	± D.E.	9.2x10 <sup>1</sup>	4.0x10 <sup>2</sup>	1.6x10 <sup>3</sup>	8.2x10 <sup>3</sup>	2.0x10 <sup>3</sup>	4.1x10 <sup>3</sup>	8.0x10 <sup>3</sup>	2.1x10 <sup>3</sup>	1.9x10 <sup>3</sup>	1.2x10 <sup>2</sup>	6.0x10 <sup>2</sup>

D.E = Desviación estándar

ND = No determinado

APENDICE 14. PRUEBAS DE DUNCAN PARA COMPARACION DE MEDIAS DEL NUMERO DE CELULAS NUCLEADAS POR ML DE LAVADO (NUCENUC), SU TRANSFORMACION LOGARITMICA (NUCENLOG) Y EL NUMERO DE CELULAS POR GRAMO DE PESO VIVO (CEGRPV) EN RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T).

Hora	Variable = N U C E N U T C			N U C E S N L O G			C E G S R P T V			
	Grupo =	P	S	T	P	S	T	P	S	T
0		D	B	AB	C	AB	ABC	C	B	B
1		D	A	AB	C	AB	BC	C	A	B
2		D	B	B	C	AB	C	C	B	B
4		AB	AB	A	A	AB	A	AB	AB	A
8		ABC	B	AB	A	B	ABC	AB	B	AB
12		A	AB	AB	A	AB	AB	A	B	AB
24		ABCD	B	AB	A	B	ABC	ABC	B	AB
48		BCD	AB	AB	AB	AB	ABC	BC	B	AB
72		CD	B	AB	AB	B	ABC	BC	B	AB
150		ABCD	B	AB	A	B	A	BC	B	AB
300		C	AB	AB	BC	B	ABC	C	B	AB

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )  
 Medias de las variables están contenidas en los cuadros 24 y 25

APENDICE 15. PORCENTAJE DE NEUTROFILOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (CUDIFN) OBTENIDO EN LAS CUENTAS DIFERENCIALES DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P); S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACIÓN.

Grupo	Nº de réplica	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
		0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	1	0.78	20.0	40.45	88.63	97.92	98.48	85.83	41.58	14.20	2.25	ND
P	2	0.50	2.50	82.87	94.37	94.56	96.38	90.06	15.56	12.63	43.94	16.92
P	3	4.75	36.83	83.74	96.67	96.85	95.81	86.78	44.29	7.62	4.25	2.25
Total de grupo	media	2.00	19.77	69.02	93.22	96.44	96.08	87.55	33.81	11.48	19.73	9.58
	± D.E.	2.97	27.01	22.40	4.10	2.78	2.28	2.83	30.77	8.03	37.85	11.85
S	1	13.50	3.12	2.75	1.88	2.13	4.00	4.75	2.62	5.87	3.25	5.25
S	2	0.92	2.87	1.25	16.12	2.50	3.50	1.25	1.00	0.37	1.25	2.75
S	3	0.37	0.25	0.12	0.00	1.50	3.33	1.50	0.00	0.37	0.16	0.12
Total de grupo	media	4.93	2.08	1.37	6.00	2.04	3.61	2.50	1.20	2.20	1.56	2.70
	± D.E.	9.40	2.04	1.90	8.97	1.55	2.64	2.40	1.20	4.31	1.79	2.91
T	media	0.62	0.50	0.25	1.62	0.00	0.00	1.00	0.00	0.25	0.62	0.54
	± D.E.	0.53	0.70	0.35	1.59	0.00	0.00	0.70	0.00	0.35	0.88	0.41

