

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Patología Animal II  
(Patología y Clínica Médico – Quirúrgica)**



**NEUMONIAS INTERSTICIALES CRÓNICAS EQUINAS:  
ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO E INMUNOCITOQUÍMICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Antonio Manuel Rodríguez Bertós

Bajo la dirección de la doctora

María Castaño Rosado

**Madrid, 1994**

**ISBN: 978-84-669-1318-8**

4  
12

TESIS DOCTORAL

**NEUMONIAS INTERSTICIALES CRONICAS EQUINAS:**  
**ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO E INMUNOCITOQUIMICO.**

ANTONIO RODRIGUEZ BERTOS

MADRID 1993

## ACTA DEL GRADO DE DOCTOR

Reunido el Tribunal examinador, constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis doctoral, que habla escrito libremente sobre el siguiente tema:

NEUMONIAS INTERSTICIALES CRONICAS EQUINAS: ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO E INMUNOCITOQUIMICA

Ha sido dirigida por:

MARIA CASTAÑO

Terminada la lectura y contestadas por el tesando las objeciones formuladas por los Sres. Miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de:

APTO "CUM LAUDE" POR UNANIMIDAD

Madrid, 31 de Enero de 1994

EL PRESIDENTE

M. Rodríguez

LOS VOCALES

J. L. González

EL SECRETARIO

J. Ferraz

Antonio Rodríguez

*UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID*  
*FACULTAD DE VETERINARIA*  
*DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL II*  
*UNIDAD DE HISTOLOGIA Y ANATOMIA PATOLOGICA*

**NEUMONIAS INTERSTICIALES CRONICAS EQUINAS:  
ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO E INMUNOCITOQUIMICO.**

DIRECTORA: MARIA CASTAÑO ROSADO.

Catedrático de Patología Animal  
(Unidad de Histología y Anatomía  
Patológica). Dpto Patología Animal II.

MADRID 1993.



**D<sup>a</sup> MARIA CASTAÑO ROSADO, CATEDRATICO DEL  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL II DE LA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**CERTIFICA:** Que la Tesis Doctoral que tiene por título NEUMONIAS INTERSTICIALES CRONICAS EQUINAS: ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO E INMUNOCITOQUIMICO, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria Don ANTONIO MANUEL RODRIGUEZ BERTOS, se ha realizado en la Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo mi dirección.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, firmo en



*Maria Castaño*

Madrid, 10 Diciembre de 1993.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

## AGRADECIMIENTOS

Durante el proceso de elaboración de una Tesis son muchas las personas que de forma diferente, colaboran en el desarrollo de la misma. Sin embargo, quiero hacer una especial mención a una famosa frase del Profesor y Premio Nobel, D. Santiago Ramón y Cajal que dice: "Todo hombre puede ser escultor de su propio cerebro", en mi caso mi mente ha sido esculpida por la labor, perseverancia y buen hacer de la Dra. María Castaño. Gracias a sus sabios consejos y enseñanzas, hoy me siento un auténtico entusiasta de la Histología y Anatomía Patológica Veterinaria, especialmente de la Línea de Investigación del Pulmón Equino.

Asimismo quiero agradecer la ayuda prestada a las siguientes personas:

A la Prof. Dra Juana M<sup>a</sup> Flores por su incansable labor científica y constante apoyo y estímulo en esta Tesis Doctoral y durante todo mi aprendizaje en la Cátedra de Histología y Anatomía Patológica.

A la Dr. Laura Peña, a quién le debo todo lo que sé acerca de las técnicas inmunocitoquímicas, de matriz extracelular y su interpretación, pero sobre todo por ser una buena compañera y amiga, "gracias".

Al Dr. Manuel Pizarro por su participación activa en la realización del material fotográfico.

A la Dra. Marta Gonzalez y al Dr. Jaime Goyoaga que me iniciaron en los conocimientos de la Clínica Equina.

A Dr. Francisco García Prieta, Veterinario Titular del Dpto Microbiología del

Laboratorio Regional de Algete, por su inestimable ayuda e interés, en la obtención de los resultados microbiológicos y virológicos.

A D. Pedro Aranda por la infinita paciencia al cortar mis cientos de bloques y por su buen quehacer en la obtención de los mismos, "muchas gracias".

A mis compañeras de despacho, Nines y Ana, por soportar el "stress" y el desorden que conlleva mi persona.

A los profesores del Departamento de Patología Animal II que de una u otra forma han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

Quiero también expresar mi agradecimiento a todas las entidades que han colaborado a la finalización de este trabajo, muy especialmente al Matadero Municipal de Madrid y en especial a los compañeros veterinarios: D<sup>a</sup> Concepción Díaz de Villegas, D<sup>a</sup> Julia Trillo, D. Javier Martín Bri, D. Luis Arnaiz y D<sup>a</sup> Charo García Bengoechea; al Laboratorio Regional de Algete y al Centro Veterinario Militar, por los medios puestos a mi disposición para la elaboración final de esta Tesis.

Agradezco a mis padres la ilusión y ánimos depositados en mi, sobre todo en los momentos difíciles.

Por último, quiero dar las gracias a mi mujer, por su constante estímulo y apoyo moral, por su comprensión y por el tiempo que no le he dedicado y que ella tanto merece.

## **INDICE**

---

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b> .....	3
<b>JUSTIFICACION</b> .....	11
<b>OBJETIVOS</b> .....	15
<b>REVISION BIBLIOGRAFICA</b> .....	19
I.- BREVE HISTORIA DE LAS ENFERMEDADES PULMONARES ..	20
II.- NEUMONIAS INTERSTICIALES (N.I.); N.I. CRONICAS .....	33
III.- FIBROSIS PULMONAR .....	52
III.1.- Proliferación fibroblástica .....	63
III.2.- Metabolismo del colágeno en el pulmón: Depósito de colágeno .....	67
IV.- PROTEINAS DE MATRIZ EXTRACELULAR (M.E.) EN EL PULMON .....	76
IV.1.- Proteinas fibrilares de M.E.: Colágenos .....	79
IV.1.1.- Colágenos mayores .....	79
IV.1.2.- Colágenos menores .....	80
IV.1.3.- Colágenos en el proceso de fibrosis pulmonar .....	82
IV.2.- Proteinas no fibrilares de M.E. ....	84
IV.2.1.- Laminina .....	84
IV.2.2.- Fibronectina .....	85

V.- FACTORES DE CRECIMIENTO .....	92
V.1.- Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) .....	96
V.1.1.- Estructura y localización .....	96
V.1.2.- Función .....	97
V.1.3.- PDGF en el proceso de fibrosis pulmonar .....	100
V.2.- Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF $\beta$ ) .....	106
V.2.1.- Estructura y localización .....	106
V.2.2.- Función .....	108
V.2.3.- TGF $\beta$ : Proliferación celular .....	117
V.2.4.- TGF $\beta$ : Síntesis de colágeno .....	123
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>127</b>
I.- ANIMALES .....	127
I.1.- Número .....	127
I.2.- Procedencia .....	128
I.3.- Raza .....	128
I.4.- Edad .....	128
I.5.- Sexo .....	129
II.- TOMA DE MUESTRAS .....	129
II.1.- Muestras de sangre .....	129
II.2.- Muestras de pulmón .....	129

III.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS .....	130
III.1.- Estudio microbiológico y virológico .....	130
III.2.- Estudio histopatológico .....	131
III.2.1.- Técnicas convencionales .....	131
III.2.1.1.- Fijación e inclusión .....	131
III.2.1.2.- Corte .....	132
III.2.1.3.- Tinción .....	132
III.2.2.- Técnicas inmunocitoquímicas .....	133
III.2.2.1.- Fijación, inclusión y corte .....	133
III.2.2.2.- Inmunotinción .....	134
III.2.2.3.- Dilución óptima de trabajo .....	139
III.2.2.4.- Utilización de controles .....	140
III.2.2.4.1.- Controles negativos .....	140
III.2.2.4.2.- Controles positivos .....	140
IV.- ICONOGRAFIA .....	141
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>145</b>
<b>I.- ESTUDIO MICROBIOLOGICO .....</b>	<b>146</b>
I.1.- Aislamiento microbiano .....	146
I.2.- Valoración virológica .....	149
<b>II.- ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO .....</b>	<b>151</b>
II.1.- Macroscópico .....	151
II.2.- Histopatológico .....	154
II.2.1.- N.I. Linfoide .....	155

II.2.2.- N.I. Eosinofílica . . . . .	155
II.2.3.- N.I. Descamativa . . . . .	157
II.2.4.- N.I. Células Gigantes . . . . .	158
II.2.5.- N. Bronquiolointersticial . . . . .	158
II.2.6.- N.I. Bronquiolitis Obliterante . . . . .	160
II.2.7.- N.I. Usual . . . . .	161
III.- ESTUDIO INMUNOCITOQUIMICO . . . . .	166
III.1.- Fase inicial . . . . .	168
III.1.1.- Laminina y colageno tipo IV . . . . .	168
III.1.2.- Fibronectina . . . . .	169
III.1.3.- Colágeno tipo III . . . . .	170
III.1.4.- Colágeno tipo I . . . . .	171
III.1.5.- PDGF . . . . .	171
III.1.6.- TGF $\beta$ . . . . .	172
III.2.- Fase intermedia . . . . .	173
III.2.1.- Laminina y colageno tipo IV . . . . .	173
III.2.2.- Fibronectina . . . . .	173
III.2.3.- Colágeno tipo III . . . . .	174
III.2.4.- Colágeno tipo I . . . . .	171
III.2.5.- PDGF . . . . .	175
III.2.6.- TGF $\beta$ . . . . .	176
III.3.- Fase final . . . . .	177
III.3.1.- Laminina y colageno tipo IV . . . . .	177

III.3.2.- Fibronectina .....	177
III.3.3.- Colágeno tipo III .....	178
III.3.4.- Colágeno tipo I .....	179
III.3.5.- PDGF .....	179
III.3.6.- TGF $\beta$ .....	180
<b>TABLAS E ICONOGRAFIA .....</b>	<b>183</b>
<b>DISCUSION .....</b>	<b>267</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>309</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>313</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>317</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>321</b>

## **INTRODUCCION**

---

## INTRODUCCION

El estudio de las NEUMONIAS es un problema complejo tanto en el hombre como en los animales. La terminología, clasificación, etiología, patogenia, clínica y patología son muy variadas. En Veterinaria tienen importancia porque provocan altos índices de morbilidad, en menor medida de mortalidad y pérdidas económicas de interés. En los EQUINOS, las inflamaciones del pulmón tienen una significación muy especial, ya que en su mayoría son animales dedicados a prácticas deportivas, trabajo, silla o paseo y todo ello conlleva una relación directa con el aparato respiratorio: pulmón sano o neumónico, son dos extremos sinónimos de salud y enfermedad, con repercusiones muy claras en la vida útil del animal (Wilkie, 1982, citado por Dungworth, 1982; Viel, 1983).

El término neumonía deriva del griego Pneumon, que significa pulmón y se dividen atendiendo a criterios etiológicos, morfológicos y vías de entrada. Revisando los libros más clásicos de los últimos años, Jubb y Kennedy (1990), Dungworth (1992) y Thomson (1989), podemos considerar los siguientes tipos:

\* **Neumonías focales:** con imágenes macroscópicas típicas de formaciones nodulares, distribuidas por el parénquima pulmonar y vías de entrada aerógena o hematógena. En

este sentido se podrían considerar como tales, desde las metástasis tumorales, hasta la tuberculosis, parasitosis o neumonías embólico-metastática por *Rodoccus equi* en potros.

\* En segundo lugar tenemos las **neumonías lobares y lobulillares**, según se afecten lobulillos o lobulos completos del pulmón; ambos tipos son de entrada principalmente vía aerógena y se denominan bronconeumonías con ejemplos muy típicos tales como las neumonías del transporte y las complicaciones bacterianas de virosis: Influenza, Rinoneumonitis, Arteritis viral o Peste equina.

\* En tercer lugar se describen las **neumonías difusas**, también denominadas neumonitis o neumonías intersticiales, en las que se afectan difusamente los pulmones, siendo la vía de entrada fundamentalmente hematógena. Las causas clásicas son virosis, intoxicaciones por oxígeno, paraquat, alcaloides pirrolicidínicos, shock endotóxicos e hipersensibilidad por parásitos y mohos.

Estos tipos de neumonías no son absolutamente puros. Una vez iniciado el proceso patológico, el agente etiológico generalmente de entrada aerógena, alcanza posteriormente la vía hematógena a partir del peribronquio y peribronquiolo con lo cual las bronconeumonías provocarían neumonitis y al contrario, las neumonías intersticiales comienzan con lesiones del tabique interalveolar y finalizan con bronquiolitis y bronquitis. En ambos casos se denominan **neumonías bronquiolo-intersticiales**.

El diagnóstico de una neumonía es muy fácil tanto para el clínico como para el patólogo, pero la identificación del tipo de neumonía es más complicado, y para ello se

deben unir los diferentes diagnósticos: clínico, anatomopatológico, radiológico, microbiológico y virológico. Podría considerarse suficiente con el microbiológico o virológico, pero la complejidad etiológica de las neumonías es evidente; en un mismo caso pueden actuar dos virus, tres bacterias, un micoplasma y además, una hipersensibilidad parasitaria, con lo cual tendremos resultados parciales para el tratamiento farmacológico, el cual no será efectivo, y de ahí la complejidad de los tratamientos en las neumonías. Consideramos por otra parte que el estudio citológico e histopatológico son imprescindibles para evidenciar tamaño y grado de lesión, siendo de gran utilidad para emitir tanto el pronóstico como el tratamiento.

El tema objeto de este trabajo, lo hemos denominado neumonías intersticiales crónicas y entendemos por tanto, que no significan procesos puros, sino que las lesiones son producidas en su mayor parte por agentes de entrada aerógena o hematógena, y que alteran tanto el intersticio interalveolar como las vías aéreas (principalmente bronquiolos).

En nuestro caso el estudio se centrará básicamente, en el intersticio interalveolar, peribronquiolo, peribronquio, y tabiques interlobulillares en definitiva lo que denominamos estroma o matriz extracelular. Imágenes semejantes a las encontradas por nosotros se han denominado de manera muy diferente por distintos autores a lo largo de la historia:

- Neumonitis (Llorente Lázaro, 1859, 1873),
- Neumonías crónicas (Cagny y Gobert, 1880),

- Neumonías intersticiales (Nieberle y Cohrs, 1967),
- Neumonías víricas (Dungworth, 1982; Dahme y Weiss, 1989),
- Neumonías atípicas (Dahme y Weiss, 1988),
- Neumonías difusas (Thomson, 1989),
- Neumonías intersticiales crónicas (Gerber, 1973, 1990; Rodríguez y col., 1992),
- Neumonías bronquiolo-intersticiales (Liebow y Carrington, 1969; Dungworth, 1992),
- Alveolitis fibrosante criptogénica (Rudd y col., 1981),
- Alveolitis difusa fibrosante (Scadding y Hinson, 1967; Turk y col., 1981),
- Enfermedad pulmonar crónica (Grüning y col., 1989),
- Enfermedad pulmonar infiltrativa difusa crónica (Carrington y Gaensler, 1978),
- Fibrosis pulmonar idiopática (Turner-Warwick y Haslam, 1987; Cotran y col., 1991),
- Fibrosis alveolar idiopática (Spencer, 1968, 1975),
- Fibrosis pulmonar intersticial (Rochemonteix-Galve y col., 1990),
- Neumonías criptogénicas organizadas (Davison y col., 1983; Geddes, 1991),
- Neumonías criptogénicas bronquiolitis obliterante (Costabel y Guzman, 1991),
- Bronquiolitis obliterante (Lange, 1901; Du Bois y Geddes, 1991),
- Neumonías intersticiales criptogénicas (Marcato, 1990),
- Neumonías intersticiales usuales (Liebow, 1975; Selman y Barrios, 1991).

Básicamente son todos ellos procesos patológicos del pulmón que tienen vía de entrada aéreo-hematógenas con lesiones en alveolos, bronquios, bronquiolos y tabique

interalveolar, lesionándose los capilares aquí existentes y provocándose fenómenos de preestasis y estasis. Estos conllevan a un edema de pared y espacio alveolar, que evoluciona hacia una organización de placas de fibrina y formación de membranas hialinas, muerte y descamación de neumocitos, reepitelizaciones, atelectasias por pérdida de surfactante, y fibrosis posterior por mediación de factores de crecimiento; las lesiones enunciadas en estas localizaciones, pueden ser semejantes a las que aparecen en paredes de bronquios y bronquiolos tras la entrada vía aerógena de diferentes agentes etiológicos y su diseminación secundaria por vía linfohematógena de vasos pericanaliculares.

Ello justifica que en unos casos la alteración es muy amplia y serían las auténticas neumonías difusas y en otros, las lesiones son mas focales; por otro lado, la pleura suele alterarse debido a la conexión de los vasos de las paredes canaliculares con los subpleurales.

Las neumonías crónicas estan estudiadas con escasa profundidad en cualquier especie animal. En los equinos, como tales neumonías crónicas, también estan poco estudiadas. Sin embargo, existen abundantes trabajos sobre enfisema en caballos, antiguo huelfago y actual COPD, aunque al revisar la bibliografía sobre patología de este proceso, comprobamos que tiene aspectos típicos de las neumonías crónicas; en realidad son neumonías crónicas con una bronquiolitis obstructiva muy espectacular (Sasse, 1971; Gerber, 1973; Viel, 1983; Winder y col., 1987; Beech, 1991; Dixon y col., 1992).

En definitiva, consideramos que las neumonías intersticiales crónicas son una

mezcla de neumonías focales, lobulillares, lobulares y difusas, y que al mismo tiempo presentan imágenes semejantes a las descritas en el COPD e incluso en casos muy avanzados, podrían llegar a confundirse con ciertos tipos de tumores pulmonares. Para comprender mejor las imágenes observadas, vamos a seguir la división de Liebow (1975) para las neumonías humanas, actualizada por Selman y Barrios (1991) y de Dungworth (1992) para las neumonías de los animales, así estudiaremos dentro de las neumonías crónicas equinas, diferentes subtipos tales como: neumonía intersticial clásica o usual, neumonía intersticial con bronquiolitis obliterante, neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial linfoide, neumonía intersticial de células gigantes, neumonía intersticial eosinofílica y neumonía bronquiolo-intersticial. Tras esta división realizada con técnicas habituales estudiaremos con técnicas más sofisticadas la matriz extracelular y factores de crecimiento celular con el fin de establecer una correlación entre los distintos tipos considerados.

## **JUSTIFICACION**

---

## **JUSTIFICACION**

Tras la lectura de la introducción puede comprenderse que cualquier aportación científica al conocimiento de las neumonías, puede conllevar a establecer mejor el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y en definitiva a luchar mejor contra la enfermedad.

Por otra parte queremos hacer constar, que existen dos procesos patológicos pulmonares de los equinos como son, los tumores pulmonares y la hemorragia nasal inducida por esfuerzo, que podríamos entroncarlos con los aspectos de matriz extracelular que estudiamos en este trabajo; cualquier veterinario clínico de caballos sabe que uno de los graves problemas de los animales dedicados a prácticas deportivas es la hemorragia del esfuerzo cuya etiología y patogenia son poco conocidas. Pensamos que las alteraciones vasculares y de matriz extracelular observadas en las neumonías crónicas, podrían ser una base importante en el desarrollo de la hemorragia del esfuerzo.

Además, las sugestivas lesiones aparecidas en fases terminales de fibrosis pulmonar, su parecido con los tumores bronquiolo-alveolares y la localización de las lesiones, nos hacen sospechar de una relación entre ambas alteraciones patológicas. Por ello, consideramos que el trabajo no solo aporta técnicas y observaciones novedosas, sino

que abre la puerta para continuar con el estudio de otras enfermedades pulmonares equinas de gran trascendencia en la práctica clínica diaria y en el mundo científico actual.

## **OBJETIVOS**

---

## **OBJETIVOS**

Con este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar los tipos de neumonías más frecuentemente observados en pulmones de 100 animales procedentes del Matadero Municipal de Madrid siguiendo la clasificación de Liebow (1975).
- 2.- Clarificar la relación entre los tipos de neumonías descritos con imágenes macroscópicas e histológicas, obtenidas con técnicas habituales, y los resultados virológicos y microbiológicos de exudados bronquiales.
- 3.- Detectar un número significativo de sustancias presentes en la matriz extracelular fundamentalmente proteínas de adhesión celular (laminina y fibronectina), así como distintos tipos de colágeno que intervienen en la fibrosis, mediante técnicas inmunocitoquímicas.
- 4.- Comprobar la existencia de factores de crecimiento que justifiquen la angiogénesis y fibrosis presentes en las neumonías crónicas de los caballos.