D.E. = Desviación estándar

ND = No determinado

APENDICE 16. PORCENTAJE DE MACROFAGOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (CUDIFM) OBTENIDO DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE *P. HAEMOLYTICA* (GRUPO P), *S. AUREUS* (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	Nº de réplica	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
		0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	1	99.22	80.0	59.55	11.37	2.08	1.52	14.17	58.42	85.80	97.75	ND
P	2	99.50	97.50	17.13	5.63	5.44	3.62	9.94	84.44	87.37	56.06	83.08
P	3	95.25	63.17	16.26	3.33	3.15	4.19	13.12	55.71	92.38	95.75	97.75
Total de grupo	media	97.99	80.22	30.97	6.77	3.55	3.11	12.44	66.19	88.51	80.28	90.41
	± D.E.	2.97	27.01	22.40	4.10	2.78	2.28	2.83	30.77	8.03	37.85	11.85
S	1	86.50	96.88	97.25	98.12	97.87	96.0	95.25	97.38	94.13	96.75	94.75
S	2	99.08	97.13	98.75	83.88	97.50	96.50	98.75	99.0	99.63	98.75	97.25
S	3	99.63	99.75	99.88	100.0	98.50	96.67	98.50	100.0	99.63	99.84	99.88
Total de grupo	media	95.07	97.91	98.62	94.00	97.95	96.39	97.50	98.79	97.79	98.44	97.29
	± D.E.	9.40	2.04	1.90	8.97	1.55	2.64	2.40	1.20	4.31	1.79	2.91
T	media	99.38	99.50	99.75	98.38	100.0	100.0	99.0	100.0	99.75	99.38	99.46
	± D.E.	0.53	0.70	0.35	1.59	0	0.	0.70	0	0.35	0.88	0.41

D.E. = Desviación estándar  
 ND = No determinado

APENDICE 17. PRUEBAS DE DUNCAN PARA COMPARACION DE MEDIAS DEL PORCENTAJE DE NEUTROFILOS (CUDIFN) Y MACROFAGOS (CUDIFM) EN RATONES EXPUESTOS A AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T).

Hora	Variable = Grupo =	C U D I F N			P C U D I F M		
		P	S	T	P	S	T
0		D	A	A	A	A	A
1		CD	A	A	AB	A	A
2		B	A	A	CD	A	A
4		A	A	A	D	A	A
8		A	A	A	D	A	A
12		A	A	A	D	A	A
24		AB	A	A	BCD	A	A
48		C	A	A	B	A	A
72		CD	A	A	AB	A	A
150		CD	A	A	AB	A	A
300		CD	A	A	AB	A	A

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )  
 Medias de las variables están contenidas en los cuadros 27 y 28.

APENDICE 18. NUMERO ABSOLUTO DE NEUTROFILOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (NUABSN) OBTENIDO DE RATONES EXPUESTOS A AEROSOL DE *P. HAEMOLYTICA* (GRUPO P), *S. AUREUS* (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	Nº de réplica	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
		0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	1	$1.4 \times 10^2$	$5.2 \times 10^3$	$1.7 \times 10^4$	$1.7 \times 10^5$	$3.7 \times 10^5$	$9.2 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$2.9 \times 10^4$	$6.0 \times 10^3$	ND
P	2	$4.0 \times 10^2$	$7.8 \times 10^3$	$5.9 \times 10^4$	$3.7 \times 10^5$	$5.4 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$	$7.8 \times 10^5$	$2.7 \times 10^4$	$4.7 \times 10^4$	$6.2 \times 10^5$	$2.9 \times 10^4$
P	3	$7.9 \times 10^3$	$2.5 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5$	$2.1 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$7.4 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$1.1 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$	$1.7 \times 10^3$
Total de grupo	media	$2.8 \times 10^3$	$1.2 \times 10^4$	$6.9 \times 10^4$	$8.8 \times 10^5$	$7.8 \times 10^5$	$9.1 \times 10^5$	$5.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$2.9 \times 10^4$	$2.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^3$
	± D.E.	$5.8 \times 10^3$	$1.4 \times 10^4$	$6.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^6$	$9.5 \times 10^5$	$8.8 \times 10^5$	$4.6 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$2.8 \times 10^4$	$5.5 \times 10^5$	$2.4 \times 10^4$
S	1	$1.1 \times 10^4$	$6.5 \times 10^3$	$2.9 \times 10^3$	$3.5 \times 10^3$	$2.6 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	$5.9 \times 10^3$	$1.5 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3$	$2.7 \times 10^3$	$1.8 \times 10^3$
S	2	$6.2 \times 10^2$	$4.8 \times 10^3$	$1.1 \times 10^3$	$2.1 \times 10^4$	$1.3 \times 10^3$	$3.2 \times 10^3$	$1.1 \times 10^3$	$1.4 \times 10^3$	$3.2 \times 10^2$	$2.5 \times 10^2$	$7.7 \times 10^2$
S	3	$3.0 \times 10^2$	$2.7 \times 10^2$	$9.1 \times 10^1$	0	$1.6 \times 10^3$	$3.2 \times 10^3$	$8.0 \times 10^2$	0	$1.5 \times 10^2$	$7.1 \times 10^1$	$1.6 \times 10^2$
Total de grupo	media	$4.0 \times 10^3$	$3.8 \times 10^3$	$1.4 \times 10^3$	$8.4 \times 10^3$	$1.8 \times 10^3$	$3.2 \times 10^3$	$2.6 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	$9.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$	$9.1 \times 10^2$
	± D.E.	$6.5 \times 10^3$	$4.1 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$1.4 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	$3.1 \times 10^3$	$9.0 \times 10^2$	$1.5 \times 10^3$	$1.9 \times 10^3$	$8.3 \times 10^2$
T	1 media	$2.8 \times 10^2$	$2.8 \times 10^2$	$3.3 \times 10^1$	$5.9 \times 10^3$	0	0	$1.1 \times 10^3$	0	$3.8 \times 10^2$	$1.5 \times 10^3$	$8.8 \times 10^2$
	± D.E.	$2.1 \times 10^2$	$4.0 \times 10^2$	$4.7 \times 10^1$	$7.2 \times 10^3$	0	0	$6.5 \times 10^2$	0	$5.4 \times 10^2$	$2.2 \times 10^3$	$7.8 \times 10^2$