## **REVISION BIBLIOGRAFICA**

---

## **REVISION BIBLIOGRAFICA**

La consulta bibliográfica de los últimos años, ha dejado patente la importancia y complejidad de las enfermedades pulmonares, tanto en el hombre como en los animales. Por ello esta revisión la dividiremos en cinco puntos:

I.- Breve historia de las enfermedades pulmonares.

II.- Neumonías intersticiales: N.I. Crónicas.

III.- Fibrosis pulmonar.

IV.- Proteínas de matriz extracelular en el pulmón.

V.- Factores de crecimiento.

Las referencias bibliográficas en los distintos apartados se referirán fundamentalmente al hombre y caballo, por la gran similitud que presentan la anatomía, fisiología y patología de los pulmones de ambas especies.

## **I.- BREVE HISTORIA DE LAS ENFERMEDADES**

### **PULMONARES.**

Las enfermedades pulmonares crónicas del caballo han sido importantes para el hombre desde el año 333 a.J.C., cuando fue descrito por Aristóteles, el "drawing in of the flank". Desde entonces hasta el s. XVII existe un gran vacío de conocimientos acerca de los problemas respiratorios en los animales y más concretamente en la especie equina (Smith, 1924; Cook y Rosedale, 1963; Gillespie y Tyler, 1969).

Quizá una de las primeras y más importantes obras históricas sobre patología respiratoria en caballos es la de Floyer (1698). En su "Treatise of the Asthma", la descripción del enfisema pulmonar en una yegua es claro y representa una visión frecuentemente perdida para la mayoría de los escritores recientes. En sus escritos sobre "tumores flatulentos" (flatulent tumors), se describen dos tipos: el primero es el "broken wind" producido como consecuencia de la ruptura o dilatación de las vejigas de los pulmones, que contienen demasiado aire. Este autor no pudo encontrar otras alteraciones y, este "tumor flatulento", por tanto, sería la causa de todos los síntomas respiratorios observados.

Gibson, un cirujano inglés, en 1751 escribe ampliamente sobre el "broken

wind" (Smith, 1924). Describe los pulmones como de gran tamaño y con pérdida de elasticidad. Pensaba que la enfermedad debería ser hereditaria, pero más frecuentemente de origen dietético y no tiene duda de que un caballo sano podría desarrollar el "broken-wind" en una noche. Smith (1924), relata sobre los escritos de Gibson (1751), y comenta: que en los 170 años que han transcurrido desde su muerte, poco ha sido añadido a sus observaciones sobre el "broken-wind".

Muchos escritores de la época de Gibson como Clark en 1837, eran repetitivos y erróneos. Clark examinó caballos con enfisema a finales de 1700 y pensó que era el primero en describir esta lesión. Un estudio notable fue realizado por Delafond en 1844, el cual observó que de 54 caballos con "broken-wind" examinados, encontró 45 con enfisema (Percivall, 1853). Además de estos hallazgos, Percivall (1853) previno que muchos caballos con "broken-wind" no tenían enfisema, y su visión se refleja asimismo en los escritos de Law (1896).

Williams (1874), escribió:

"No he dudado en afirmar que el "broken-wind" es generalmente debido a la alimentación con productos inadecuados, más particularmente de mala calidad: henos mohosos o groseros, con un alto contenido en fibra o que se le ha permitido que maduren demasiado antes de cortarlos".

Stömmer, en 1887, atribuye este problema a bronquitis/bronquiolitis, broncospasmo y desarrollo de enfisema. Posteriormente, algunos investigadores (Smith, 1924) dedicaron una gran parte de sus escritos al tema de las enfermedades

respiratorias del caballo sin aportar observaciones novedosas.

Law (1896), Baker (1900) y Malkmus (1912) estudiaron ampliamente la relación entre las dietas y el "broken-wind" en équidos; de este grupo de investigadores, sólo Malkmus ofreció alguna aportación sobre este tema, definiendo al proceso como "heaves" y en tal sentido comenta que:

"...es una enfermedad incurable y crónica de los pulmones ó del corazón, caracterizada por una respiración laboriosa y dificultada".

Esta definición tiene un sentido anatomopatológico e incluye un número de enfermedades crónicas incurables de los pulmones y del corazón, relacionadas con la dificultad respiratoria.

Ambos términos, "heaves" y "broken-wind", sugieren una implicación respiratoria, pero hay una tendencia en la literatura alemana por incluirlo bajo el término "heaves" y que representa aquellas condiciones cardiacas que causan clínicamente disnea.

Bezançon, Jong y Wilbert (1922), realizaron un trabajo de gran importancia sobre "enfisema pulmonar del hombre y los animales", en el cual se trataban las semejanzas estructurales, así como las distintas características histopatológicas y etiológicas del proceso patológico de forma general. Pero no es hasta 1934 cuando es tratado en profundidad este tema por Kountz y Alexander en su estudio denominado "Emphysema". Ellos discuten esta enfermedad en el hombre y otros animales, mostrando en dibujos las lesiones anatomopatológicas en el pulmón de caballo, y

definen:

"El enfisema no está limitado sólo al hombre, sino que sucede espontáneamente, y bajo condiciones experimentales, en ciertos animales (Cook y Rossdale, 1963)."

Durante los años treinta existe una gran confusión entre asma y enfisema y así Larsson (1936) realizó un experimento en caballos con enfisema, los cuales dieron positivos a un test de piel con extractos de heno mohoso (Cook y Rossdale, 1963). Estos hallazgos han sido confirmados con posterioridad por McPherson y col. (1979a), Halliwell y col. (1979) y Beech (1991), entre otros.

En medicina humana, el asma cursa con una eosinofilia, confirmando la etiología alérgica, sin embargo no ocurre igual con los équidos en donde este signo no es un rasgo característico de un estado alérgico. Ello no justifica que el enfisema equino no sea una condición alérgica (Sjoberg y Akerblom, 1938 citado por Cook y Rossdale, 1963). Además caballos sensibilizados no desarrollan necesariamente signos clínicos de un asma alérgico. Estos animales tienen cambios neumónicos en el intersticio pulmonar y el alveolo y en casos avanzados fibrosis pulmonar. Normalmente en medicina humana se producen como consecuencia de reacciones alérgicas tipo I y III, y en los équidos es una reacción alérgica de tipo mixto (Gerber, 1969, 1973 y 1990).

Los équidos con enfisema, muestran un aumento de la sensibilidad a la inyección de histamina, como en el caso del asma humano. La inyección intravenosa

de histamina en caballos normales produce un síndrome igual al descrito en el enfisema humano agudo, aunque hay ausencia de tos (Andberg y col., 1941 citado por Cook y Rossdale, 1963; Eyre, 1972). Sin embargo, Zanzucchi (1942) (citado por Cook y Rossdale 1963; Eyre, 1972) habla de la doble concentración de histamina que tienen los caballos con "broken-wind".

Desde 1945, como consecuencia de un aumento en la incidencia del enfisema en el hombre, se ha centrado la atención sobre las semejanzas que existen entre el enfisema equino y humano, y que no han sido encontradas en otras especies (Cook y Rossdale, 1963).

Algunos autores (Obel y Schmitterlöw, 1948), señalan que el enfisema alveolar en el caballo es causado por un espasmo agudo o crónico de las fibras musculares lisas de los bronquiolos y conductos alveolares. Según estos autores el broncospasmo actúa como un mecanismo difuso "check-valve", el cual permite la entrada de aire en los espacios alveolares pero no así su salida. El alveolo se dilata y origina una dificultad en la nutrición vascular, provocando la ruptura de la pared.

Este concepto de enfisema en el caballo es semejante al que existe en medicina humana, el cual es producido por un estado asmático crónico (Hinshaw y Garland, 1956; Lister, 1958 citado por Cook y Rossdale, 1963; Cook y Rossdale, 1963; Gillespie y Tyler, 1969; Eyre, 1972).

Según la WHO en 1961, se define enfisema en medicina humana como:

"una lesión anatómica caracterizada por un anormal y permanente

engrandecimiento de los espacios aéreos distales de los bronquiolos terminales y acompañado por la destrucción de sus paredes".

Esta definición separa el enfisema de la sobreinflación, que cursa con engrandecimiento del espacio alveolar sin destrucción de sus paredes (Viel, 1983). El proceso es frecuentemente secundario a una bronquitis obstructiva, particularmente en casos alérgicos asociados con broncoespasmo y también a un alto consumo de alimentos ricos en triptófano. Alström y Lauritzson (1953) confirman reiteradamente la etiología alérgica.

Cook y Rossdale (1963), clasificaron el "broken-wind" como una enfisema alveolar generalizado, que origina obstrucción durante la espiración. Más recientemente otros autores (Thurlbeck y Lowell, 1964) reconocen la existencia de otro tipo de lesiones respiratorias crónicas en caballos con signos de "heaves" o "broken-wind".

Una práctica inapropiada es la descripción anatómica del "enfisema", la cual no puede ser fielmente diagnosticada clínica, funcional ó radiológicamente en caballos vivos. La demostración de los cambios enfisematosos sólo pueden ser determinados específicamente en el examen postmortem (Thurlbeck y col., 1970; Matsuba y Thurlbeck, 1971). Como Gerber correctamente observó en 1969 "heaves" es un síntoma, no una enfermedad.

Estudios posteriores dentro de la medicina veterinaria, descartan las denominaciones "heaves", "broken-wind" o "enfisema" como consecuencia de una

confusa definición, aplicación y descripción de estos términos en favor de enfermedad pulmonar crónica obstructiva (EPCO) más conocida por las siglas inglesas COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) (Sasse, 1971; McPherson y Lawson, 1974; Cook, 1976; McPherson y col., 1978; Littlejohn, 1979). Algunos autores como Michell y col. (1968) consideraron que el término COPD es más preciso para describir el estado clínico de incapacidad por una disnea severa durante el ejercicio.

Actualmente este es el vocablo más apropiado, ya que describe un complejo rango de alteraciones respiratorias crónicas originadas primariamente en el pulmón (Littlejohn y col., 1979). Así el término crónico se utiliza para delimitar la duración de este proceso en el tiempo, y que Gerber (1969) acotó en no más de 3 meses; obstructivo para describir el bloqueo de las vías respiratorias; el término así abarca condiciones crónicas en todos los niveles de las vías respiratorias bajas del pulmón desde el bronquio al alveolo.

Sasse (1971) considera COPD a una entidad especialmente clínica y fisiológica, mientras que la enfermedad pulmonar obstructiva debería ser considerada como un síndrome clínico tal y como sugiere Burrow (1981).

COPD es un término más funcional que patológico. Dentro de éste se puede incluir el asma, bronquitis, bronquiolitis, alveolitis, enfisema, fibrosis y neoplasias como causas que pueden romper el intercambio gaseoso normal, el cual determina la potencial capacidad pulmonar (Littlejohn y col. 1979).

En la Moderna literatura médica se utiliza el término EPOC (enfermedad

pulmonar obstructiva crónica) con una idea más funcional que descriptiva (Sasse, 1971). Este término fue utilizado en América del Norte para describir pacientes con bronquitis crónica, mientras que en Gran Bretaña es utilizado para definir la cronicidad irreversible de la enfermedad en las vías respiratorias (Burrows, 1981; Viel, 1983).

En medicina veterinaria, esta terminología ha sido utilizada erróneamente dando la impresión de que COPD, "heaves" y "enfisema" son sinónimos e intercambiables. La descripción clínica del término "heaves" es correctamente aplicado a caballos con toses y esfuerzo espiratorio, pero no necesariamente progresan hacia COPD (Littlejohn, 1979; Breeze, 1977, 1979).

En Gran Bretaña (Simposio Internacional, 1985), consideran que COPD no cubre todas las causas de enfermedad pulmonar crónica, porque en muchas ocasiones no se conocen, aunque parece ser que la mitad de los casos de patologías pulmonares equinas obedecieran a COPD.

Todo este confusionismo originó que en 1985 el profesor E. Deegan organizara en la ciudad de Hannover un Simposio Internacional cuyo objetivo principal era estandarizar la terminología utilizada en el campo de la enfermedad crónica obstructiva pulmonar de los équidos, así como la metodología y la terminología de los ruidos pulmonares. De esta forma se discutieron las múltiples denominaciones utilizadas en los distintos trabajos para describir este proceso, tal y como se refleja en la Tabla 1.

La mayoría de los nuevos términos usados no tienen una clara base fisiológica (Simposio Internacional, 1985). De esta forma Derksen (1991), señaló que muchos de

los términos empleados no son otra cosa que síntomas inherentes al concepto de COPD. En estos años son escasas las aportaciones fisiopatológicas de este proceso, si bien añaden a la etiología alérgica, dietética e infecciosa una predisposición genética por defecto de una proteína sérica en determinadas estirpes de équidos (alpha-1-antitripsina) (Breeze y col., 1977; Beech, 1991; Marti y col., 1991; Marti y col., 1992).

**TABLA 1.- Denominaciones más frecuentes para definir las alteraciones pulmonares en los équidos que cursan clínicamente con dificultad respiratoria.**

<b>DENOMINACIONES</b>	<b>AUTORES</b>
HEAVES	Breeze, 1979
BROKEN-WIND	Cook y Rossdale, 1963
ENFISEMA PULMONAR EQUINO	Eyre, 1972; Cook, 1976
ENFISEMA ALVEOLAR CRONICO	Alexander, 1959; Gillespie y Tyler, 1969
BRONQUITIS CRONICA	Cook, 1979; Marti y col., 1991, 1992
ENFERMEDAD OBSTRUCTIVA PULMONAR	Muyll y Oyaert 1973; Gerber, 1986
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRONICA	Littlejohn, 1979; McPherson y col., 1979a y b
ENFERMEDAD DE LAS VIAS RESPIRATORIAS BAJAS	Viel, 1983, 1985; Winder y col., 1987
ENFERMEDAD PULMONAR CRONICA	Breeze y col., 1977; Halliwell y col., 1979; Grüning y col., 1989; Kaup y col., 1990b

Asimismo se ha observado en los últimos cinco años un avance en el estudio patogénico de la enfermedad en los équidos. Este desarrollo es consecuencia de los hallazgos e investigaciones realizadas en el ámbito de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en la especie humana, con la descripción de un grupo de entidades: enfisema, asma bronquial, bronquitis crónica y bronquiectasia. La Sociedad Americana Torácica publicó las bases de un diagnóstico estandarizado para diferenciar pacientes con COPD y con asma, quedando constituido COPD por una triada histopatológica (bronquitis crónica, bronquiolitis crónica obstructiva y enfisema), que está más acorde con lo que ocurre en veterinaria, tal y como señala Beech en su libro "Equine Respiratory Disorders": en el caballo se produce principalmente por las interrelaciones entre la bronquitis-bronquiolitis y el enfisema alveolar (Beech, 1991; Cotran y col., 1991; Kerrebijn, 1991; Barnes, 1992).

Este síndrome, Enfermedad Respiratoria Obstructiva Crónica, se presenta en todo el mundo, la etiología no está clara en muchos casos, aunque el medio ambiente parece estar relacionado con el mismo. Los veterinarios ingleses (Eyre, 1972; Mcpherson y col., 1979) lo asociaron a una enfermedad reversible de las vías respiratorias de los caballos debido a una hipersensibilidad por mohos que sucede cuando la alimentación es a base de heno y paja, la cual está asociada con una obstrucción significativa de las vías respiratorias (Simposio Internacional, 1985), pero no revelan la patología subyacente (Viel, 1983). La mayoría de los autores aplican el término de COPD a todos los casos observados aunque está claro que muchos de ellos

no tienen una obstrucción significativa de las vías respiratorias bajas. Por acuerdo de la reunión celebrada en Hannover, se consideró que el COPD no es un término conveniente en este contexto. El término de enfermedad pulmonar crónica fue sugerido por Deegen durante este Simposio, como óptimo aunque este puede incluir lesiones del parénquima y de las vías respiratorias (Simposio Internacional, 1985).

Por todo ello, el término que mayor aceptación ha tenido en la década de los noventa frente a los de COPD, "broken-wind", "heaves", asma, enfermedad alveolar crónica y neumonía intersticial atípica, entre otros es el de **enfermedad pulmonar crónica**.

Así Cook y Rossdale (1963) y McPherson y col. (1979b) señalan la edad como un factor de riesgo de presentación de estos procesos pulmonares crónicos, situando la máxima incidencia entre 6-10 años.

Desde un punto de vista etiológico, algunos autores (Nuytten y col., 1983) han observado el papel limitado que juegan los microorganismos patógenos en los procesos respiratorios de los équidos, determinando una frecuencia de aislamiento bacteriano semejante, entre los grupos de caballos normales y enfermos.

Whitwell y Greet (1984) en lavados traqueobronquiales y Mair y Lane (1989) en lavados traqueales y tejido pulmonar de équidos, han coincidido en señalar que al *Streptococcus zooepidemicus* como el microorganismo potencialmente patógeno con mayor incidencia en el tracto respiratorio equino.

Las neumonías crónicas del caballo no son un grupo específico de

enfermedades. Los cambios primariamente intersticiales son vistos en caballos con neumopatías alérgicas, especialmente hipersensibilidad tipo III y con lesiones puramente virales (Influenza). En casos avanzados los signos sugieren enfisema pulmonar crónico, pero la neumonía crónica aislada puede causar signos disnéicos típicos de una enfermedad pulmonar obstructiva (Gerber, 1986 citado por Hungerford, 1992).

Posiblemente los problemas terminológicos son una expresión de las distintas etiologías y múltiples asociaciones patogénicas, la mayoría de las cuales no están muy claras en la actualidad (Kaup y col. 1990a).

Para numerosos autores (Cook y Rossdale, 1963; Eyre y col., 1972; Cook, 1976; McPherson y col., 1979a y b; Grüning y col., 1989; Kaup y col., 1990a; Madelin y col., 1991) todas estas enfermedades pulmonares crónicas equinas con distintas denominaciones tienen una etiología poco comprendida, si bien sólo algunos (Cook, 1976; Gerber, 1973; McPherson y col., 1979b; Simposium Internacional, 1985; Robinson, 1991; Marti y col., 1991) señalan al medio ambiente como uno de los principales factores desencadenantes.

Para algunos investigadores (Halliwell y col., 1979; McPherson y col., 1979a; Eyre y col., 1982) la etiología de estos procesos sería alérgica como consecuencia de una hipersensibilidad desarrollada frente a los mohos del heno (*Microspora faeni* y *Aspergillus fumigatus*) y para otros como Grüning y col. (1989) sería por la exposición a una concentración de partículas en suspensión como consecuencia de una

falta de ventilación adecuada. Como señalan estos y algunos autores más (Kaup y col., 1990a; Robinson, 1991; Beech, 1991) estos factores que desencadenan enfermedades crónicas afectan normalmente a caballos estabulados durante largos períodos de tiempo.

Así, Hungerford (1992), recoge un estudio detallado, realizado por Gerber (1973) en Suiza, sobre enfermedades pulmonares crónicas, describiendo distintas manifestaciones y lesiones como:

- bronquiolitis crónica,
- bronquitis crónica,
- bronquitis/bronquiolitis crónica asmática,
- bronquiolitis crónica con enfisema pulmonar crónico alveolar,
- neumonía crónica.

En la bibliografía, hay muy poca información acerca de alteraciones de la región alveolar en el caballo, con la excepción del enfisema alveolar y el asma bronquial (Alexander, 1959; Gillespie y Tyler, 1969; Kaup, 1985; Kaup y col., 1990b; Gerber, 1990), y ante esta situación terminológica la siguiente vía de estudio se centrará en la revisión de las neumonías intersticiales, en especial aquellas de curso crónico.

## II- NEUMONIAS INTERSTICIALES: N.I. CRONICAS.

El estudio de este proceso patológico ha experimentado un gran avance en los últimos años, sin embargo son escasas las referencias anteriores que centran su atención en las neumonías intersticiales, sobre todo en équidos.

El término de neumonía intersticial ó neumonitis es conocido desde antiguo pero esta manifestación difiere clínica e histológicamente de la que hoy conocemos (Llorente Lázaro, 1859, 1873).

Quizás Cagny y Gobert (1880) realizaron una de las primeras aportaciones, designando la neumonía intersticial en medicina veterinaria y más en concreto en el caballo, como una **neumonía crónica** que cursa con una inflamación del tejido conjuntivo perialveolar y perilobular, incluyéndola además dentro de las inflamaciones del pulmón tal y como hoy las conocemos.

Estos autores definen la "neumonía crónica como una induración del tejido elástico". Asimismo, describen macro y microscópicamente esta enfermedad, delimitando las lesiones al tercio inferior de uno o ambos pulmones. Estos órganos no se retraen a la apertura de la cavidad torácica, sino que forman un bloque compacto e indurado. Presentan una coloración gris pizarra ("induración gris") ó blanca, análoga al del tejido fibroso ("induración blanca"), distribuyéndose ambas alteraciones de

forma irregular. Estas lesiones son debidas a la transformación fibrosa y engrosamiento del tejido conjuntivo interalveolar. La zona sana, presenta vesículas dilatadas (enfisema), observándose lesiones de bronquitis crónica (Cagny y Gobert, 1880).

A principios del siglo XX, son escasas las aportaciones que se realizan sobre este tema. En 1901 un patólogo alemán, Lange, describió esta lesión patológica con el nombre de "bronquitis y bronquiolitis obliterante" en el hombre, con una cicatrización constrictiva consecutiva a bronquiolitis y obstrucción de la ventilación.

En medicina veterinaria, Fröhner y Zwick (1932) clasifican las neumonías según la naturaleza del exudado ó la extensión de la lesión, haciendo hincapié en la neumonía intersticial bajo la denominación de "induración ó esclerosis pulmonar"; histopatológicamente describen unas neoformaciones noduliformes, difusas ó circunscritas de tejido conjuntivo en el pulmón entre los distintos alveolos y lobulillos, y alrededor de los bronquios. Asimismo, incluyen la dilatación de los bronquios aferentes (bronquiectasias) y alveolos sanos (enfisema) como consecuencia de la infiltración de tejido conjuntivo. Estos autores señalan en la especie equina la presencia de **neumonía lardácea**, caracterizada por nódulos de aspecto sarcomatoso semejante al tocino.

Quizás una de las aportaciones más relevantes en veterinaria sea la realizada por Nieberle y Cohrs (1967), los cuales sitúan la inflamación crónica del pulmón en el septo alveolar y el tejido peribronquial; más concretamente en el tejido intersticial, el

cual lo divide en: tejido conjuntivo peribronquial (y periarterial), interlobular e intralobular del alveolo y septo. Así distinguen tres tipos de inflamaciones:

- Neumonía intersticial peribronquial, que generalmente también agrupa a la peribronquiolar. Siempre se desarrolla con bronquitis y bronquiolitis. Su origen suele ser viral, aunque también se han dado casos semejantes por una etiología parasitaria. La inflamación es generalmente de tipo celular y hay una infiltración de linfocitos, células plasmáticas e histiocitos, los cuales forman gruesas capas alrededor del bronquio (**peribronquitis nodosa**). La fibrosis peribronquial se desarrolla en casos crónicos.
- Neumonía intersticial interlobulillar, que se extiende al tejido conjuntivo intersegmental e interlobulillar. Normalmente se asocian a neumonías alveolares, particularmente a las de tipo fibrinoso (neumonía del transporte y pleuroneumonía contagiosa del bovino, así como la neumonía fibrinosa de ovejas y cabra). La pleuritis se presenta frecuentemente, y esta asociada con un engrosamiento subpleural del tejido conjuntivo, el cual se continua con el septo interlobular.
- Neumonía intersticial intralobulillar: Afecta al septo alveolar y a los capilares interalveolares. Se presenta una infiltración acinar y del septo principalmente por histiocitos, linfocitos y células plasmáticas. Ocasionalmente se observan un gran número de neutrófilos y sobre todo de eosinófilos.

En los años setenta destaca un trabajo de gran importancia en el que se realiza un estudio en matadero, sobre la incidencia de la neumonía crónica intersticial en la

población equina de Suiza, señalando un valor más alto del que cabría esperar clínicamente (Gerber, 1969, 1973); este hecho fue corroborado por Winder y Fellenberg (1987) y Grüning y col. (1989), los cuales señalan una inflamación severa y crónica de la porción respiratoria, no necesariamente acompañada por disnea; por tanto ambos procesos deben tener distinta patogenia.

Liebow (1975) realiza la primera clasificación de las neumonías intersticiales en medicina humana, ateniéndose a criterios histológicos, y así las divide en:

- Neumonía intersticial usual ó clásica.
- Neumonía intersticial clásica con bronquiolitis obliterante.
- Neumonía intersticial descamativa.
- Neumonía intersticial linfoide.
- Neumonía intersticial de células gigantes.

Dichos procesos no son patognomónicos de ningún factor etiológico específico.

Es importante destacar la proliferación atípica del epitelio en neumonías intersticiales crónicas, especialmente cuando son focales, y parecen ser precursoras de adenocarcinomas periféricos de pulmón (Zatuchni y col., 1953; Beaver y Shapiro, 1956; Meyer y Liebow, 1965) en el hombre.

Sin embargo es a partir de los años 80 cuando encontramos las primeras referencias que profundizan en las neumonías intersticiales humana y equina considerando algunas de las causas, así como los aspectos histopatológicos más destacados.

La mayoría de los trabajos sobre neumonías intersticiales se refieren al hombre ó modelos experimentales sobre enfermedades humanas. La preocupación en medicina veterinaria se centra en problemas bronconeumónicos, los cuales originan graves pérdidas económicas. Sin embargo, la neumonía intersticial comprende una proporción significativa de las enfermedades animales espontáneas, particularmente las producidas por infecciones, tóxicos ó alergenicos (Dungworth, 1982; Buergelt y col., 1986).

El principal problema que nos encontramos es que la neumonía intersticial espontánea en los animales es generalmente demasiado fragmentaria en relación a rasgos clínicos y diagnósticos (Dungworth, 1982).

En Australia, se ha descrito una neumonía crónica supurativa intersticial en caballos alimentados con croton (*Eupatorium adenophorum*) (Buergelt y col., 1986; Winder y col. 1988; O'Sullivan, 1979).

Neumonía granulomatosa crónica fibrosante causada por la inhalación de silicatos ha sido observado en los caballos que trabajaban en las minas de California (Schwartz y col., 1981).

Destacada importancia tienen los efectos hepatotóxicos de los alcaloides pirrolicidínicos de plantas como *Senecio* sp.; estos agentes también tienen un significativo efecto neumotóxico y son productores de neumonía intersticial aguda en los caballos (Jones y Hunt, 1983 citado por Dixon y col., 1992; Dungworth, 1985).

Asímismo se ha observado neumonía intersticial aguda y edema de pulmón en un caballo (Lindley, 1978 citado por Dixon y col., 1992), como consecuencia de la

ingestión de menta púrpura (*Perilla frutescens*); este hecho ha sido confirmado experimentalmente por Breeze y col. (1984), señalando que esta planta posee un potente agente neumotóxico, el cual es selectivo para dañar el alveolo.

Es sin duda Dungwoth (1982), el artífice de establecer las bases genéricas de las neumonías intersticiales espontáneas en los animales domésticos (perro, gato, oveja y animales de experimentación); además señala que frecuentemente la naturaleza específica de las lesiones, obliga a considerar una gran variedad de posibles agentes causantes; para este autor las infecciones sistémicas son mayoritariamente, causas espontáneas de neumonías intersticiales en los animales.

En el caso de las neumonías intersticiales de los équidos, señala este autor la escasez de referencias bibliográficas existentes en relación a este tema. Existe una falta de designación morfológica completa y satisfactoria sobre los cambios en la enfermedad pulmonar intersticial. Dos términos son mayoritariamente utilizados: neumonía intersticial (Liebow, 1975) y alveolitis difusa fibrosante (Scadding y Hinson, 1967). El primero es el más apropiado en patología veterinaria, ya que cubre aspectos morfológicos, etiológicos y patogénicos.

El término de alveolitis fibrosante ha sido utilizada convencionalmente en patología humana para designar alteraciones en el parénquima de causa desconocida, sin embargo no se ha usado en enfermedades pulmonares intersticiales de los animales (Spencer, 1975; Dungworth, 1982).

Las neumonías intersticiales han sido clásicamente definidas como condiciones

inflamatorias crónicas, en las cuales hay predominantemente, una respuesta proliferativa en la pared alveolar y tabiques interlobulillares (Liebow, 1975; Dungworth, 1982).

Un estudio más profundo en medicina humana ha desvelado una lesión aguda, caracterizada por una fase exudativa intraalveolar la cual se continua con una rápida respuesta proliferativa y fibrótica (Katzenstein y col., 1976). Esta lesión pulmonar aguda en el hombre, puede estar causada o asociada con gran número de situaciones desencadenantes como virosis severas, sustancias químicas (alta concentración de oxígeno, bleomicina...), pancreatitis aguda, shock y septicemia.

Clínicamente, el rasgo común en el hombre es el síndrome distress respiratorio del adulto para distinguirlo del neonatal (Petty y Ashbaugh, 1971; Pratt, 1978 citados por Dungworth, 1982). En medicina veterinaria es más apto referirse al síndrome respiratorio distress agudo (SRDA), sin distinguir la forma adulta de la neonatal; este proceso se caracteriza por una disnea de presentación repentina y estaría representado clínicamente en el caballo por el COPD (Breeze y Carson, 1982 citado por Dungworth, 1982).

Patogénicamente, la neumonía intersticial resulta de un difuso y desigual daño al septo alveolar. La ausencia de lesión alrededor de las porciones conductoras distingue las neumonías intersticiales de las bronconeumonias. Las lesiones se distribuyen ampliamente a través de los pulmones, con gran implicación de las regiones dorsocaudales, hecho que contrasta con la distribución craneoventral en las

infecciones bronconeumónicas (Dungworth, 1982).

No se sabe porque las neumonías intersticiales, ya sean de origen hematógeno o aerógeno, son frecuentemente más severas en las regiones dorsocaudales del pulmón. Se piensa que las zonas menos ventiladas y profundidas son las ventrales tanto en el hombre como en los animales (Dungworth, 1982). Este hecho ha sido comprobado en el caballo por algunos autores (Mason y col., 1983; Amis y col., 1984; Dobson y col. 1985; Rose, 1987; Pascoe, 1985; Winder y van Fellenberg, 1987), lo que justifica la mayor vulnerabilidad de estas áreas pulmonares.

Histológicamente las neumonías intersticiales en veterinaria pueden ser agudas y crónicas, tal y como señala Dungworth (1982). La respuesta inflamatoria tiene lugar predominantemente en la pared alveolar y tejido intersticial del pulmón.

Las neumonías intersticiales agudas, tienen una fase inicial en la cual el rasgo más obvio es la presencia de exudado en el lumen alveolar; ésta es la principal razón para el uso alternativo del término alveolitis difusa y la designación de "atípica" sobre todo en el ganado bovino (Dungworth, 1982, 1992; Jubb y Kennedy, 1990).

La lesión aguda se centra en las células endoteliales del alveolo/capilar y células epiteliales tipo I. Observándose alveolos llenos de un exudado serofibrinoso; y congestión y edema de las paredes. La fibrina y detritus celulares se condensan para formar membranas hialinas en los espacios aéreos. Hay normalmente leucocitos y globulos rojos en el exudado alveolar y en el intersticio se localizan mayoritariamente células mononucleares. Posteriormente, se produce una rápida proliferación de células

epiteliales tipo II (fase proliferativa), en la cual es común observar nidos sincitiales y células individuales atípicas de gran tamaño, forma anormal y basofílas. Estas imágenes han sido algunas veces erróneamente interpretado como una proliferación neoplásica. Finalmente se produce la diferenciación de los neumocitos tipo II a tipo I (Dungworth, 1982).

Se pueden evidenciar algunos aspectos complementarios a la respuesta epitelial que se producen como consecuencia al daño alveolar:

- alveolos tapizados por células derivadas de las células epiteliales bronquiolares no ciliadas (Nettesheim y Szakal, 1972 citado por Dungworth, 1982);
- metaplasia de células tipo II de forma ciliada, escamosa ó células tipo fetal (Adamson y Bowden, 1979);
- proliferación de células tipo II como respuesta a efectos tóxicos del 60-100 % oxígeno (Dungworth, 1982);
- posibilidad de que células epiteliales alveolares ejerzan algún control sobre la proliferación de fibroblastos (Haschek y Witschi, 1979 citado por Dungworth, 1982);
- ocasionalmente se puedan producir tumores bronquioloalveolares en el hombre (Liebow, 1975) y animales de experimentación (Dungworth, 1982).

La mayoría de las neumonía intersticiales agudas de los animales se resuelven dejando una cicatriz.

La inflamación progresiva crónica no es frecuentemente encontrada en los animales; aunque es el tipo de neumonía intersticial en el hombre, que ha recibido más

atención (Scadding y Hinson, 1967; Liebow, 1975; Carrington y Gaenster, 1978). La inflamación crónica está normalmente asociada con una persistencia o repetida exposición a los agentes causales. Frecuentemente los procesos etiológicos/inmunológicos son conocidos ó se sospecha al menos parcialmente de sus mecanismos patogénicos.

Los rasgos centrales de neumonía intersticial crónica son acumulación intraalveolar de varias células mononucleares (principalmente macrófagos), proliferación y persistencia de células tipo II alveolares y engrosamiento intersticial con acúmulo de células linfoides y tejido fibroso. La hiperplasia de fibras musculares lisas en los espacios aéreos, se observan en casos avanzados (Dungworth, 1982).

La neumonía crónica del hombre con estos aspectos histopatológicos ha sido denominados "neumonía intersticial usual" (NIU) por Liebow (1975). Aquellas que presentan otros rasgos diferenciales han recibido distintas denominaciones como "neumonía intersticial descamativa", "neumonía intersticial linfoide", "neumonía intersticial con bronquiolitis obliterante fibrosa" y "neumonía intersticial de células gigantes" (Liebow, 1975).

Dentro de la patología respiratoria humana existen tres trabajos de gran importancia, los cuales centran su atención en los datos clínicos y aspectos patológicos de las neumonías intersticiales. De igual forma encontramos una gran confusión terminológica sobre este tema.

Fue Davison (1983) el primero en describir y denominar a este proceso con el

término de "neumonitis criptogénica organizada" (NOC), por la combinación de hallazgos clínicos y patológicos y la ausencia de un agente etiológico concreto; sin embargo coincide exactamente con las observaciones que hizo Lange en 1901 y que recogió bajo el término de "bronquitis y bronquiolitis obliterante" (BO). Este describió un rasgo histológico caracterizado por la presencia de pequeños nidos de tejido conjuntivo en los espacios aéreos, que indican una organización del exudado existente por fibroblastos y capilares de las paredes alveolares. Algunas de las lesiones microscópicas observadas incluían: fibrosis intraalveolar, células intraalveolares, fibrosis intersticial y células inflamatorias intersticiales (linfocitos y células plasmáticas, así como también algunos neutrófilos y eosinófilos). La alteración histológica básica esta centrada en la región alveolar.

Eppler y col., (1985) revisaron 2000 casos de biopsias pulmonares humanas y observó que 94 de ellos contenían la palabra BO, y de ellos 50 no tenían causa señalada y los cambios patológicos observados de neumonía organizada eran descritos bajo el término de neumonía organizada bronquiolitis obliterante (NOBO).

El modelo histológico era igual que el descrito por Davison en neumonía organizada criptogénica del hombre y también originalmente descritos por Liebow y Carrington (1969) como neumonía bronquiolointersticial.

Geddes (1991) señala que numerosos patólogos humanos describen algunos modelos de respuestas en los pulmones frente a lesiones: bronquiolitis con ó sin obliteración, e inflamación intraalveolar y fibrosis. La forma fue descrita como un

rasgo común en infecciones y fue encontrada con bronquitis y bronquiectasias, pero ocasionalmente suceden aisladas. El modelo, más tarde, fue normalmente visto en el contexto de la neumonía infecciosa organizada, y ocasionalmente origina cambios que se extienden hacia las pequeñas vías respiratorias. Su estudio se centra en las alteraciones de la porción conductora de las vías respiratorias bajas, y lo encuadró dentro de la denominación de "bronquiolitis obliterante" (BO).

Considerando las tres manifestaciones descritas en medicina humana conjuntamente BO (Lange, 1901; Geddes, 1991), NOC (Davison, 1983) y NOBO (Eppler y col., 1985), emergen dos grupos de patologías pulmonares: el primero son enfermedades de las vías respiratorias bajas y alveolos normales y el segundo grupo se corresponde con alteraciones de los alveolos que presentan tejido de granulación y se extiende variablemente hacia la porción conductora.

Sin duda fue Turk y col. (1985) el primero en describir una neumonía intersticial aguda como alveolitis fibrosante en un caballo, señalando la dificultad de alcanzar una conclusión sobre su etiología. Según este autor las lesiones son semejantes a la influenza humana, aunque el título que presentaba para mixovirus por fijación de complemento fue 1/20, insuficiente para adscribirle la lesión.

Otros autores han señalado fibrosis del septo alveolar, y epitelización del alveolo con discreta inflamación mononuclear, como consecuencia de bronquitis y bronquiolitis en los équidos (Ing, 1985).

Lesiones alveolares han sido observadas en caballos con COPD severo, en los

que aparecía principalmente enfisema alveolar. En animales con bronquitis/litis crónica se observó una alveolitis fibrosante, infiltración de células mononucleares incluyendo fibroblastos y mastocitos. Además se apreciaron áreas de reepitelización de neumocitos tipo II y acúmulo de macrófagos alveolares con fagocitosis del surfactante durante la secreción (Kissler, 1980; Kaup y col., 1985).

La apariencia focal de la alveolitis fibrosante debe ser la razón por la que sólo algunos autores han mencionado cambios semejantes en caballos con enfermedad pulmonar crónica (Sasse, 1971; Nicholls, 1978; Schoon y Deegen, 1983 citado por Kaup y col., 1985).

En 1986, Buergelt y col., realizaron un estudio retrospectivo sobre la enfermedad pulmonar proliferativa intersticial de los équidos, profundizando en el tema mediante un completo análisis histopatológico y microbiológico. Señalan algunos aspectos histológicos diferenciales de los expuestos hasta ahora, como necrosis coagulativa de la pared alveolar, con hemorragia focal alveolar y edema en la fase aguda. En casos crónicos, no hay presencia de trombos, pero si de hiperplasia fibromuscular de las áreas menos afectadas; también existe un engrosamiento e hiperplasia del epitelio bronquiolar y algunas veces el lumen de estos bronquiolos contienen: neutrófilos, macrófagos, detritus de células inflamatorias y mucina. En algunos animales las paredes bronquiolares presentan acúmulos de linfocitos. Existen muchas áreas de reemplazamiento del alveolo por colágeno y una fuerte fibrosis del septo interalveolar. Asimismo este autor estima una incidencia del 70 % de neumonías

intersticiales en animales menores de un año.

La mayoría de los autores (Dungwoth, 1982; Buergelt y col., 1986; Winder y Fellenber, 1987; Winder y col., 1988; Marcato, 1990) coinciden en la descripción macroscópica de los pulmones con neumonía intersticial: son órganos que no se colapsan a la apertura de la cavidad torácica; presentan una consistencia compacta, casi carnosa, más prominente en la región del hilio que en las áreas periféricas. El parénquima muestra una alternancia de áreas pálidas blanco amarillentas y áreas de color púrpura. Faltan fenómenos exudativos bronquiales evidentes y lesiones enfisematosas.

Para Winder y Fellenber (1987) la incidencia de este proceso es de un 15,6% e histológicamente diferencian tres tipos de neumonías intersticiales:

- Neumonía crónica granulomatosa broncointersticial,
- Neumonía crónica difusa broncointersticial,
- Neumonía crónica focal intersticial.

Estos mismos autores (Winder y col., 1988) señalaron la escasa incidencia de la neumonía crónica intersticial en el caballo y describen 2 casos inusuales: neumonía broncointersticial granulomatosa semejante a los casos reportados de neumonitis hipersensible en el hombre y neumonía intersticial con bronquiolitis crónica, con etiología, posiblemente, de hipersensibilidad en caballos.

Estas neumonías intersticiales crónicas con o sin granulomas están presentes en todos los casos de neumonitis hipersensible, y la fibrosis intersticial es el cambio más

obvio del estado crónico de la enfermedad (Reyes y col., 1982; Winder y col., 1988).