D.E. = Desviación estándar

ND = No determinado



APENDICE 19. PRUEBAS DE DUNCAN PARA COMPARACION DE MEDIAS DEL NUMERO ABSOLUTO DE NEUTROFILOS (NUABSN) Y SU TRANSFORMACION LOGARITMICA (NABNLOG) EN RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T).

Hora	Variable =	N U A B S N			P N A B N L O G		
	Grupo =	P	S	T	P	S	T
0		C	AB	A	D	AB	AB
1		C	AB	A	CD	A	AB
2		C	B	A	AB	AB	AB
4		A	A	A	A	AB	A
8		AB	B	A	A	AB	AB
12		A	AB	A	A	A	AB
24		ABC	B	A	A	AB	AB
48		C	B	A	AB	AB	B
72		C	B	A	BC	AB	AB
150		BC	B	A	BC	B	AB
300		C	B	A	BC	AB	AB

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )  
 Medias de las variables están contenidas en el cuadro 30.

APENDICE 20. NUMERO ABSOLUTO DE MACROFAGOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (NUABSM) OBTENIDO DE RATONES EXPUESTOS A AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	Nº de réplica	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)											
		0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300	
P	1	$1.8 \times 10^4$	$1.9 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	$7.8 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$	$2.5 \times 10^4$	$1.7 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	ND	
P	2	$6.6 \times 10^4$	$1.8 \times 10^5$	$1.2 \times 10^4$	$1.9 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	$5.1 \times 10^4$	$8.7 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	
P	3	$1.2 \times 10^5$	$9.2 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$	$6.7 \times 10^4$	$7.3 \times 10^4$	$5.1 \times 10^4$	$9.3 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$7.1 \times 10^4$	
Total de grupo	media	$6.9 \times 10^4$	$9.7 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$	$3.6 \times 10^4$	$3.3 \times 10^4$	$3.4 \times 10^4$	$6.8 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$9.5 \times 10^4$	
	± D.E.	$5.5 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$	$5.4 \times 10^4$	$3.7 \times 10^4$	$4.7 \times 10^4$	$3.4 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$	$3.3 \times 10^4$	
S	1	$1.1 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$8.7 \times 10^4$	$9.6 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$6.1 \times 10^4$	$4.7 \times 10^4$	$6.3 \times 10^4$	$3.8 \times 10^4$	
S	2	$5.2 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5$	$7.2 \times 10^4$	$9.6 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$	$8.3 \times 10^4$	$7.8 \times 10^4$	$1.4 \times 10^4$	$8.4 \times 10^4$	$8.3 \times 10^4$	$3.4 \times 10^4$	
S	3	$7.4 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$7.3 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	$8.5 \times 10^4$	$9.1 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$	$6.1 \times 10^4$	$4.6 \times 10^4$	$6.3 \times 10^4$	$2.1 \times 10^5$	
Total de grupo	media	$8.2 \times 10^4$	$1.4 \times 10^4$	$8.5 \times 10^4$	$8.9 \times 10^5$	$7.2 \times 10^4$	$9.0 \times 10^4$	$7.6 \times 10^4$	$8.9 \times 10^4$	$5.9 \times 10^4$	$7.0 \times 10^4$	$9.5 \times 10^4$	
	± D.E.	$5.3 \times 10^4$	$4.7 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$	$6.4 \times 10^4$	$6.1 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$	$4.1 \times 10^4$	$6.0 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	
T	1	media	$4.8 \times 10^4$	$4.4 \times 10^4$	$3.9 \times 10^4$	$2.7 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$8.3 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$
		± D.E.	$7.2 \times 10^3$	$1.6 \times 10^4$	$3.7 \times 10^4$	$1.6 \times 10^5$	$4.0 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$5.1 \times 10^4$	$4.4 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$