Un estudio inmunocitoquímico con inmunoglobulinas sobre las neumonitis han puesto de manifiesto un aumento de Ig A, Ig G (Fc) y Ig G (T) en células plasmáticas y macrófagos; este aumento se centra alrededor de los vasos sanguíneos y bronquiolos, semejante al encontrado en COPD de los équidos (Winder y Fellenber, 1986, 1987; Winder y col., 1988). En los tejidos dañados se aprecian numerosos macrófagos con material fagocitado y los complejos inmunológicos probablemente contribuyan a la fibrosis pulmonar (Dungworth, 1982; Winder y col., 1988).

Uno de los libros clásicos de medicina veterinaria Dahme y Weiss (1988), incluye las neumonías intersticiales del caballo, dentro de un proceso respiratorio denominado "Tos del Hipódromo", desencadenado por un virus del género Orthomyxovirus, y dando lugar a las formas crónicas de neumonía; en este mismo grupo se incluyen las neumonías atípicas de los bóvidos, de origen alérgico producido por hipersensibilidad al Actinomyces termófilos; así como el maedi ovino, originado por el virus del Visna-Maedi.

Marcato (1990) indica que los caballos afectados tienen frecuentemente entre 3-6 meses y manifiestan signos de dificultad respiratoria, insensible a la terapia; asimismo señala la dificultad de atribuirle una etiología concreta y de ahí la denominación de neumonía intersticial criptogénica semejante al hombre y a la neumonía intersticial atípica criptogénica del ternero de cría intensiva.

Cordier y col. (1989) en una revisión de 16 pacientes confirman la distribución

alveolar de las alteraciones. Todos los pacientes mostraron algún grado de inflamación intersticial y fibrosis.

Miyagawa y col. (1991) señalaron la presencia de eosinófilos en el material de biopsia de algunos pacientes. Las vías respiratorias bajas estaban relativamente afectadas en este proceso y los alveolos tenían muchos rasgos en común con NOBO/NOC, si bien con un gran predominio de eosinófilos.

En todos los artículos de medicina humana revisados por Geddes (1991), los vasos sanguíneos eran escasos y no había evidencia de infección microbiana.

Du Bois y Geddes (1991) confirman la existencia de 2 entidades clínicamente distintas, pero con aspectos histológicos semejante: bronquiolitis obliterante (BO) y neumonía organizada criptogénica (NOC) ó neumonía organizada bronquitis obliterante (NOBO). La imagen histopatológica coincide con la descrita anteriormente por otros autores, si bien señala que la obliteración de las vías respiratorias bajas por fibrosis madura no ha sido descrita.

Los rasgos patológicos de NOBO coinciden con los de una neumonía organizada y son poco específicos. Hay alguna confusión acerca de la utilización del término NOBO. Algunas veces se aplica a procesos con causa conocida. El hecho de que el mismo modelo suceda como resultado de causas muy diferentes tales como infecciones y drogas, presentando semejantes alteraciones del tejido conjuntivo, confirman que NOBO no es una entidad clínicopatológica aislada sino una forma de respuesta pulmonar frente a distintos insultos. Actualmente se aplica este término con

carácter restrictivo a aquellos casos de causa desconocida (Kitaichi, 1992).

Uno de los tratados más importantes de patología humana (Cotran y col., 1991) establece una división amplia de los procesos respiratorios del hombre:

- 1.- Por una parte describen un grupo de enfermedades que cursan con obstrucción a cualquier nivel de las vías respiratorias: ENFERMEDADES OBSTRUCTIVAS.
- 2.- Por otro lado, agrupa aquellos procesos que cursan con una disminución de la capacidad pulmonar, que afectan al parénquima alveolar: ENFERMEDADES RESTRICTIVAS.

Es en este último punto se encuadran las enfermedades pulmonares intersticiales difusas. Según estos autores la manifestación más precoz de todas ellas es una alveolitis, es decir, una acumulación en el interior de las estructuras alveolares de células descamadas e inflamatorias.

Barkerville y col. (1992) realizan un estudio experimental con monos rhesus mediante la inoculación del virus de inmunodeficiencia del simio. Los resultados mostraron que un 20% de los animales desarrollaron una neumonía intersticial caracterizada por una infiltración difusa del pulmón por linfocitos, células plasmáticas y otros elementos linfoides, que siguiendo la clasificación de Liebow, incluyeron dentro de las neumonías intersticiales linfoides. Parece ser que este tipo neumónico tiene una conexión compleja con los linfomas, y que está relacionado con infecciones virales y fenómenos inmunológicos.

Quizá, una de las últimas aportaciones, en el campo de las neumonías

intersticiales de équidos, haya sido un caso de enfermedad intersticial aguda eosinofílica en un poni (Dixon y col., 1992). El animal presentó una alteración respiratoria severa, típica de una neumonía intersticial aguda (alveolitis), caracterizada por una exudación masiva de un fluido rico en eosinófilos, que procedía de las vías respiratorias bajas. No hubo evidencia de parasitosis, y sí parecía tener una etiología inmunitaria. Este hecho fue comprobado, ya que el animal no respondía al tratamiento con antibióticos y sí a los corticosteroides. Casos semejantes han sido descritos en el hombre por Carrington y col. (1969), Fox y Seed (1980) (citados por Dixon y col., 1992) y Selman y Barrios (1991), como neumonía eosinofílica aguda mediada por reacción inmune; sin embargo, su causa etiológica permanece desconocida.

En la actualidad, las investigaciones en medicina humana se centran en las diferentes entidades descritas como neumonías intersticiales; su estudio se realiza con técnicas sofisticadas tanto clínicas (tomografía computerizada de alta resolución y scanning) como patológicas (hibridación in situ e inmunocitoquímica, entre otras). Son escasos los trabajos publicados al respecto (Selman y Barrios, 1991; Nishimura y col., 1992; Honma y col., 1992; Usui y col., 1992); uno de los más sobresalientes es el realizado por Honma y col. (1992), que establecen criterios clínicos y patológicos sobre la neumonía intersticial idiopática. Así divide a esta por su curso clínico en aguda y crónica. Posteriormente y por los hallazgos patológicos, las agrupan en dos tipos: neumonía típica y atípica. En el tipo agudo están presente una alveolitis con marcado edema e infiltración celular de la pared alveolar y formación de membranas

hialinas. La forma típica de la neumonía crónica sólo presenta cambios patológicos clásicos de neumonía intersticial y/o fibrosis representada por la imagen de "honeycomb" (panal de abeja). La forma atípica tiene ambos cambios intersticiales, formación de una cicatriz interalveolar y fibrosis, secundariamente se origina un enfisema bulloso. Sin embargo todavía permanece obscura la continuidad entre el curso agudo y crónico.

En la actualidad Dungworth (1992) mantiene la división de las neumonías intersticiales en agudas y crónicas que realizó en 1982 en los animales domésticos, si bien contempla algunos trabajos realizados en patología humana, haciendo especial hincapié en algunos factores que estimulan o inhiben la síntesis de colágeno y la proliferación fibroblástica. En el caso de las neumonías intersticiales crónicas, establece distintas categorías, según la etiología del proceso que provoca dicho proceso.

Un hecho importante, aportado por este autor ha sido el establecimiento de la neumonía broncointersticial por primera vez en veterinaria, como una entidad aislada tanto de los procesos bronconeumonónicos como intersticiales propiamente.

Como vemos la mayoría de los estudios actuales se centran en el campo de la histopatología humana, y abarcan a un grupo de entidades morbosas que tienen como patrón histológico común en su fase final la fibrosis pulmonar. Es por ello, que dedicaremos la parte final de nuestro estudio, a la revisión de este proceso y a su conexión con proteínas de matriz extracelular.

### **III.- FIBROSIS PULMONAR.**

Este apartado de la revisión bibliográfica se centra en la fibrosis pulmonar que se produce en el transcurso de la neumonía intersticial. Ambas entidades han sido ampliamente estudiadas en medicina humana y así nos encontramos con que la mayoría de las referencias y los últimos avances de estos procesos patológicos se refieren a enfermedades pulmonares del hombre o modelos experimentales en animales de laboratorio.

Desde hace tiempo se conoce un grupo de enfermedades humanas de etiología incierta, las cuales predisponen a una fibrosis alveolar intersticial crónica. Estas tienen un inicio normalmente subpleural y se encuadran dentro de las enfermedades del colágeno entre las que se incluyen la "enfermedad reumatoide", "dermatomiositis", "esclerosis sistémica progresiva", "lupus difuso eritematoso", "pulmón de Hamman-Rich", "alveolitis esclerosante" y "neumonía intersticial usual", entre otras (Hamman y Rich, 1944).

Pratt (1958) fue el primer médico en relacionar los cambios que se producían en el parénquima pulmonar después de la administración terapéutica de oxígeno, observando las mismas lesiones en pacientes que morían de causas muy diferentes. Uno de los primeros cambios que aparecían fue la congestión de los capilares

alveolares, seguida de una proliferación capilar y ocasionalmente de una fibrosis intersticial.

Asimismo, Cederberg y col. (1965) observaron que aunque la presencia de membranas hialinas no es un signo patognomónico de la intoxicación por oxígeno, consideran a este como un hallazgo inicial y típico en pacientes sometidos a altas concentraciones de oxígeno.

Según algunos autores (Auerbach y col., 1952; Liebow, 1975) en procesos agudos que causan lesión pulmonar, ya sean de causa conocida (exposición continua a altas concentraciones de oxígeno, mercurio, óxido de cadmio, dióxido de nitrógeno y radiaciones, así como también en neumonías agudas por bacterias, virus, rickettsias y protozoos) o no, el epitelio alveolar puede ser destruido por completo o en parte, y el endotelio capilar alveolar sufrir diferentes grados de alteración.

En el hombre, durante esta fase temprana de lesión, el lumen alveolar se rellena con plasma como consecuencia de la lesión vascular, produciéndose posteriormente presencia de fibrinógeno en luces alveolares que se solidifica, organiza y origina la formación de membranas hialinas (Auerbach y col., 1952). Acompañando a estas alteraciones, existe un gran número de neumocitos granulares descamados en la luz del alveolo; el intersticio de las paredes alveolares se infiltra con linfocitos incluyendo centros germinales, eosinófilos, células plasmáticas y una pequeña cantidad de tejido conjuntivo fibroso. La arquitectura alveolar está alterada y la muerte del individuo se producía rápidamente como consecuencia de una insuficiencia respiratoria (Spencer,

1975).

Este proceso inicial recibió la denominación de neumonía intersticial descamativa (N.I.D) por Liebow y col. 1965.

En aquellos casos en los que el individuo o el modelo experimental sobrevivían, se presentaba una rápida organización del exudado fibrinoso intraalveolar por un proceso análogo a la incorporación del trombo mural a la íntima de la pared de los vasos sanguíneos. Las paredes de los alveolos sufrían un engrosamiento, llegando a producir en algunas zonas una total obliteración del espacio alveolar. Los capilares supervivientes están muy dilatados pero el lecho capilar aparecía disminuido. Algunas paredes alveolares eran destruidas y como resultado aparecían áreas enfisematosas. El número de fibroblastos aumentaba progresivamente en el intersticio alveolar. Los neumocitos tipo II granulares se regeneraban y cubrían la superficie de la masa contráctil de fibrina, mientras que la hendidura originada por la contracción de la masa de fibrina intralveolar estaba ocupada por células potencialmente fibroblásticas. Temporalmente quedaba una pequeña placa de tejido fibroso en el intersticio de la pared alveolar como restos de la reorganización (Auerbach y col., 1952; Spencer, 1975).

En la fibrosis pulmonar intersticial se produce un estado persistente de edema alveolar intersticial. Este edema crónico produce un engrosamiento y fibrosis del septo interlobulillar, así como también la dilatación de los vasos linfáticos. En la mayoría de los casos de fibrosis alveolar establecida, los cambios resultan en parte, como

consecuencia de ambos procesos: la presencia de edema crónico y la fibrosis, aunque el mecanismo responsable de estos cambios se desconoce en muchos casos (Spencer, 1975).

La mayoría del exudado fibrinoso es eliminado sin residuos, por enzimas fibrinolíticas. Algunas de estas son liberadas por la desintegración de neutrófilos y células macrofágicas, especialmente si el exudado ha resultado de una neumonía bacteriana. En el hombre se ha observado un incremento de la incidencia de fibrosis pulmonar intersticial en los últimos años como consecuencia de una incompleta resolución de exudados neumónicos, causados por la inhibición de la respuesta de células inflamatorias tras un tratamiento antibiotico (Auerbach y col., 1952; Spencer, 1975).

En general, el agente causal que produce el exudado intraalveolar alcanza el pulmón vía aerógena, sin embargo en ocasiones puede llegar a la pared alveolar por la sangre (vía hemática). Esto sucede en algunos procesos como el síndrome urémico o la fiebre reumática aguda como respuesta inmunológica al estreptococo  $\beta$  hemolítico, exposición a paraquant o bleomicina. En estas condiciones, se produce una gran cantidad de exudado intraalveolar rico en fibrina, que llena la luz alveolar. Además el tejido conjuntivo se extiende hacia el interior de los conductos alveolares y los bronquiolos respiratorios distales produciendo bronquiolitis obliterante, hecho que ya fue descrito por Masson y col. en 1937 (Spencer, 1975; Adamson y Bowden, 1979).

A raíz de estas observaciones, Liebow (1975), señala un tipo de neumonía

intersticial con bronquiolitis obliterante, caracterizada por la organización de placas fibrosas intrabronquiolares en el curso de una neumonía intersticial usual. Eppler y col. (1985) recogen cambios histopatológicos semejantes dentro del término de bronquiolitis obliterante con neumonía organizada. Sin embargo, los hallazgos posteriores realizados con microscopía electrónica, sugieren que la organización conjuntiva del proceso debe empezar en estructuras distales a los acinis más que en los bronquiolos (Kawanami y col., 1982; Fukuda y col., 1987).

Otras lesiones pulmonares infrecuentes, causan grados variables de fibrosis intersticial pulmonar, son la neumonía intersticial linfoide (N.I.L) y la neumonía intersticial de células gigantes (N.I.C.G) (Liebow, 1975; Spencer, 1975).

Una de las alteraciones intersticiales del pulmón que ha acaparado mayor atención en los últimos años, ha sido la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) del hombre de causa desconocida. En este sentido la neumonía intersticial usual (N.I.U.) en medicina humana, ha sido definida como una lesión difusa pulmonar la cual finaliza con fibrosis intersticial, envolviendo a los bronquiolos respiratorios, conductos alveolares y primariamente a los alveolos (Spencer, 1975); esta se encuadra en el grupo de enfermedades del hombre de causa desconocida que cursan con fibrosis alveolar intersticial crónica (neumonías intersticiales crónicas).

Spencer (1975) señaló en el curso de algunos procesos patológicos tales como abscesos pulmonares y tuberculosis caseosa que se produce una cicatriz fibrosa. Pero incluso en estas alteraciones, donde el daño final es amplio, la lesión es menor que la

originada en la fibrosis alveolar como secuela de neumonías intersticiales. Por otra parte un menor grado de lesión pulmonar puede originar la destrucción de la pared alveolar, dando lugar al enfisema. No es infrecuente por tanto, encontrar pequeñas áreas focales de pulmón enfisematoso, como consecuencia de una fibrosis intersticial alveolar.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) ha sido definida por algunos autores (Fulmer, 1982; Crystal, 1987; Selman, 1990; Selman y Barrios, 1991) como una lesión crónica del tracto respiratorio inferior que incluye inflamación y una alteración progresiva de la unidad alveolo-capilar en el proceso fibrótico. Este consiste, en un aumento en la población fibroblástica y un acúmulo excesivo de colágeno intersticial, el cual origina una alteración del intercambio gaseoso, causando fallo respiratorio progresivo. La fibrosis puede ser localizada en el interior del intersticio alveolar o extenderse al espacio alveolar.

Para Katzenstein y col. (1976) el daño alveolar difuso, es una reacción inespecífica del pulmón a multitud de agentes lesionantes, cuyo denominador común es la lesión del endotelio y epitelio alveolar, la cual puede producir la salida de fluidos y células, y en algunos casos progresa hacia fibrosis intersticial extensa.

Dungworth (1982) en medicina veterinaria determina, que la producción de fibrosis es un rasgo crítico de la fase proliferativa, porque es considerado generalmente como irreversible, al menos en su forma madura. La proliferación de fibroblastos puede ocurrir tempranamente 72 horas después de daños severos alveolares. Es más evidente

cuando el alveolo esta lleno con exudados fibrinosos. Se observan además profibroblastos en el interior del alveolo en pulmones de ratas de tres días de edad después de la inyección con paraquant. Este mismo autor, comenta que la matriz de colágeno puede ser detectada histológicamente en 5-7 días después de observar el exudado alveolar de fibrina, y una fibrosis intersticial. Ambas fibrosis, intraalveolar y/e interalveolar son secuelas de lesiones exudativas severas. Por tanto el rango de fibrosis es dependiente de la intensidad de la inflamación.

Estudios realizados en medicina humana han centrado sus investigaciones en los cambios fibróticos que suceden en otras enfermedades, y así señalan el daño alveolar difuso como la alteración más frecuente en pacientes con síndrome respiratoria de distress del adulto (SRDA), donde se producen fenómenos fibróticos en estadios iniciales de la enfermedad (Katzenstein y Askin, 1982a).

En la fase aguda del síndrome respiratorio del distress agudo (SRDA), se observa un edema alveolar y formación de membranas hialinas. Estas últimas se desarrollan en los conductos alveolares y en algunos casos se localizan de forma difusa sobre las paredes alveolares, provocándose a continuación una fibrosis intraalveolar (Fukuda y col., 1987).

Es principalmente en la década de los 80 cuando la fibrosis pulmonar recibió mayor atención. Así se realizó una clasificación morfológica del proceso patológico siguiendo dos modelos: fibrosis intersticial e intraalveolar (Katzenstein y Askin, 1982b; Basset y col., 1984; Fukuda y col., 1987; Hara y col., 1989).

Según Basset y col. (1986) y Fukuda y col. (1987), el estado proliferativo abarca procesos crónicos tales como la neumonitis crónica organizada. Además consideran dos etapas en esta proliferación: Inicial y de Remodelación.

La etapa inicial se caracterizaba por la observación de una pared alveolar engrosada, asociada con edema y presencia de células intersticiales. La formación de membranas hialinas está asociada con fibrosis intraalveolar. Este tipo de fibrosis podía tener tres modelos de organización:

- 1.- **Masas intraluminales**, las cuales están conectadas con la pared alveolar por un pedículo estrecho y que llena parcialmente el espacio aéreo.
- 2.- **Cambios obliterativos**, consistentes en una fibrosis intraluminal difusa que obstruye completamente el espacio alveolar.
- 3.- **Incorporación mural**, son masas fibróticas sobre las paredes alveolares del conducto alveolar ó estructuras alveolares, normalmente localizadas bajo las membranas hialinas.

Las masas intraluminales generalmente son aisladas, de tejido conjuntivo y pobres en células. Las células y fibras de tejido conjuntivo tienen una disposición concéntrica o paralela. No existe tapizado de células epiteliales sobre la organización intraluminal y la vascularización es pobre o ausente.

Esta última etapa de remodelación, muestra una lesión fibrótica y obliteración de alveolos. Las paredes alveolares se muestran irregulares en grosor y están cubiertas por una o varias capas de células epiteliales estratificadas o cúbicas, asociadas a una

dilatación irregular de los espacios aéreos (Basset y col., 1986; Fukuda y col., 1987).

Realmente a este proceso de fibrosis intraalveolar se le ha prestado menor atención que al fenómeno intersticial, y quizás sea Fukuda y col. (1987), quienes mejor resumen esta lesión como consecuencia de un daño difuso alveolar:

- Lesión de las células epiteliales, denudación y formación de una hendidura de la membrana basal epitelial.
- Activación y migración de miofibroblastos hacia el espacio intraalveolar a través de la hendidura de la membrana epitelial.
- Ataque de los miofibroblastos migrados al lado luminal de la membrana epitelial.
- Producción de elementos extracelulares de tejido conectivo dentro del espacio intraalveolar.

La activación, migración y proliferación de estas células intersticiales y la regeneración de las células epiteliales en el alveolo va a depender de varios factores quimiotácticos y de crecimiento liberados por macrófagos activados y otras células inflamatorias (Crystal y col., 1984; Fukuda y col., 1985, 1987).

Adamson y col. (1988) desarrollan un modelo experimental de fibrosis pulmonar utilizando ratones y sometiénolos a altas concentraciones de oxígeno; estos radicales libres tienen su primer efecto sobre las células de la barrera aire/sangre, especialmente del endotelio capilar y el epitelio alveolar tipo I. Asimismo han observado que la reacción fibrótica desarrollada en el tejido pulmonar procedente de estos animales, libre de células sanguíneas y otros agentes circulantes, sugiere que la pérdida de la

interacción epitelio/fibroblastos por necrosis epitelial y retraso en la reparación, debe ser suficiente para promover el crecimiento fibroblástico y un exceso de depósito de colágeno.

La localización de la fibrosis juega un papel muy importante en la patogenía de las enfermedades intersticiales fibróticas del pulmón. De hecho, algunos autores (Basset y col., 1986; Hara y col., 1989) señalan que las enfermedades intersticiales están más frecuentemente asociadas con la fibrosis intraalveolar de lo que se pensaba hasta ahora.

Durante las últimas décadas, se ha observado que la fibrosis pulmonar es una de las respuestas tisulares del parénquima pulmonar a muchas y variadas causas de lesión, produciéndose en gran cantidad de procesos, independientemente de la especie animal, y generalmente avanza hacia estadios finales de la enfermedad (Spencer, 1975; Hara y col., 1989; Barrios y Selman, 1991).

Es importante destacar, que ya sea fibrosis intersticial o intraalveolar, ambos compartimentos se van a encontrar afectados, originándose finalmente una fibrosis pulmonar total o más comúnmente denominada "pulmón en panal de abeja" ("honeycomb lung") (Basset y col., 1986; Fukuda y col., 1987; Barrios y Selman, 1991; Harrison y Laurent, 1991).

La patogenía de la fibrosis intersticial pulmonar incluye una serie compleja de pasos, pobremente comprendidos, en los cuales, las distintas células pulmonares, inmunes e inflamatorias, interaccionan célula-célula mediante señales, factores de

estimulación e inhibición y probablemente mediadas por una susceptibilidad genética (Schraufnagel y col., 1987; Selman, 1989; Pardo y Selman, 1991).

Por ello debemos tener en cuenta la existencia de diferentes mecanismos, los cuales potencialmente pueden dirigir la excesiva deposición de colágeno y otras proteínas de matriz en el intersticio pulmonar. Las teorías normales están basadas sobre la hipótesis de que hay una alveolitis la cual inicia y debe perpetuar el desarrollo de la fibrosis pulmonar por estimulación de la proliferación fibroblástica dentro del intersticio (Spencer, 1975; Liebow, 1975; Beurgelt y col., 1986; Barrios y Selman, 1991; Dixon y col., 1992; Dungworth, 1992).

Para facilitar la revisión sobre el estudio de la fibrosis pulmonar, vamos a dividir este apartado en dos puntos:

III.1.- Proliferación fibroblástica.

III.2.- Metabolismo del colágeno fibroblástico del pulmón: Depósito de colágeno.

### **III.1.- PROLIFERACION FIBROBLASTICA**

Elsdale y Bard (1974) exponen que la superficie del epitelio pulmonar es invariablemente no adhesiva para los fibroblastos u otras células epiteliales, indicando que los fibroblastos no deben proliferar sobre el epitelio.

Las lesiones graves en la superficie del epitelio del pulmón deben ser similares a la reparación de una herida en la piel donde lesiones extensas o con reparación retardada estan asociadas con una cicatriz. Es posible que como resultado de lesiones severas se produzca la alteración prolongada de la relación intercelular normal, sobre todo entre las células epiteliales y los fibroblastos. El control de la proliferación de células mesenquimatosas ha sido también estudiado mediante experimentación "in vitro", obteniendo un sobrecrecimiento del tejido conjuntivo si no se le añaden células epiteliales. Por ello, las células epiteliales estan envueltas en el control del crecimiento fibroblástico, y así la pérdida de relación por lesiones severas, como la producida por hiperoxia prolongada, produce un aumento del depósito de colágeno y una proliferación fibroblástica (Spencer, 1975).

Es posible que "in vivo", cuando el sustrato normal de colágeno se pierde o digiere, la base de matriz extracelular que inhibe el crecimiento fibroblástico se pierda también, y resulte una proliferación fibroblástica (Raghu y col., 1985).

Este mecanismo se considera de gran importancia en la patogenia de la fibrosis pulmonar ya que el número de fibroblastos está aumentado en la enfermedad pulmonar fibrótica (Adler y col., 1986; Basset y Soler, 1987).

Algunos autores (Postlethwaite y col., 1984; Adler y col., 1986; Basset y Soler, 1987; Wahl y col., 1987; Selman y Barrios, 1991) han demostrado que las células inflamatorias localizadas en el tracto respiratorio pueden producir mediadores para la proliferación fibroblástica y consideran de gran importancia, por su íntima proximidad a las células productoras de colágeno, a los macrófagos y linfocitos intersticiales.

La máxima atención se ha centrado en los macrófagos alveolares obtenidos por lavados broncoalveolares, ya que su estudio "in vitro" es más accesible, observándose un considerable aumento en el número de macrófagos alveolares activados que están presentes en muchas enfermedades intersticiales pulmonares. Tanto macrófagos como linfocitos están presentes en el intersticio de individuos con fibrosis pulmonar. Estas células liberan varios mediadores potentes los cuales pueden estimular la proliferación fibroblástica y son quimiotácticos para las células mesenquimatosas (Spencer, 1975; Martínet y col., 1987).

Sin embargo, hay hipótesis alternativas las cuales han sido propuestas para explicar las observaciones de un aumento en el número de fibroblastos y así:

Jordana y col. (1988a) y Adamson y col. (1988) recientemente demostraron que cultivos in vitro de fibroblastos derivados de tejidos pulmonares fibróticos proliferan más rápidamente que los controles. Ellos observan una marcada heterogenicidad en las

características proliferativas con ciertos clones derivados de líneas celulares que exhiben un fenotipo de rápida replicación. Estos autores proponen que las condiciones de lesión y reparación prevalecen en el medio del tracto respiratorio inferior, el cual seleccionaría estos clones de rápida división y permitiría su predominio.

Otros autores (Raghu y col., 1988; Selman y Barrios, 1991), también encontraron variabilidad en el rango de proliferación fibroblástica en diferentes áreas de los pulmones.

Varios estudios realizados en medicina humana sugieren que los mastocitos juegan un papel importante en la modulación del proceso fibrótico. En la fibrosis pulmonar ha sido observado un incremento en el número de estas células (Kawanami y col., 1979). Los niveles de histamina están elevados en el fluido del lavado broncoalveolar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, y los macrófagos alveolares poseen un receptor  $H_2$  y pueden liberar un factor desencadenante de histamina en los mastocitos pulmonares humanos (Schulman y col., 1989). La histamina puede también, bajo determinadas condiciones, estimular la proliferación fibroblástica (Jordana y col., 1988b).

Adamson y col. (1988) realizan una importante aportación, estableciendo la relación entre las lesiones del epitelio alveolar y su reparación como inducción de fibrosis pulmonar en animales de experimentación (ratones Swiss-Webster). Esto sugiere que el crecimiento preferencial de los fibroblastos es un resultado directo de la necrosis celular, en concreto del epitelio.

En el pulmón normal, la producción celular es baja, y hay escasa proliferación de fibroblastos intersticiales, a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos e incluso en distintos lugares anatómicos, donde se observa una heterogenicidad fibroblástica (Adamson, 1985; Adamson y col., 1988). Este hecho ha sido corroborado por Phipps y col. (1990), los cuales afirman que el pulmón normal humano exhibe una morfología heterogénea única. Sin embargo contrasta con los hallazgos de Raghu y Kavanagh (1991), quienes describieron numerosas poblaciones fibroblásticas en el pulmón, que demostrarían la marcada heterogenicidad de este tipo celular en este órgano.

Hay por tanto hallazgos que demuestran que la deposición del colágeno pulmonar resulta de la proliferación fibroblástica, en respuesta a la presencia de células mediadoras y aunque la relación entre el aumento en el número de fibroblastos y el aumento de síntesis del colágeno pulmonar ha sido demostrado, las señales reguladoras de la biosíntesis del colágeno que también son importantes, han sido poco investigadas (Selman y Barrios, 1991).

### **III. 2.- METABOLISMO DEL COLAGENO EN EL PULMON:**

#### **DEPOSITO DE COLAGENO**

El término de fibrosis se refiere a un aumento en los elementos del tejido conjuntivo con respecto al número de células especializadas. El tejido fibroso es definido como un aumento en la cantidad de colágeno (absoluto y/o relativo) en relación a muchas otras moléculas que están normalmente presentes en el mismo tejido (Montfort y Pérez-Tamayo, 1978).

El rasgo común de fibrosis debe ser un desequilibrio en la homeostasis normal del colágeno; la síntesis excede a la degradación, resultando un acúmulo excesivo de esta proteína (Laurent, 1986).

Huybrechts y col. (1979) y Hauser y Vaes (1979) han demostrado la cooperación de linfocitos, macrófagos y fibroblastos en la degradación inflamatoria de los componentes de la matriz extracelular.

Hay algunas investigaciones relativas a fibrosis experimental que demuestran, la importancia del modelo catabólico del colágeno en el desarrollo de la fibrosis y así: Laurent y McAnulty (1983) en el conejo inducen fibrosis mediante tratamiento con bleomicina; Phan y col. (1981) en rata con el mismo producto y Takahashi y Koda (1984) en hígados de ratón con esquistosomiasis; todos ellos coinciden con una

marcada disminución en la actividad colagenolítica como causa de fibrosis pulmonar y hepática.

Christner y col. (1985), realizaron un estudio de actividad enzimática en el hombre mediante lavados broncoalveolares con "síndrome respiratorio del distress agudo" (SRDA), señalando una actividad enzimática positiva frente al colágeno I y III. Por tanto, el aumento de la actividad colagenasa tipo I debe reflejar el fenómeno inflamatorio, principalmente la alveolitis neutrofílica, la cual parece ser necesaria para que el pulmón vuelva a su estructura y fisiología normal.

El estudio de las interacciones entre las células inmunes y fibroblastos ha demostrado la existencia de varios mecanismos que participan en la modulación de síntesis de colágeno en procesos de reparación y en fibrogénesis; todo esto incluye al menos 3 posibilidades de identificación:

- 1.- Secrección de **componentes químiotácticos** para fibroblastos. Sus efectos deben alterar el número local de células atraídas para la síntesis de colágeno (Postlethwaite y col., 1980).
- 2.- Secrección de **factores mitóticos** que inducen la proliferación de fibroblastos. Esta acción debe ser equivalente a quimioatracción, aumentando el número total de fibroblastos por área (Postlethwaite y col., 1984).
- 3.- Secrección de **inductores a la síntesis de colágeno** que ejercen su acción por estimulación directa de fibroblastos existentes. Esta respuesta produce al aumento de síntesis de colágeno y secrección sin duplicación (Seyer, 1985).

El papel de las células T y macrófagos en la modulación de la actividad fibroblástica y el depósito de colágeno, ha sido analizado en ciertas condiciones fibróticas asociadas con las reacciones de inmunidad mediada por células. Una de estas condiciones fibróticas incluye granulomas (Goodwin y col., 1972), enfermedades inducidas por parásitos (Jafee y Claman, 1983), esclerosis sistémica progresiva (Cathcart y Krakauer, 1981) y fibrosis pulmonar idiopática (Bitterman y col., 1983; Rochemonteix-Galve y col., 1990). En estas alteraciones ha sido descrito un aumento del número de mastocitos.

Schmidt y col. (1984) demostraron que los factores contenidos en el "sobrenadante" ("supernatant") de sílice del medio de cultivo, estimulaban los macrófagos, hecho que previamente había sido descrito por Heppleston y Styles (1967) siendo identificado este producto secretor macrofágico como interleukina-1 (IL-1).

Algunos autores (Sugarman y col., 1985) observaron que los macrófagos estimulados secretaban 3 potentes efectores sobre la función fibroblástica: fibronectina, PDGF y factor de crecimiento derivado de macrófagos alveolares.

Así algunos estudios "in vitro" han comprobado que los macrófagos pueden modular fuertemente las funciones de los fibroblastos; Diegelmann y col. (1986) utilizando el sobrenadante ("supernatants") de macrófagos activados en cultivos celulares, mostraron cambios en la conducta de los fibroblastos a través de factores quimiotácticos.

El catabolismo tisular del colágeno incluye la degradación de las fibras de

colágeno, proteoglicanos y otros agregados macromoleculares. Su disolución es debida a la secreción por células vecinas (macrófagos y fibroblastos) de metaloproteinasas de matriz (MMP), un grupo de enzimas capaces de hidrolizarlos. La degradación de la matriz extracelular es función de un grupo de metaloenzimas, colagenasas de mamíferos, que exhiben una especificidad sobre el tipo de colágeno, dependiente del pH neutro y con requerimiento de calcio para su actividad. La degradación de proteoglicanos sucede bajo la acción de otra MMP, estromelina, y con la participación de distintas proteasas no específicas. Su actividad es modulada por factores que producen los linfocitos estimulados (Huybrechts y col., 1979; Hauser y Vaes, 1979; Werb y col., 1980; Reynolds, 1985; Chin y col., 1985).

La participación de linfocitos T en la patogenia de la fibrosis ha sido recogida por Callis y Lucas (1986) usando ratones deficientes en este tipo celular (Swiss nude). Ellos muestran que los cambios inflamatorios que se producen después de la inhalación de sílice, están disminuidos en animales inmunodeficientes, observándose al mismo tiempo una caída o supresión en la deposición de colágeno pulmonar.

Son escasos los estudios relativos al metabolismo del colágeno en pulmones normales y fibróticos humanos, principalmente aquellos relacionados con la degradación del colágeno. Selman y col., (1986) analizan el metabolismo del colágeno en tejido pulmonar de 11 pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, comparándolos con individuos control. El resultado fue un aumento significativo del contenido de colágeno en los individuos con fibrosis pulmonar.

Otra posibilidad que produciría un incremento de colágeno sería un aumento de la transcripción de los genes de colágeno y un aumento de la traslación ó reducción de la degradación del RNA mensajero del procolágeno (Sporn y col., 1987).

Normalmente es considerado al fibroblasto como la clásica célula fibrogénica, sin embargo existen otras células de origen no mesodermal que pueden jugar un papel importante en la síntesis de colágeno bajo circunstancias normales o no. Así, Grouch y col. (1987), utilizando cultivos primarios de células epiteliales tipo II de pulmón de rata, demostraron la producción de proteínas de colágeno por estas células. El colágeno identificado es relacionado genéticamente con el tipo IV. Hay evidencias histológicas de la presencia de neumocitos tipo II en áreas con diferentes grados de fibrosis en alteraciones pulmonares intersticiales, elevando la posibilidad del papel que ellos deben jugar en la producción de colágeno (Selman, 1989).

Por otro lado, un grupo amplio de estudios ha mostrado que una caída en la degradación de colágeno está íntimamente relacionado con el desarrollo de la fibrosis y con una disminución selectiva de la actividad colagenasa, especialmente en las fases tardías de su evolución. Así el análisis molecular de la fibrosis incluye cirrosis hepática del hombre (Pérez-Tamayo, 1982), fibrosis pulmonar idiopática del hombre (Selman y col., 1986), neumonitis hipersensible del hombre (Selman y col., 1988) y modelos animales de fibrosis pulmonar (Selman y col., 1985), renal (González-Avila y col., 1988) y hepática (Pérez-Tamayo y col., 1987).

La patogenía de la fibrosis intersticial pulmonar incluye una serie compleja de

procesos pobremente comprendidos en los cuales las células inmunes e inflamatorias, interaccionan célula-célula con factores de estimulación e inhibición y probablemente ello se una a ciertas susceptibilidades relacionadas genéticamente, con participación en grados variables de cada factor mencionado (Schraufnagel y col., 1987; Selman, 1989).

Ramos y col. (1988) y Selman y col. (1989) comprobaron que la síntesis de colágeno no muestra diferencias significativas en el pulmón del hombre, entre dos grupos de individuos estudiados: sanos y con fibrosis pulmonar. Estos hallazgos fueron inesperados, ya que en muchos modelos animales de fibrosis pulmonar, casi siempre se observa un aumento en la síntesis de colágeno.

Un acúmulo excesivo de matriz extracelular en el pulmón, es el resultado de un complejo proceso de influencias sobre el gen regulador, parte del cual debe ser debido a la presencia de citoquinas inflamatorias, que directamente estimulan la síntesis de dicha matriz (Davidson, 1990).

Montaño y col. (1989) y Pardo y Selman (1991) observaron que los pacientes con estados avanzados de enfermedad pulmonar, que tenían un claro dominio de la fibrosis sobre la inflamación, presentaban un notable descenso en la degradación del colágeno; este hecho, junto con una síntesis normal, sugiere la persistencia y progresión de la fibrosis, la cual podría estar íntimamente relacionada con una disminución en la actividad colagenolítica. Aunque la causa molecular del defecto es desconocido, varias hipótesis sugieren que una alta cantidad de inhibidores de la colagenasa están envueltos en el desarrollo del proceso.

Numerosos han sido los estudios realizados en el hombre (Selman y col., 1986; Pardo y Selman, 1991) y modelos animales (Ramos y col., 1988; Selman y col., 1989), para determinar posibles cambios en el metabolismo del colágeno sobre todo lo que se refiere a la actividad colagenolítica.

Los resultados de Pardo y Selman (1991) sugieren que una baja actividad colagenolítica está asociada con la presencia de fibrogénesis y que en algunos animales de experimentación, a los cuales se les sometía a paraquat y altas concentraciones de oxígeno para la inducción de la fibrosis pulmonar, deben exhibir esta alteración en estadios tempranos de la evolución de esta enfermedad, fijado en tres semanas.

Según dichos autores, durante el proceso evolutivo de la fibrosis pulmonar se produce una pérdida de la homeostasis del colágeno. Una secuencia hipotética de los cambios patológicos que se producen durante la fibrosis pulmonar incluiría: después de la lesión inicial hay una inflamación, seguida por un aumento en la secreción de factores de crecimiento y consecuentemente la proliferación fibroblástica. Inmediatamente, aparece una fibrosis progresiva. Durante la inflamación debería estar aumentada potencialmente la actividad colagenolítica, pero la fibrosis ocurre cuando la degradación del colágeno empieza a disminuir. Después de la proliferación fibroblástica debería haber dos picos transitorios de aumento en la síntesis de colágeno: el primero podría corresponder a colágeno tipo III y en el segundo al colágeno tipo I (y quizá V), el cual es el principal tipo genético en la forma avanzada de la fibrosis pulmonar en el hombre. Aunque la síntesis del colágeno debería volver después de un

tiempo a valores normales, la relación con la degradación de colágeno es siempre anormal, el rango entre la síntesis y degradación es más alto que el normal, sin considerar sus valores individuales. De hecho es obvio que no podemos deshechar el aumento de síntesis de colágeno en la patogenia de la fibrosis pulmonar.

También es importante señalar las altas concentraciones de sustancias inhibitoras de las colagenasas en individuos con fibrosis pulmonar idiopática (Pardo y Selman, 1991).

La modulación fisiológica de la degradación de la matriz extracelular del pulmón es desconocida; sin embargo, ha sido obtenida una gran cantidad de información utilizando células ó tejidos derivados de reacciones de varias inflamaciones. Esto permite la investigación de las interacciones célula-célula las cuales se dirigen hacia la secrección de proteasas que degradan la matriz extracelular (Vadillo-Ortega y González-Avila, 1991).

Durante intercambios extensos de tejido conjuntivo, como sucede en la fase de reparación de una inflamación, hay una compleja red de señales de comunicación que coordinan la reparación de zonas de matriz extracelular previamente a la destrucción por la respuesta inflamatoria. Estas señales ligan las células efectoras inmunes y las poblaciones celulares locales; las formas incluyen linfocitos T y macrófagos, y más tarde comprenden fibroblastos (Selman y Barrios, 1991).

De esta forma, la producción de colágeno por los fibroblastos en la inflamación es modulada por la activación de las células inmunes y es muy posible que una

regulación anómala de esta interpretación, debe disparar el depósito fibrótico de colágeno (Vadillo-Ortega y González-Avila, 1991).

Por tanto, la excesiva deposición de colágeno en la fibrosis puede ser debida a un aumento de la síntesis de colágeno, disminución de la degradación de colágeno, o ambos procesos operan simultáneamente o en períodos distintos (Pardo y Selman, 1991).