D.E. = Desviación estándar

ND = No determinado

APENDICE 21. PRUEBAS DE DUNCAN PARA COMPARACION DE MEDIAS DEL NUMERO ABSOLUTO DE MACROFAGOS (NUABSM) Y SU TRANSFORMACION LOGARITMICA (NABMLOG) EN RATONES EXPUESTOS A AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T).

Hora	Variable = Grupo =	P	N	U	A	B	S	M	T	P	A	B	M	L	O	G	T
0		C D				B			A	B C			A B				A B C
1		C D				A			A	B C			A				B C
2		D				B			A		D		A B				C
4		D				B			A	C D			A B				A
8		D				B			A		D		B				A B C
12		D				B			A		D		A B				A B C
24		C D				B			A	B C			B				A B
48		B C				B			A	A			A B				A B C
72		A				B			A	A			B				A B C
150		A B				B			A	A			B				A
300		C D				A B			A	A B			B				A B C

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )  
 Medias de las variables están contenidas en el cuadro 31.

APENDICE 22. INDICE DE NEUTROFILOS ENTRE MACROFAGOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (INM) DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P), S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	Nº de réplica	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)										
		0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300
P	1	0.010	0.309	0.686	7.846	49.000	74.000	5.904	1.006	0.162	0.020	ND
P	2	0.010	0.031	4.902	17.750	29.550	34.000	9.000	0.190	0.159	3.351	0.222
P	3	0.053	1.094	5.666	28.165	59.000	31.142	7.125	2.169	0.084	0.047	0.025
Total de grupo	media	0.024	0.478	3.751	17.920	45.850	46.380	7.343	1.121	0.135	1.363	0.124
	± D.E.	0.030	0.836	2.630	10.280	31.154	30.444	1.836	1.668	0.105	2.978	0.165
S	1	0.173	0.031	0.031	0.020	0.020	0.048	0.053	0.025	0.066	0.036	0.058
S	2	0.015	0.031	0.015	0.204	0.031	0.036	0.015	0.010	0.010	0.020	0.031
S	3	0.010	0.010	0.010	0.010	0.015	0.036	0.020	0.010	0.010	0.010	0.010
Total de grupo	media	0.066	0.024	0.018	0.078	0.022	0.040	0.029	0.015	0.028	0.022	0.033
	± D.E.	0.122	0.018	0.017	0.114	0.016	0.027	0.024	0.008	0.046	0.017	0.027
T	1	media	0.010	0.010	0.010	0.020	0.010	0.010	0.015	0.010	0.010	0.010
		± D.E.	0.000	0.000	0.000	0.014	0	0	0.007	0	0.000	0.000

D.E. = Desviación estándar

ND = No determinado

APENDICE 23. INDICE DE MACROFAGOS ENTRE NEUTROFILOS POR ML DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (IMN) DE RATONES EXPUESTOS A AEROSOL DE *P. HAEMOLYTICA* (GRUPO P), *S. AUREUS* (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T) EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION.

Grupo	Nº de réplica	Intervalos de tiempo postinoculación (horas)											
		0	1	2	4	8	12	24	48	72	150	300	
P	1	99.000	16.630	1.480	0.130	0.020	0.015	0.169	2.412	6.179	49.000	ND	
P	2	99.500	59.500	0.204	0.064	0.059	0.036	0.111	5.274	26.173	49.570	7.90	
P	3	30.250	8.060	0.193	0.036	0.031	0.047	0.150	6.760	27.846	21.500	61.500	
Total de grupo	media	76.250	28.060	0.628	0.076	0.037	0.033	0.143	4.815	20.066	38.229	34.745	
	± D.E.	37.550	37.210	0.680	0.047	0.033	0.025	0.036	4.729	22.445	38.181	43.709	
S	1	17.740	36.500	59.000	65.660	65.660	55.750	22.800	40.660	53.540	34.000	18.640	
S	2	74.500	34.000	74.000	6.173	59.000	34.000	74.000	99.000	99.500	66.160	59.000	
S	3	99.500	99.500	100.0	100.0	74.000	28.160	66.160	100.0	99.500	100.0	100.0	
Total de grupo	media	63.196	58.333	77.666	57.279	66.221	39.305	54.323	79.888	84.181	66.721	59.213	
	± D.E.	41.822	45.173	35.132	47.439	37.143	32.391	36.776	30.839	37.280	37.673	44.445	
T	1	media	99.500	99.500	99.500	65.665	100.0	100.0	74.000	100.0	99.500	99.500	99.500
		± D.E.	0.707	0.707	0.707	47.142	0	0	35.355	0	0.707	0.707	0.707

D.E. = Desviación estándar

ND = No determinado

APENDICE 24. PRUEBAS DE DUNCAN PARA COMPARACION DE MEDIAS DEL INDICE DE NEUTROFILOS ENTRE MACROFAGOS (INM) Y DEL INDICE DE MACROFAGOS ENTRE NEUTROFILOS (IMN) DE RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE P. HAEMOLYTICA (GRUPO P) , S. AUREUS (GRUPO S) Y TESTIGOS (GRUPO T)

Hora	Variable = Grupo =	P	I	N	M	T	P	I	M	N	T
			S	S				S	S		
0		B	A			A	A	A			A
1		B	A			A	A B	A			A
2		B	A			A	B	A			A
4		B	A			A	B	A			A
8		A	A			A	B	A			A
12		A	A			A	B	A			A
24		B	A			A	B	A			A
48		B	A			A	A B	A			A
72		B	A			A	A B	A			A
150		B	A			A	A B	A			A
300		B	A			A	A B	A			A

Medias con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )

Medias de las variables están contenidas en los cuadros 34y 35.

APÉNDICE 25. PESO VIVO, VOLUMEN DE LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR RECUPERADO (VOLRECT); PROMEDIO DE LOS TRES LAVADOS (VOLRECML) Y RELACION VOLUMEN/PESO VIVO DE RATONES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE LAS POBLACIONES CELULARES DEL PULMON.

Grupo	Nº de ratones	peso vivo (g) media ± D.E.	VOLRECT (ml) media ± D.E.	VOLRECML (ml) media ± D.E.	VOLPVIVO media ± D.E.
<u>P. haemolytica</u>	63	26.35 ± 3.78	2.27 ± 0.32	0.75 ± 0.10	29.21 ± 5.41
<u>S. aureus</u>	66	24.13 ± 3.36	2.29 ± 0.30	0.76 ± 0.10	31.93 ± 4.31
Testigo	22	24.44 ± 2.12	2.39 ± 0.33	0.79 ± 0.11	32.72 ± 4.85
Total	151	25.10 ± 3.40	2.29 ± 0.32	0.76 ± 0.10	30.91 ± 4.87

D.E. = Desviación estándar

APÉNDICE 26. PORCENTAJE TOTAL (PTVOLREC) E INDIVIDUAL (PVOLREI<sub>1, 2, 3</sub>) DE VOLUMENES RECUPERADOS EN LOS LAVADOS BRONQUIO-ALVEOLARES DE RATONES.

Grupo	Nº de ratones	PTVOLREC (%) media ± D.E.	P V O L R E I (%)		
			1 media ± D.E.	2 media ± D.E.	3 media ± D.E.
<u>P. haemolytica</u>	63	75.71 ± 10.93	71.41 ± 9.67	77.98 ± 14.67	77.74 ± 15.50
<u>S. aureus</u>	66	76.40 ± 10.28	40.56 ± 9.09	79.98 ± 12.58	78.68 ± 14.55
Testigo	22	79.68 ± 11.15	73.68 ± 6.74	82.50 ± 15.72	82.86 ± 16.65
Total	151	76.59 ± 10.68	71.37 ± 9.05	79.51 ± 13.99	78.90 ± 15.26

D.E. = Desviación estándar