En la actualidad algunos autores (Pardo y Selman, 1991) señalan que el último mecanismo que dirige el desarrollo de la fibrosis pulmonar depende del conocimiento sobre el metabolismo del colágeno y las otras moléculas de la matriz extracelular, controladas bajo condiciones fisiológicas. La pérdida de su regulación durante estados inflamatorios y fibroproliferativos sucede a lo largo de diferentes enfermedades fibróticas (fibrosis idiopática pulmonar, neumonitis hipersensible, entre otras). Por tanto es importante conocer el rango de producción del colágeno en condiciones normales y patológicas.

#### **IV.- PROTEINAS DE MATRIZ EXTRACELULAR**

##### **EN EL PULMON.**

La importancia de la matriz extracelular para la forma y diferenciación celular, embriogénesis y enfermedad ha sido ampliamente reconocida por gran número de autores (Gross, 1974; Stenman y Vaheri, 1978; Chen y col., 1978; Hedman y col., 1982). Los componentes envueltos en el sistema de matriz intercelular son colágenos, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, complejo proteína/polisacáridos, proteínas microfibrilares y otras glicoproteínas no colágenos. Estos componentes han sido extensamente investigados, particularmente, el colágeno el cual constituye más de un tercio del total de la proteína corporal (Ramachandran y Reddi, 1976).

"In vitro" las células del tejido conjuntivo pulmonar sintetizan procolágeno tipo I y III, que son los mayores tipos de colágeno en el pulmón, así como glicosaminoglicanos, fibronectina y elastina (Yamada y Weston, 1974; Hance y col., 1976; Castor y col., 1979).

Los cultivos de células normales adherentes sintetizan y depositan una matriz de tejido conjuntivo, la cual debe mostrar diferencias estructurales dependiendo del fenotipo celular y las condiciones de cultivo (Conrad y col. 1977; Dessau y col., 1978; Alitalo y col., 1980; Hedman y col., 1982).

La transformación fibroblástica maligna generalmente origina un fallo en el depósito de matriz pericelular cuando es un crecimiento "in vitro" (Wartiovaara y col., 1974; Yamada y Olden, 1978).

La matriz pericelular de cultivos fibroblásticos humanos esta compuesta por fibronectina, procolágenos I y III como polipeptidos y ácido hialurónico, heparán, sulfato y condroitin sulfato como glicosaminoglicanos (Hedman y col., 1982).

Durante el desarrollo embrionario, la interacción de las células con la matriz extracelular es importante en la regulación de la conducta celular. Así, moléculas extracelulares, como la fibronectina, promueven la adhesión, expansión y formación de lugares de adhesión especializados en una variedad de células (Duband y col., 1986).

Campbell y col. (1987) ponen de manifiesto la importancia de la matriz extracelular al resaltar el efecto destructivo de la misma por parte de las células durante el proceso inflamatorio, destacando la afección de estas estructuras pulmonares durante procesos crónicos no neoplásicos.

El pulmón posee una gran variedad de componentes de la matriz extracelular que comprenden el esqueleto y los elementos adhesivos de la porción conductora (bronquios de segundo y tercer orden, y bronquiolos), alvéolos y el árbol circulatorio (traquea y bronquios de primer orden). Los componentes de matriz extracelular están envueltos en todos los estados de la biología pulmonar: desarrollo, función normal y estados de enfermedad aguda y crónica. Por ello, células y tejidos del pulmón

interaccionan con la matriz aunque un gran número de receptores de superficie, especialmente integrinas (moléculas de adhesión), juegan un papel importante en la lesión y reparación del pulmón (Davidson, 1990).

Antes de pasar a revisar el papel relevante de estas proteínas de matriz en el proceso de fibrosis pulmonar, es interesante considerar algunos de los aspectos básicos de las mismas, siguiendo el esquema expuesto en los materiales y métodos sobre las proteínas de matriz extracelular.

#### IV.1.- PROTEINAS FIBRILARES DE MATRIZ EXTRACELULAR:

##### COLAGENOS.

##### IV.1.1.- COLAGENOS MAYORES.

Al realizar una profunda revisión bibliográfica en este tema, comprobamos que uno de los mejores artículos al respecto pertenece a Davidson (1990), el cual nos comenta que los colágenos mayores son las proteínas mayoritarias en el pulmón del hombre en condiciones normales. Ellos comprenden el 15 al 20% del peso seco, y juegan un papel vital en la estructura y función del pulmón.

Forman las mallas tridimensionales las cuales están embebidas de células intersticiales y proteínas de matriz extracelular tales como elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos, hialurónico y laminina. El colágeno forma una familia de moléculas consistente, en al menos 13 tipos distintos, cada uno único en sus características físicas y químicas, y con una distribución especial. Los colágenos intersticiales, tipo I, II y III, comprenden el 95% el total. Los tipo I y II son encontrados en el intersticio del pulmón, en las paredes de la porción conductora, vasos sanguíneos y septo alveolar. El colágeno tipo I, es una molécula semirígida con forma de varilla, la cual da fuerza estructural a estos tejidos, mientras que el tipo III es más flexible; su proporción contribuye a las características físicas del pulmón y vías aéreas.

El tipo II es el mayor componente de los cartílagos en la porción conductora.

El papel de estas moléculas es desconocido, pero deben jugar una baza importante en la modulación de las características estructurales de la matriz extracelular en el tejido pulmonar. Estudios realizados utilizando técnicas inmunocitoquímicas han demostrado más precisamente la distribución de colágenos en el intersticio pulmonar. El colágeno tipo III sigue un modelo semejante a una cinta dentro del intersticio y agregados alrededor del punto de entrada hacia el alveolo. También aparece como modelo lineal en asociación con capilares. El tipo I está codistribuido con el tipo III y forma un modelo más irregular el cual, probablemente, se corresponda con los agregados de colágeno observados en microscopia electrónica (Davidson, 1990).

#### IV.1.2.- COLAGENOS MENORES

En las últimas décadas, ha aumentado el número de proteínas de colágeno identificadas, algunas de las cuales se agrupan dentro del término colectivo de colágenos menores, por su escasa abundancia. Muchas de estas, se podrían identificar dentro de la categoría de colágenos no fibrilares, debido al hecho de que las regiones helicoidales de las cadenas constituyentes son interrumpidas, en una o más posiciones, por dominios globulares que otorgan flexibilidad y quizás también sirvan para otros papeles funcionales (Mayne y Burgeson, 1987; Burgeson, 1988).

El mejor conocido hoy día es el colágeno tipo IV, que parece ser constituyente

exclusivo de las membranas basales, localizándose sobre todo bajo el epitelio, así como en la matriz pericelular de células mesenquimatosas tal como las fibras musculares lisas (Davidson, 1990).

Las moléculas de colágeno tipo IV está compuesta de tres diferentes cadenas alfa en varias proporciones. No tiene organización fibrilar paralela; es semejante a una malla entre cuyas redes existen otras glicoproteínas. Este modelo de ensamblaje está basado, en parte, sobre la disposición molecular de las moléculas tipo IV: dos segmentos de triple helice con distinta longitud conectados por una región bisagra y un dominio globular en el carbono terminal (Davidson, 1990).

La relación normal entre el epitelio alveolar, endotelio y la matriz extracelular es obvia en el alveolo pulmonar. Las células epiteliales y endoteliales producen colágeno tipo IV y otros componentes de la membrana basal. En la zona más delgada del septo alveolar las respectivas membranas basales se unen de tal forma que la distancia entre el aire y la sangre puede ser menor de 0,2  $\mu\text{m}$ . En la zona gruesa del septo alveolar las membranas basales del epitelio y endotelio están separadas por un intersticio consistente en colágeno y otras proteínas de matriz, junto con células residentes, primariamente fibroblastos y ocasionalmente macrófagos (Davidson, 1990).

Asimismo, los colágenos menores tipo IV y V están codistribuidos con laminina a lo largo de la membrana basal del alveolo capilar. El tipo V también está presente en el intersticio (Harrison y Laurent, 1991).

#### IV.1.3.- COLAGENOS EN EL PROCESO DE FIBROSIS PULMONAR.

El contenido de colágeno en el tejido normal está finamente regulado y es el resultado de una compleja serie de interacciones entre las células locales. En términos bioquímicos, el colágeno tisular depende de un balance entre la síntesis y degradación. La fibrosis está caracterizada por una ruptura de este mecanismo que dirige la acumulación de colágeno en el intersticio. Además de la falta de conocimiento sobre la patogenia de la fibrosis, el fenómeno ha sido ligado con la alteración en el proceso normal de reparación que sigue o acompaña a la respuesta inflamatoria (Montfort y Pérez-Tamayo, 1978; Pérez-Tamayo, 1978).

Minor (1980) realiza una profunda revisión sobre el papel del colágeno en procesos fibróticos de reparación del tejido conjuntivo. Así confirma que el tipo de colágeno sintetizado cambia con la diferenciación y la edad, así como también en los distintos estados de la respuesta a la reparación de células muertas e inflamación. Algunos estudios sugieren que estos cambios en la actividad sintética deben obedecer a modificaciones en células mesenquimatosas productoras de estos colágenos (fibroblastos y miofibroblastos).

En áreas de fibrosis iniciales el intersticio engrosado contiene más colágeno tipo III que el pulmón normal, mientras que en áreas de fibrosis establecidas predomina el colágeno tipo I (Bateman y col., 1981; Raghu y col., 1985).

Mc Donald y col. (1986) en hombre utilizando anticuerpos monoclonales,

mostraron el aumento del número de fibroblastos intersticiales teñidos para procolágeno tipo I en áreas de fibrosis pulmonar activas.

Shahzeidi y col. (1991) realizan un examen de biopsias pulmonares de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y controles, mediante técnicas de hibridación "in situ", para determinar la expresión del colágeno tipo III. Estos concluyen resaltando que el colágeno tipo III aparece en pulmones normales y fibróticos, observando un marcado aumento en estos últimos, confirmando la hipótesis de que la activación de fibroblastos se dirige al incremento de la producción de colágeno, como parte importante de la patogenia de la fibrosis pulmonar.

Wick y col. (1992) observan mediante análisis inmunohistoquímico de la matriz extracelular que en algunos desordenes del colágeno, como la hipersensibilidad a *Microspora faeni* ("pulmón del granjero"), aparece un aumento intersticial en el procolágeno y colágeno tipo I, e incluso más marcado el incremento en el procolágeno tipo III y fibronectina. Este hecho es característico de una fibrosis crónica y activa pulmonar en base a una enfermedad inmune.

## **IV.2.- PROTEINAS NO FIBRILARES DE MATRIZ EXTRACELULAR.**

Estas moléculas, todas de naturaleza glicoproteica, están envueltas en la interacción células-matriz; de hecho actúan como ligandos para los receptores de la superficie celular, así como también poseen lugares de unión para varios componentes de la matriz extracelular. Por ello, parecen ser cruciales en los procesos de anclaje y separación, migración celular, morfogénesis y organización de la matriz.

### **IV.2.1.- LAMININA.**

Se considera como un factor de ataque para las células epiteliales y endoteliales. Es una glicoproteína trimérica de gran tamaño, consistente en tres cadenas distintas genéticamente: A, B1 y B2. La cadena A de laminina tiene cerca de 400 kDa de tamaño, mientras que las dos cadenas B son algo más pequeñas, alrededor de 280 kDa. Las moléculas de laminina consisten en una combinación de estas tres cadenas, las cuales se ensamblan formando una estructura en cruz, con puntos de unión para la superficie celular, para el colágeno tipo IV y el proteoglicano heparán sulfato. La laminina es un componente de todas las membranas basales (Grant y Leblond, 1988) y presumiblemente actúa como puente entre las membranas plasmática de las células

epiteliales y la matriz pericelular (lámina basal).

En la membrana basal de la traquea y bronquios, existe una lámina fibroreticular como componente adicional de la membrana basal (Sakai y col., 1986).

Algunos autores como Sarkr y col. (1987) han determinado que la membrana basal del tracto respiratorio del hombre, contiene laminina y colágeno tipo IV.

Así se ha observado que la membrana basal de los alveolos pulmonares contienen capas extras, las cuales aparecen como una estructura tridimensional compuesta de una lámina densa entre dos láminas lúcidas (externa e interna) (Tisdale y col., 1988).

Bosman y col. (1991) han observado con microscopia electrónica la presencia de un depósito irregular y discontinuo de material de membrana basal en la superficie de los miofibroblastos.

Yousem y col. (1992) corroboran los trabajos de Hara y col. (1989) en fibrosis pulmonar del hombre, al describir la fragmentación de la membrana basal y la deposición de colágeno tipo IV y laminina por células mesenquimatosas de vasos y porción conductora pulmonar como consecuencia de la fibrosis producida durante el proceso de rechazo de aloinjertos pulmonares humanos.

#### IV.2.2.- FIBRONECTINA

Es una proteína grande, externa, y con diferentes denominaciones, así como

proteína sensible a la transformación (LETs), fibronectina (Chen y col., 1978), proteína de superficie celular (Yamada y Weston, 1974), galactoproteína A (Gahmberg y Hakamori, 1973) o proteína Z (Wickus y col., 1974).

Pertenece a las glicoproteínas mayores de superficie celular presente en la estructura de la matriz de fibroblastos (Wartiovaara y col., 1974), miofibroblastos, algunas células epiteliales (Chen y col., 1977), fibras musculares lisas (Chen, 1977) y células endoteliales (Jaffe y Mosher, 1978).

Existe una pérdida de esta proteína relacionada con la transformación oncogénica de las células, así como un aumento de la tumorigenicidad en una serie de líneas celulares transformadas de rata por un adenovirus (Chen y col., 1978).

Estudios con inmunofluorescencia frente a fibronectina y colágeno tipo I, en cultivos celulares (células mesenquimatosas), ponen de manifiesto en fases tempranas la liberación por parte de las células de fibronectina de forma fibrilar, y no colágeno, sobre la membranas celulares estableciendo el contacto célula-célula. Sin embargo, la expresión de colágeno tiene modelos distintos, comienza en forma de mancha (difuso), y luego adopta el modelo fibrilar. Estas investigaciones determinan, que la fibronectina sirve como columna inicial para la fibrinogénesis de otros sistemas de matriz, tales como el colágeno (Chen y col., 1978).

La proteína de adhesión mejor estudiada, es un dímero (440.000 Pm) de una glicoproteína grande con lugares de unión para muchos componentes incluido colágeno, fibrinógeno, heparan sulfato (heparina), paredes estreptococicas y sus receptores de

superficie celular (Hynes y Yamada, 1982; Editorial, 1989).

La molécula proteica esta dividida en un número funcional y estructural de dominios. Un solo gen de fibronectina codifica múltiples formas de proteínas a través de un mecanismo alternativo de unión (Hynes, 1985). El mismo mecanismo es responsable de diferencias entre las formas celular y plasmática de la glicoproteína, la cual ha sido originalmente identificada como molécula circulante, denominándose como "globulina insoluble fría" (Saba, 1989).

La fibronectina es crítica en el ataque medido por células del colágeno fibrilar; sin embargo, también parece estar envuelta en la opsonización para la desnaturalización del colágeno. La fibronectina puede tambien unirse al dominio del colágeno de complemento, C1q (Rennard y col., 1983).

La primera secuencia de análisis y el estudio del mapeo del péptido se dirige a la definición de la zona de unión celular ("celular binding") de la molécula de fibronectina, la cual es sorprendentemente pequeña, consistente en una secuencia de arg-gly-asp-ser (RGDS) (Ruoslahti y Pierschbacher, 1987).

Los receptores para fibronectina son miembros de una familia creciente de moléculas de adhesión denominadas integrinas (Hynes, 1987; Ruoslahti, 1988). Estas se definen como complejos lugares de unión transmembrana, los cuales interaccionan con el citoesqueleto sobre su cara citoplasmática. Esta disposición estructural probablemente forma la base para el acoplamiento del citoesqueleto con la matriz extracelular. Además se ha podido comprobar que varios factores de ataque pueden

utilizar el mismo tipo de receptor de superficie celular (Burrige y Fath, 1989).

La fibronectina y los procolágenos están íntimamente codistribuidos en una red fibrilar (Bornstein y Ash, 1977; Vaheri y col., 1978) pero la relación de los glicosaminoglicanos a la red de fibronectina-procolágeno no ha sido definida.

La adicción de fibronectina con puentes de unión fotoactivos, a cultivos de fibroblastos de hamster, produjeron un entrecruzamiento de la glicoproteína a proteoglicanos sulfatados (Perkins y col., 1979).

La fibronectina interacciona con macromoléculas polianiónicas tales como heparina, heparan sulfato (Stathakis y Mosessan, 1977; Ruoslahti y Enguall, 1980), ácido hialurónico (Yamada y col., 1980) o ADN (Zardi y col., 1979).

Las uniones de glicosaminoglicanos sulfatados a la fibronectina deberían por tanto ser parcialmente responsables del anclaje de los proteoglicanos a la matriz fibrilar. Tal mecanismo es soportado por la similitud de la composición de glicosaminoglicanos en matriz aislada y en fibronectina inmunoprecipitada. Debería considerarse que la fibronectina de la matriz fibrilar está unida al colágeno, y que la unión de la fibronectina al colágeno induce un cambio conformacional en la molécula de fibronectina; una forma que tendría más afinidad por glicosaminoglicanos sulfatados (Hedman y col., 1982).

Los glicosaminoglicanos sulfatados muestran un rango de enlace entre colágeno y fibronectina (Johansson y Höök, 1980) estabilizando el complejo fibronectina/colágeno (Ruoslahti y Enguall, 1980) y /e inducen la precipitación de

fibronectina y colágeno y promoviendo el ensamblaje filamentosos de esta proteína (Jilek y Hörmann, 1979).

Los proteoglicanos están implicados en un número importante de fenómenos celulares. Están presentes sobre la superficie celular, y se piensa que están envueltos en la adhesión de células normales y transformadas. Ellos deben también funcionar como mediadores de superficie celular específicos, interaccionando discretamente con la diferenciación celular y movimiento durante el desarrollo (Hayman y col., 1982).

"In vivo" la interacción de la fibronectina con la superficie celular es un requisito para el movimiento celular; así el bloqueo de los dominios celulares de unión a la fibronectina inhibe la migración de estas células (Rovasio y col., 1983; Boucant y col., 1984a y b; Duband y col., 1986).

Hsieh y Chen (1983) realizan estudios *in vitro* con fibroblastos de ratón (Py3T3) determinando que la fibronectina de la matriz puede bipolarizar todas las células fibroblásticas hacia una morfología fusiforme y a un alineamiento paralelo, semejante al observado en secciones histológicas del tejido conjuntivo.

Es importante considerar el papel de esta glicoproteína en células transformadas, ya que la mayoría de las células malignas fallan en el depósito de la matriz extracelular "in vitro", y muchas parecen expresar este defecto también "in vivo" (Ruoslahti, 1988).

Bosman y col. (1991) determinaron que la fibronectina es una molécula asociada a la membrana basal, más que un verdadero componente de ella.

La fibronectina es un componente de la matriz extracelular, que aumenta su

cantidad durante enfermedades pulmonares fibróticas. Los macrófagos alveolares son una potencial fuente de esta molécula. Sinkin y col. (1992) utilizaron hibridación "in situ", demostrando que los macrófagos alveolares de conejos expuestos de forma súbita al 100% de oxígeno durante 64 horas, tenían aumentado 20 veces los niveles de ARNm de fibronectina en relación a los animales control. Además, las células obtenidas por lavados broncoalveolares expresaban diez veces más fibronectina, en relación a las células de animales controles.

Además algunos autores (Driscoll y col., 1992) comprueban que la fibronectina es un buen indicador de fibrosis. Este hecho es determinado por la liberación en fases iniciales de fibronectina por los macrófagos alveolares, determinando el desarrollo de una enfermedad pulmonar intersticial con fibrosis pulmonar.

La fibronectina interacciona con numerosos tipos celulares incluyendo células mesenquimatosas e inflamatorias. "In vitro" la fibronectina sirve como un sustrato adhesivo y promotor de la proliferación celular y citodiferenciación. Durante el desarrollo, matrices ricas en fibronectina son depositadas en localizaciones específicas y regulan la migración direccional de las células embrionarias. En particular, la matriz de fibronectina parece ser de importancia crítica en el desarrollo normal cardiopulmonar. Recientes investigaciones han documentado el aumento de expresión de la fibronectina en numerosas lesiones pulmonares como el síndrome respiratorio del distress, neumonía organizada, bronquiolitis obliterante y fibrosis pulmonar idiopática. Además, la fibronectina puede interactuar con un gran número de microorganismos

y por tanto también es potencialmente importante en la adhesión microbiana del epitelio de la porción conductora y la consiguiente infección del sistema respiratorio (Limper y Roman, 1992).

En la actualidad el estudio de esta proteína se centra en el campo de la Oncología, realizando numerosos estudios "in vitro" con células neoplásicas sobre la expresión de esta glicoproteína de superficie y valorando su capacidad tumorogénica; asimismo, "in vivo" la falta de expresión de la fibronectina es muy indicativa de la malignidad de las células, así como de su capacidad de migración y metástasis (Ruoslahti, 1988; Demure y col., 1992; Ohori y col., 1992; Erdel y col., 1992).

## **V.- FACTORES DE CRECIMIENTO**

Son polipéptidos que interaccionan con receptores específicos celulares, produciendo diferentes respuestas biológicas, que incluyen, la modulación de la diferenciación fenotípica, cambios en la motilidad celular y estructura del citoesqueleto, y alteración en el rango de proliferación. El fenómeno biológico de promover el crecimiento no es exclusivo de los factores de crecimiento (FC). Hormonas, neuropeptidos y nutrientes pueden también inducir la proliferación celular (Pardee, 1989; Wall, 1991).

Los FC se diferencian de las clásicas hormonas en varios aspectos. Son producidos por más de un tipo celular; tienen un amplio rango de acciones biológicas, algunas de las cuales se solapan, y en general, actúan a corta distancia. La mayoría de las células de los mamíferos secretan un gran número de FC y responden a una variedad de estas moléculas de una forma autocrina o paracrina (Pusztai y col., 1993).

La acción local de estos FC es coordinar la organización de los tejidos. Así, en fases como la reparación de inflamación, hay una compleja red de comunicación de señales que coordinan la reparación de zonas de matriz extracelular, secundaria a la destrucción por la respuesta inflamatoria. Estas señales se establecen entre las células

inmunes efectoras (linfocitos T y macrófagos) y las poblaciones celulares locales (fibroblastos) (Antoniades y col., 1991).

Los efectos locales son asegurados por la corta vida media de estas moléculas en el espacio extracelular, y por su asociación con la matriz extracelular y con varias proteínas de unión a los FC (Rouslahti y Yamaguchi, 1991; Puztai y col., 1993).

En la circulación sanguínea han sido detectados diferentes FC entre los que se incluyen: factor de crecimiento insulínico-like (IGF-I, -II) (Cullen y col., 1991), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Ross y col., 1990), factor de crecimiento epidermal (EGF) (Oka y Orth, 1983), y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Massague, 1990). La mayoría de estos elementos presentes en el suero forman complejos con proteínas, las cuales parcialmente los inactivan. El sistema efector y el papel fisiológico de los FC circulantes, con la excepción de IGF-I el cual media los efectos de la hormona de crecimiento, no están completamente estudiados (Puztai y col., 1993).

Algunos FC recientemente identificados no se incluyen dentro de las anteriores familias. Así, el FC Hepatocítico (HGF) está estructuralmente relacionado con la familia de proteasas séricas, pero le falta la actividad proteolítica. El factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PDEC GF) es un polipéptido único no relacionado con secuencias conocidas. Algunas de las caracterizaciones recientes de los FC, como endotelina-1 y gro, representan nuevos descubrimientos en las actividades de péptidos clasificados formalmente dentro de distintas familias con

actividades primarias sobre la fibra muscular lisa vascular y las células inflamatorias respectivamente (Pusztai y col., 1993).

Los FC son grupos de familias diferentes con secuencia homóloga y similitudes estructurales de los péptidos. Cada familia debe surgir de distintos genes ancestrales por duplicación y evolución divergente (Pusztai y col., 1993).

Considerando el elevado número de familias de factores de crecimiento, así como el solapamiento en las funciones de los mismos, nuestro trabajo se centrará en dos familias concretas:

\* **Familia de Factores de crecimiento derivados de plaquetas (FCDP)**, constituida por dos polipeptidos relacionados, con cadenas alfa y beta, las cuales forman homo (AA, BB) y hetero (AB) dímeros. Estas formas isomorfas se unen por diferentes afinidades a dos receptores PDGF distintos y, por tanto, debe tener diferentes actividades biológicas.

\* **Familia de factores de crecimiento transformante beta (FCT  $\beta$ )**, que incluye un grupo de proteínas homodímeros homólogos íntimos. Estos son secretados en formas inactivas y requieren un medio ácido, o división por proteinasas séricas, para su activación (Pusztai y col., 1993).

Ambos factores de crecimiento son normalmente conocidos por las siglas inglesas, por ello nos referimos a ellos como **PDGF** (platelet derivated growth factor) y **TGF  $\beta$**  (transforming growth factor  $\beta$ ).

El aislamiento y clonaje molecular de numerosos FC durante los últimos años,

han dado un nuevo empuje a las interacciones celulares en general y en particular al proceso de malignidad tumoral (Pusztai y col., 1993).

## V.1.- FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS.

### V.1.1 - ESTRUCTURA Y LOCALIZACION

El PDGF es un péptido plaquetario, componente de los gránulos alfa, quimiotáctico y mitógeno para los fibroblastos y fibras musculares lisas de los vasos. La expresión de proteína PDGF-like es un rasgo común de muchas células transformadas (Kaplan y col., 1979a y b).

La forma dimérica del PDGF es necesaria para la expresión de su actividad biológica. PDGF humano (PDGFh) es un heterodímero de dos cadenas polipeptídicas, PDGF-1 (o A) y PDGF-2 (o B) (Antoniades y Hunkapiller, 1983).

Las células de mamíferos expresan los dos genes 1 y 2, y tienen la posibilidad de sintetizar y procesar estas cadenas polipeptídicas hacia su actividad biológica homodimérica (Robbins y col., 1983; Owen y col., 1984; Nister y col., 1988).

Así hay 3 isoformas activas de PDGF: el heterodímero PDGFh y los homodímeros PDGF-1 y PDGF-2. Las acciones biológicas de las formas isoformas de PDGF en las células diana son mediadas a través de las uniones a receptores celulares de superficie.

PDGFh es una proteína mitogénica que consiste en dos cadenas polipeptídicas homólogas (PDGF-1 y 2), ligada por puentes disulfuro. La cadena PDGF-2 es

codificada por un gen diferente localizado en el cromosoma 7 (Antoniades y col., 1991).

#### V.1.2.- FUNCION

Normalmente al PDGF se le ha aplicado un papel muy genérico, interviniendo en la reparación de heridas. Según Ross y col. (1974) la exposición "in vitro" de células musculares lisas aórticas a PDGF, debe estimular la proliferación de estas células en el proceso de la aterogénesis. "In vivo", se comprueba el efecto final de la adhesión plaquetaria y la degranulación sobre las células musculares lisas aórticas; pero no está claro que las fibras musculares lisas aórticas proliferen como respuesta al PDGF.

Asimismo, "in vivo" circula en la sangre almacenado en los granulos alfa de las plaquetas. Estas células tienen afinidad por zonas lesionadas, agregándose y liberando sus contenidos, incluyendo PDGF. De esta manera, las plaquetas selectivamente liberan PDGFh en el lugar de la lesión contribuyendo a la regeneración del tejido (Antoniades y Owden, 1984; Antoniades y col., 1987; Ross y col., 1986).

Las células endoteliales vasculares (Di Corleto y Bowen-Pope, 1983; Barret y col., 1984; Sitaras y col., 1987) y macrófagos activados (Shimokado y col., 1985; Martinet y col., 1986; Pantazis y col., 1986) presentan la expresión de dos genes PDGF y sintetizan PDGF-like mitogénico. Así el PDGF derivado de plaquetas, células

endoteliales y macrófagos "in vivo", parece jugar un papel importante en el tejido de reparación y mantenimiento.

Los macrófagos activados secretan PDGF (Shimokado y col., 1985; Martinet y col., 1986; Mornex y col., 1986), el cual parece ser controlada en parte, por la inducción de su ARNm (Assoian y col., 1987).

En contraste a estas funciones fisiológicas, la expresión inapropiada de PDGF ha sido ligada a varias alteraciones proliferativas del hombre, como se ha observado en algunas líneas celulares derivadas de tumores malignos (Graves y col., 1984; Pantazis y col., 1985; Betsholtz y col., 1985; Nister y col., 1988).

Mendoza y col. (1990) realizan un estudio inmunocitoquímico sobre la expresión del PDGF en fibras musculares lisas del miometrio durante la gestación en mujeres, demostrando el papel de este factor en un proceso fisiológicamente reversible como es la adaptación del útero al embarazo. La expresión del PDGF en las fibras musculares lisas aumenta como consecuencia del incremento de la expresión del ARNm del PDGF-AA pero no del PDGF-BB, el cual no fue visto en úteros normales o grávidos. La cantidad de PDGF-AA aumentó durante la gestación y disminuyó durante el puerperio.

La función principal del PDGF es inducir la mitosis en células diana quiescentes. Además, ha demostrado ser un potente quimiotáctico para el cultivo de fibras musculares lisas arteriales y fibroblastos. Otras funciones incluyen su probabilidad de promover efectos pleiotrópicos sobre el metabolismo celular, tal como

proteínas, lípidos y síntesis de prostaglandinas, y modular las uniones a los receptores de varios componentes biológicos, incluyendo lipoproteínas de baja densidad (LDL) y serotonina. La síntesis de componentes mayores de la matriz de tejido conjuntivo, tal como el colágeno, glicosaminoglicanos y proteoglicanos es estimulado por PDGF. Otros procesos asociados con la remodelación de tejidos, tal y como endocitosis y resorción de hueso, también han sido relacionados con PDGF (Ross y col., 1986; Antoniades y col., 1987, 1991).

Osornio-Vargas y col., 1991, determinan que el macrófago alveolar libera PDGF y ello es responsable en parte de la proliferación y del acúmulo de células intersticiales observada en el pulmón después de la inhalación de partículas inorgánicas.

Antoniades y col. (1991) y Ramael y col. (1992) señalan que el PDGF es el mayor mitógeno también para los células gliales y osteoblastos.

Fabisiak y col. (1992) consideran al PDGF, como un decisivo mediador del crecimiento y fenotipo fibroblástico en el pulmón. Las fuentes celulares del PDGF dentro del pulmón están mal definidas. La posibilidad de los fibroblastos pulmonares de producir PDGF "in vitro" fue detectado, mediante el empleo de "northern" y "western blot". Así, fibroblastos derivados de pulmón adulto y fetal de rata revelaron expresión a la cadena proteica A del PDGF. El gen del PDGF A fue más baja que los límites de detección en dos líneas de fibroblastos de pulmón humano examinados de la misma manera. La transcripción de PDGF B, no fue detectado en alguna de las líneas de fibroblastos pulmonares examinadas. El medio de cultivo de estas mismas

líneas de fibroblastos pulmonares fue recogido y testados por su capacidad para promover el crecimiento, utilizando como células diana, fibroblastos pulmonares de feto humano. Ambos fibroblastos pulmonares de adulto y feto, comenzaron a producir un potente y eficaz estímulo para el crecimiento celular. La actividad promotora del crecimiento en el medio de cultivo derivado de fibroblastos de rata, funciona como factor competente y fue parcialmente inhibido por anticuerpos anti-PDGF. Así los fibroblastos pulmonares de rata "in vitro" producen potentes FC los cuales al menos uno parece ser PDGF-AA. Existen diferencias en la expresión del PDGF-AA entre los fibroblastos pulmonares de feto y adulto humano. Los FC producidos por los fibroblastos pueden jugar un importante papel en la reparación del pulmón a través de la producción de PDGF-AA "in vivo".

### V.1.3.- FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS EN EL PROCESO DE FIBROSIS PULMONAR

PDGF es un mitógeno fibroblástico que estimula la proliferación celular y la síntesis de colágeno (Stavenow y col., 1981; Deul y Huang, 1984 citados por Fine y Goldstein, 1987).

Diferentes dominios sobre la molécula del PDGF parecen activar selectivamente la proliferación celular o la quimiotaxis (Senior y col., 1984).

Estos autores consideran que hay problemas técnicos y conclusiones erróneas en actividades de FC, ya que sí el PDGF inducía la formación de colágeno, a través de un mecanismo que es independiente de la proliferación celular, no es cierto en este momento, puesto que el PDGF y TGF  $\beta$ , son derivados de plaquetas. TGF  $\beta$  es efectivo a concentraciones bajas, por lo que muchos de los preparados de PDGF utilizados en experimentos de colágeno, fueron contaminados con pequeñas cantidades de TGF  $\beta$  (Igotz y Massagué, 1986).

PDGF y fibronectina han sido considerados como "factores competitivos" e, insulina y factores de crecimiento derivados de los macrófagos alveolares, como "factores de progresión" para los fibroblastos pulmonares del hombre (Bitterman y col., 1983; 1986).

Estudios en animales con fibrosis pulmonar experimental (Selman y col., 1985; Selman y col., 1989) demuestran la presencia de proteínas del PDGF-like en las células alveolares mononucleares de pulmones fibróticos.

Una de las más importantes contribuciones para comprender porqué el número de células mesenquimatosas esta aumentado en la fibrosis pulmonar, ha sido el reconociendo en macrófagos alveolares de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) espontánea de FC para fibroblastos. Estos incluyen PDGF que es un potente agente quimiotáctico y un "factor de competencia" para el crecimiento fibroblástico (Martinet y col., 1987)

Raghu y col. (1988) observó que cultivos de células semejantes a fibroblastos

de persona adulta normal y pulmón de hombre fibrótico experimentan replicación celular sólo en presencia de PDGF.

PDGF-like es sintetizado por macrófagos alveolares activados humanos (Shimokado y col., 1985), y los macrofagos alveolares son las células inflamatorias predominantes en la alveolitis (Crystal y col., 1984) y en la reparación de heridas (Mornex y col., 1986).

Por tanto el papel del PDGF debe ser importante en la regulación del crecimiento de células fibroblásticas diploides del hombre y en la patogenia de la fibrosis pulmonar humana (Raghu y Kavanagh, 1991).

Los sucesos incluidos en el desarrollo de la fibrosis pulmonar en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF) no son plenamente comprendidos. Recientes hallazgos "in vivo", demuestran una base molecular ligada a la fibrosis y a la producción de factores de crecimiento mitogénicos en los pulmones de estos pacientes. Estos estudios moleculares han demostrado por primera vez la fuerte expresión de c-sis/PDGF y proteína PDGF-like por células epiteliales cúbicas en biopsias pulmonares de pacientes con alteraciones pulmonares intersticiales. La importancia de estos hallazgos es la fuerte expresión de proteínas PDGF-like por células epiteliales en pulmones humanos con alteración proliferativa pulmonar. Esta fue la primera demostración de la expresión de PDGF por células epiteliales no malignas. Asimismo, las células mononucleares alveolares presentaron positividad frente a la proteína PDGF (Avila y col., 1987; Antonides y col., 1991).

Mornex y col. (1986), Martínet y col. (1987) y Antoniades y col. (1991) reportaron la expresión espontánea del gen c-sis y la liberación de PDGF mitógeno por macrófagos alveolares de hombre, no activados, obtenidos por lavado broncoalveolar de individuos con fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Los macrófagos alveolares obtenidos con FPI liberan pequeñas cantidades de PDGF mitógeno. El control de las muestras pulmonares de individuos sin fibrosis pulmonar idiopática no expresan c-sis ARNm o proteína PDGF-like. Estos hallazgos "in vivo" prueban una relación entre PDGF y la fibrosis pulmonar.

Estos estudios "in vivo", determinaron que las proteínas estaban localizadas primariamente en las células mononucleares alveolares y en las células epiteliales cúbicas de individuos con alta proliferación pulmonar. La especificidad de la reacción inmunofluorescente fue testada en estudios paralelos usando suero preimmune, o competición con exceso de PDGF. Las muestras control fueron realizadas utilizando muestras de individuos sin alteraciones proliferativas pulmonares, los cuales no expresaban proteínas FCDP-like (Antoniades y col., 1991).

El significado de estos hallazgos determinaron el inicio de numeroso estudios "in vivo" (Antoniades y col. 1991). En estos trabajos, se investiga la expresión c-sis ARNm y proteínas del PDGF-like en biopsias pulmonares humanas con FPI y así como de controles por medio de técnicas de hibridación "in situ" e inmunocitoquímicas usando un antisuero específico PDGF. Estas investigaciones corroboraron la presencia de PDGF en células epiteliales de individuos con fibrosis pulmonar.

Thornton y col. (1992), realizaron un estudio sobre la influencia de los factores de crecimiento de los fibroblastos en tejido conjuntivo asociado a enfermedades pulmonares intersticiales. La fibroproliferación es una parte importante de esta respuesta fibrótica, y es mediada a través de FC tales como PDGF, ILGF y factor de necrosis tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ). Aunque hay evidencias que implican a estas citoquinas en alteraciones fibróticas, la fuerte evidencia "in vivo" es casi inexistente. Estos autores, para comprobar el papel que juegan los FC en las alteraciones inflamatorias del pulmón asociadas con enfermedades del tejido conjuntivo, han obtenido células alveolares mononucleares de individuos, mediante lavados broncoalveolares y han realizado posteriormente pruebas para la liberación espontánea de FC fibroblástico. Comprobaron que la actividad de los FC fue más alta al principio que en fases finales. Por medio de anticuerpos determinaron la actividad de los FC comprobando que en pacientes normales era debida al TNF  $\alpha$ , mientras que los pacientes con enfermedad pulmonar intersticial secretaron grandes cantidades de PDGF y fibronectina, además de TNF  $\beta$ . Aproximadamente 40-50% del total liberado de la actividad de los FC corresponde al PDGF y el 100% a la combinación de PDGF, FNT alfa y la fibronectina.

Chen y col., (1992) manifiestan que las células mesenquimatosas presentan una gran actividad del estado proliferativo despues de una lesión aguda pulmonar por medio de PDGF. Por tanto, la respuesta fibroproliferativa continua provoca una extensa fibrosis intraalveolar, incluso cuando el proceso inflamatorio ha terminado.

Powel y col. (1992) comparan la expresión del PDGF en ratas que sufren una hiperoxia (respiran 87% de oxígeno) en relación a los niveles de detección en pulmón normal. El ARNm de la cadena A del PDGF aumenta a las 12-18 horas después de la exposición, volviendo posteriormente a situaciones normales. En el caso del PDGF-B responde mayoritariamente a la hiperoxia aumentando diez veces el día 3 de la experiencia. Este aumento, precede a una respuesta proliferativa de fibroblastos de la adventicia microvascular, precursores de las fibras musculares lisas y células epiteliales, la cual se origina el día 4.

## V.2.- FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA

### V.2.1.- ESTRUCTURA Y LOCALIZACION

TGF  $\beta$  es uno de los primeros péptidos reguladores del crecimiento (Holley, 1980), que ha sido purificado de forma homogénea, determinándose tanto su composición como secuencia aminoacídica (Assoian y col., 1983; Frolik y col., 1983; Roberts y col., 1983a).

Dos formas distintas del TGF han sido purificadas:

\* El tipo alfa: son péptidos de cadena simple de 5.700 daltons con 3 puentes disulfuro en posiciones homólogas a las del factor de crecimiento epidermal (EGF), con el cual, tienen una secuencia homóloga (Roberts y col., 1985).

TGF  $\alpha$  y EGF, se unen al receptor EGF y tienen acciones biológicas indistintas "in vitro". Así EGF pertenece a la familia TGF  $\alpha$  (Roberts y col., 1983a; Massagé, 1983 citado por Roberts y col., 1985).

\* El tipo beta: tiene una secuencia primaria diferente y consiste en dos cadenas peptídicas, aparentemente iguales, cada una de 12.500 daltons, cruzadas por puentes disulfuro (Assoian y col., 1983; Frolik y col., 1983; Roberts y col., 1983a). El TGF  $\beta$  se une a un único receptor de superficie celular distinto del receptor EGF (Frolik y

col., 1984; Tucker y col., 1984).

Este factor de crecimiento esta distribuido en muchas células normales y tumorales (Roberts y col., 1983b). Ha sido purificado de riñón bovino (Roberts y col., 1983a), placenta humana (Frolik y col., 1983) y plaquetas humanas (Assoian y col., 1983).

La concentración del TGF  $\beta$  en las plaquetas es 100 veces superior a la existente en otras células ó tejidos. Este es liberado de las plaquetas durante la degranulación inducida por la trombina. Esto sugiere que TGF  $\beta$  y el PDGF estan en el interior de los gránulos alfa (Kaplan y col., 1979 a y b; Assoian y col. 1983).

TGF  $\beta$  1 y 2 se unen a tres tipos distintos de receptores de alta afinidad (Massagué y Like, 1985). Los tres tipos de receptores del TGF  $\beta$  coexisten en la mayoría de los tipos celulares y tejidos examinados.

Hay dos formas homodiméricas del TGF  $\beta$ : TGF  $\beta$ 1 y 2, y estan estructural y biológicamente relacionadas, pero exhiben sólo el 70% de la identidad en la secuencia aminoacídica y muestran diferencias adicionales en los dominios del carboxilo terminal (Cheifetz y col. 1987 ).

Las plaquetas porcinas contienen TGF  $\beta$  1 y 2, así como el heterodímero TGF  $\beta$ 1-2. El FCT beta 1 ha sido sólo identificado en plaquetas humanas. La caracterización inicial del TGF  $\beta$  está basada sobre los efectos de proliferación celular (Ignatz y col., 1987).

La familia TGF  $\beta$  pertenece a la más extensa superfamilia de moléculas

peptídicas, que incluye factores tan importantes como la sustancia inhibidora Mülleriana, factor morfogénico del hueso, activinas e inhibinas (Pusztai y col., 1993).

#### V.2.2.- FUNCION

El factor de crecimiento y transformación (TGF) ha sido definido funcionalmente como grupo de péptidos que inducen la reversibilidad de células neoplásicas a expresar su fenotipo transformado; como consecuencia de la pérdida de inhibición dependiente del ritmo de crecimiento, e independiente del anclaje (De Larco y Todaro, 1978 citados por Roberts y col., 1985; Roberts y col., 1983a y b).

La función principal del TGF  $\beta$  es la participación en procesos de reparación de lesiones, estimulando la proliferación celular, síntesis proteica y producción de colágeno en un sistema vivo (Sporn y col., 1983).

Los estudios iniciales se realizaron en dos líneas celulares de fibroblastos no tumorales, para definir la regulación bifuncional del crecimiento celular del TGF  $\beta$ . Estas son células de riñón normal de rata (NRK) que requieren TGF  $\beta$  y  $\alpha$  o EGF para formar colonias en agar blando (Anzano y col., 1982; Anzano y col., 1983), así como en células de embrión de ratón (AKR-2B) que requieren sólo TGF  $\beta$  para crecer bajo condiciones de ensayo independientemente del anclaje (Moses y col., 1984 citado por Roberts y col., 1985; Tucker y col., 1983).

El TGF  $\beta$  al estimular el crecimiento independientemente del anclaje, no resulta

mitógeno para las líneas celulares experimentales que crecen bajo condiciones dependientes del anclaje (Assoian y col., 1983; Roberts y col., 1983; Tucker y col., 1984).

Holley y col. (1980), Tucker y col. (1984) y Moses y col. (1984) purificaron TGF  $\beta$  y un inhibidor del crecimiento en un medio de células de riñón de mono verde Africano (BSC-1), determinando que ambas sustancias son idénticas.

Roberts y col. (1985) utilizan por un lado fibroblastos 3T3 muc-transfected Fischer de rata, donde el TGF  $\beta$  puede funcionar como inhibidor o estimulante del crecimiento independiente del anclaje y dependiendo del tipo de factor de crecimiento que opera en la célula junto a él. Además muestra la inhibición del TGF  $\beta$  sobre el crecimiento independiente del anclaje de muchas líneas celulares tumorales. Asimismo, puede actuar de forma sinérgica o antagónica con otros factores de crecimiento tales como EGF, PDGF u otros factores presentes.

La respuesta bifuncional de las células al TGF  $\beta$  depende de células tumorales, células fibroblásticas y epiteliales (Roberts y col., 1985)

A mediados de los años ochenta Roberst y col. (1985), recogen la hipótesis autocrina de Sporn y Todaro (1980), según la cual la transformación maligna debía resultar de la expresión positiva inapropiada a factores de crecimiento. Así los factores de crecimiento peptídicos específicos son producidos por las células autotransformadas las cuales tienen sus propios receptores funcionales. Numerosos han sido los estudios que evidencian esta hipótesis (Doolittle y col., 1983; Waterfield y col., 1983),

particularmente con el hallazgo de oncogenes que codifican factores de crecimiento o sus receptores.

Esta hipótesis autocrina se ha extendido a factores de crecimiento negativo como el TGF  $\beta$ . El fallo en la expresión autocrina de la actividad fisiológica del TGF  $\beta$  originó un crecimiento incontrolado de ciertas células que requieren este péptido como sustancia que regula el crecimiento normal (Roberts y col., 1985).

TGFs de varias fuentes permiten el crecimiento independiente del anclaje de fibroblastos no transformados (Sporn y col., 1986) y promueven el crecimiento monocapa bajo determinadas condiciones (Shiphey y col., 1985). Por otro lado, ellos pueden inhibir el crecimiento de ciertos tumores y células normales (Tucker y col., 1984; Roberts y col., 1985).

TGF  $\beta$  inhibe la adipogénesis (Igotz y Massague, 1985 citados por Fine y Goldstein 1987) y miogénesis (Massagué y col., 1986) y promueven la condrogénesis (Rosen y col., 1986 citados por Igotz y col., 1987) y la diferenciación de líneas celulares epiteliales (Masui y col., 1986). Los efectos del TGF  $\beta$  sobre la expresión de fenotipos específicos suceden frecuentemente en ausencia de cambios en el rango de proliferación celular.

El papel paracrino de los macrófagos durante la reparación de una herida "in vivo", puede ser demostrada en estudios donde se comprueba que la fibrosis se suprime cuando la infiltración monocítica es bloqueada. Por esta razón algunos autores consideran a los macrófagos como el segundo tipo de fuente importante de factores de

crecimiento durante la reparación "in vivo". Estas células aparecen "a priori" en la curación de heridas produciendo como resultado una respuesta fibrótica (Ross y col., 1986).

El mecanismo de control responsable de la inducción de la secreción del TGF  $\beta$  durante la activación de monocitos parece no actuar a nivel del ARN, ya que los niveles del ARNm para el TGF  $\beta$  son similares en los monocitos estimulados ó no (Assoian y col., 1986, 1987).

Así la secreción de este factor de crecimiento es semejante a la observada para la proteína del PDGF producida por estas células (Shimokado y col., 1985; Martínet y col., 1986; Mornex y col., 1986), además el mecanismo de control de la secreción del TGF  $\beta$  y PDGF durante la activación del monocito es diferente.

Asimismo, las moléculas efectoras derivadas de linfocitos T estimulan la síntesis de colágeno en cultivos fibroblásticos sin aumentar el contenido de ADN; la producción del TGF  $\beta$  es también mediada por linfocitos T (Postlewaite y col., 1984; Kehrl y col., 1986).

Estudios "in vitro" sobre cultivo de fibras musculares lisas de aorta bovina demuestran que el TGF  $\beta$  produce inhibición del crecimiento cuando las células son cultivadas en una monocapa y actúan de forma sinérgica con EGF y PDGF, estimulando el crecimiento cuando las células son cultivadas en agar blando. Estos experimentos sugieren que la liberación del TGF  $\beta$  durante la degranulación plaquetaria debe ser un elemento importante en la regulación de la división de las fibras

musculares lisas (Assoian y Sporn, 1986).

Fine y Goldstein (1987) examinaron los efectos del TGF  $\beta$  sobre la producción y proliferación de cultivos fibroblásticos de pulmón en feto humano. Estos describen que el TGF  $\beta$  es un potente estimulador de la síntesis de colágeno en cultivos fibroblásticos. Resaltan también la producción persistente de colágeno durante al menos 72 horas en cultivos con TGF  $\beta$ . Estos efectos suceden sin estimulación de la proliferación fibroblástica.

El TGF  $\beta$  estimula la producción de moléculas de matriz extracelular tales como fibronectina y colágeno (Igotz y Massagué, 1986; Roberts y col., 1986); en este último caso, se ha comprobado, en cultivo de fibroblastos pulmonares humanos, que produce un aumento en la producción de ambos tipos de colágenos I y III sin alterar la proporción.

TGF  $\beta$  1 y 2 aumenta la síntesis de fibronectina y colágeno (Massagué y col., 1986; Igotz y Massagué, 1986; Roberts y col., 1986) en muchos tipos de células en cultivo o "in vivo".

Además el TGF  $\beta$  1 parece regular la producción de proteínas que pueden modificar la matriz extracelular por acción proteolítica de sustancias como el activador del plasminógeno o el inhibidor del activador del plasminógeno (Laiho y col., 1986), procologenasa (Chua y col., 1985) y varias otras proteínas secretadas de función todavía desconocida (Nilsen-Hamilton y Holley, 1983 citados por Igotz y col., 1987). Así controlaría la expresión de fenotipos específicos "in vivo" para regular la

composición de matrices extracelulares.

El TGF  $\beta$  es prototipo de una gran familia de factores polipeptídicos que controlan el desarrollo de tejidos en organismos de *Drosophila* y humanos (Igotz y col., 1987). Sin embargo ha sido recientemente apreciado que el FCTs puede afectar profundamente a varios procesos de diferenciación celular.

Artículos previos concernientes a la modulación de los componentes de la matriz extracelular por el TGF  $\beta$ , consideran como un factor importante, la medida del rango de acumulación de fibronectina y colágeno I. Este efecto podría ser mediado por cambios en el rango de síntesis y/o estabilización de varias proteínas (Igotz y col., 1986, 1987).

Igotz y col. (1987) realizan distintos experimentos "in vitro" con fibroblastos y mioblastos de rata, indicando que el aumento de síntesis de fibronectina y colágeno tipo I es el mayor componente de la acción del TGF  $\beta$  sobre la matriz extracelular. La posible alteración de la composición y cantidad de matriz extracelular en fibroblastos, mioblastos y otros tipos de células producidas por el TGF  $\beta$  "in vivo" no está aún establecida.

Estos mismos autores, demuestran que el TGF  $\beta$  1 controla los niveles de fibronectina y colágeno tipo I, al menos en parte, por aumento en los niveles de los respectivos ARNm. El aumento en los niveles de ARNm de fibronectina y colágeno tipo I es una respuesta temprana de las células al TGF  $\beta$ .

Se ha observado en algunas células al igual que en monocito/macrófago la

producción de una proteína de unión para el TGF  $\beta$ , que a su vez estimula también el propio factor de crecimiento. Esta proteína efectivamente inhibe la interacción entre el TGF  $\beta$  y su receptor de superficie; el resultado del estudio comprueba que el complejo TGF beta-proteína de unión es biológicamente inactivo (Lawrence y col., 1984; Assoian y col., 1987).

Aunque los estudios iniciales con TGF  $\beta$  estaban basados sobre la premisa de ser un péptido específico para la iniciación del cancer, la identificación del mismo en un gran número de células y tejidos normales sugiere que esta proteína tiene un papel fundamentalmente regulador en el fisiologismo humano. Es muy clara su implicación en los procesos de reparación e inflamación, ya que plaquetas, macrófagos y linfocitos son todos ellos fuentes de TGF  $\beta$  (Assoian y col., 1987).

El TGF  $\beta$  es producido en forma latente por una gran variedad de células "in vitro". Normalmente este es activado por extremos de pH, sugiriendo que el acceso a un medio ambiente ácido debe activar el TGF  $\beta$  "in vivo" (Sporn y col., 1987).

Existen otros posibles mecanismos "in vivo" que activan el TGF  $\beta$ , tales como la exposición a plasmina y catepsina D, proteasas como el plasminógeno activado y collagenasa tipo IV, las cuales están asociadas con las membranas de las células endoteliales (Keski-Oja y Moses, 1987).

Richardson y Campion (1988) indican el papel del TGF  $\beta$  en la regulación de la actividad angiogénica, y posiblemente en la formación o regulación del desarrollo de los adipocitos en el tejido conjuntivo adiposo subcutáneo de fetos porcinos, en las

últimas etapas de gestación. Se desconoce el papel fisiológico del TGF  $\beta$  durante la fase inicial del desarrollo del tejido adiposo.

Cocultivos de pericitos con células endoteliales de capilares, inhibieron totalmente la proliferación de estas células endoteliales, siendo el TGF  $\beta$  activado el causante de dicha inhibición. Sin embargo, los cultivos independientes de estas células, sólo revelaron que tanto las células endoteliales como los pericitos producen TGF  $\beta$  en forma latente. Aun más, la adición al cultivo de pericitos y células endoteliales de anticuerpos neutralizantes frente al TGF  $\beta$  bloquea el efecto inhibitor. El papel de las interacciones célula-célula en la activación del TGF  $\beta$  es indicado por la falta de actividad inhibitoria en el medio de cultivo en el cual se pierde el contacto celular (Orlidge y col., 89)

Yoshida y col. (1991) realizaron experimentos "in vitro" con fibroblastos de pulmón humano para determinar la regulación de los niveles de proteoglicanos en el medio. Los resultados sugieren que la unión celular y la fibrinogénesis debería aumentar por el TGF  $\beta$ 1 a través de la vía de regulación coordinada de la expresión de decorina, colágeno, fibronectina y quizá otras moléculas de la matriz.

Williams y col. (1991) indican que los componentes de la matriz extracelular deben ser importantes en la regulación de las síntesis de colágeno por los fibroblastos pulmonares. El colágeno tipo I es el componente de la matriz que se acumula en el intersticio durante la fibrosis pulmonar y es sintetizado por los fibroblastos pulmonares humanos en cultivos celulares. El TGF  $\beta$  estimula la síntesis de colágeno tipo I y la

expresión ARNm alfa 1 (I) colágeno. Estos autores estudian los efectos del colágeno tipo I soluble sobre la formación de colágeno inducido por el TGF  $\beta$  en fibroblastos quiescentes de pulmón de embrión humano. Estos resultados indican que el colágeno soluble tipo I causa una modificación en el colágeno, quizás por la alteración en la formación del entrecruzamiento. Este dato sugiere que el colágeno afecta a su propia deposición dentro de la matriz extracelular debido a reacciones fibróticas.

Matrisian y col. (1992) consideran que el TGF  $\beta$  juega un papel importante en la regulación de las metaloproteinasas de matriz (estromelisina) y parece desempeñar un interesante papel en el desarrollo embriológico y en la morfogénesis del pulmón murino; así el tratamiento de pulmones embrionarios en cultivo de órganos con EGF o TGF  $\alpha$  origina una estimulación del crecimiento y/e inhibición de la división morfogénica. Sin embargo, el TGF  $\beta$  tiene un efecto contrario sobre el crecimiento del pulmón rudimentario murino y es inhibidor del crecimiento en forma dosis/dependiente. Este ejemplo ilustra el papel potencial de los FC en la regulación de la degradación de la matriz por metaloproteinasas en el complejo proceso del desarrollo.

### V.2.3.- FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA:

#### PROLIFERACION CELULAR

La función de estas moléculas es todavía oscura. Los experimentos de transfección celular demuestran que al menos, algunos de ellas son capaces de inhibir

la síntesis de DNA y la proliferación celular, y de producir un efecto citostático (Pepperkok y col., 1988).

Varias linfoquinas y moduladores inmunes de origen linfocítico han sido mostrados también como influyentes en la proliferación fibroblástica incluyendo interferon (Hunnunghake y col., 1986; Elias y col., 1987) y un factor inhibidor del crecimiento fibroblástico (Lemaire y col., 1986).

Los efectos proliferativos del TGF  $\beta$  sobre cultivos de células mesenquimatosas son más complejos (Roberts y col., 1985; Assoian y col., 1986; Massague y col., 1985), probablemente son bifuncionales (estimula y/e inhibe), dependiendo de la presencia de otros FC coexistentes. El único efecto del TGF  $\beta$  sobre los fibroblastos del pulmón humano de ambas muestras pulmonares, normal y fibrótico, parece ser citostático.

Otros peptidos mediadores que podrían influir en el crecimiento de fibroblastos pulmonares son secretados y liberados por los macrófagos alveolares (King y col., 1989). Estos FC por tanto actúan sobre los fibroblastos pulmonares intersticiales de una forma paracrina. Estos incluyen FC derivado de macrófagos alveolares y fibronectina (Bitterman y col., 1986), TGF, interferon e interleuquinas (Wewers y col., 1984).

El papel potencial de neuropeptidos (bombesina o péptido liberador de gastrina, sustancia P, péptido vasoactivo intestinal, que son liberados por las células neuroendocrinas pulmonares) como factores reguladores del crecimiento de los fibroblastos pulmonares del hombre está poco estudiado en el momento actual y

necesita ser más investigado. Además FC tales como insulina, entre otros, son liberados también de otros lugares para la modulación del crecimiento de fibroblastos pulmonares (Raghu y Kavanagh, 1991).

El potencial proliferativo intrínseco de los fibroblastos pulmonares en individuos sanos (o células "fibroblastic-like") es regulado por promotores del crecimiento (mitógenos) y factores supresivos (inhibidores). Estos factores de crecimiento reguladores están disponibles en las células "fibroblastic-like" en ambiente local y su liberación es de forma paracrina. El resultado final parece ser una combinación de efectos de varios factores que regulan el crecimiento fibroblástico en una función autocrina, paracrina y endocrina (Raghu y Kavanagh, 1991).

Los mecanismos moleculares de inhibición del crecimiento inducidos por los FC no están bien dilucidados. Es atribuido a una baja regulación en la expresión oncogénica y la inducción de nuevas proteínas ausentes en células proliferativas (Sorrentino, 1989).

Recientes observaciones revelan una posible unión entre la inhibición inducida por FC de la proliferación celular y anti-oncogenes activados. TGF  $\beta$  ha sido mostrado para prevenir la fosforilización de la proteína RB, así mantiene la desfosforilización, produciendo un estado de crecimiento supresor (Laiho y col., 1990).

El TGF  $\beta$  es el más ubicuo regulador negativo de la proliferación celular. Solo unas pocas células mesenquimatosas tales como los fibroblastos, pero no células epiteliales, proliferan en respuesta a TGF  $\beta$ . Aun más, inhibe la proliferación de células

neoplásicas incluyendo carcinomas de pulmón, mama, endometrio e hígado, y melanoma, así como fibro y osteosarcoma "in vitro" (Bernard y col., 1990). La aparente contradicción entre la actividad inhibitoria bien documentada del TGF  $\beta$  "in vitro", y su capacidad de promover la formación de un tumor en ciertos casos "in vivo" (Torre-Amione y col., 1990) nos da una idea sobre la problemática de extrapolar los resultados de experimentos "in vitro" a situaciones "in vivo". Estas situaciones contradictorias podrían ser aunadas, al considerar la complejidad de la red de citoquinas, que operan "in situ" produciendo señales que promueven el crecimiento (presentes o inducidas por el TGF  $\beta$ ), y que podrían tener algún efecto directo antiproliferativo del TGF  $\beta$ . Una prolongada exposición a FC, como en líneas celulares transformadas, puede producir una desensibilización y escape al estímulo inhibitorio. Los efectos angiogénicos e inmunosupresivos del TGF  $\beta$  representa una actividad pro-tumorogénica "in vivo". El crecimiento de las células tumorales "in situ" es determinada por un delicado balance de actividades pro y anti-tumorogénicas.

Los fibroblastos pueden ser estimulados para dividirse por los factores de crecimiento o mitógenos en la fase  $G_1$  del ciclo celular y promueven la síntesis de ADN y el crecimiento celular. Las células en estado  $G_0$  deben recibir factores de crecimiento con competencia y progresión, para completar el ciclo celular. La competencia de los FC que activan células, como por ejemplo los fibroblastos pulmonares humanos, en la fase  $G_1$  son: PDGF, matriz extracelular, fibronectina y factor de crecimiento fibroblástico. Insulina y FC derivados de macrófagos alveolares

son ejemplos de la progresión de FC que actúan más tarde en la fase G1 del ciclo celular, proceso crucial para la iniciación siguiente de la síntesis de ADN (Raghu y Kavanagh, 1991).

En los últimos años se han realizado estudios sobre el TGF  $\beta$  y miembros de esta superfamilia, comprobando que son potentes factores reguladores del crecimiento, principalmente regulan la proliferación celular y la diferenciación durante el desarrollo embriológico (Whitby y Ferguson, 1991). Estudios previos (Kulyk y col., 1989; Leonard y col., 1991) han sugerido la participación de este factor de crecimiento en la diferenciación mesenquimatosas hacia tejido cartilaginoso. Así Sato y Tuan (1992) comprueban el efecto de la deficiencia sistémica de calcio en el embrión de pollo, sobre el TGF  $\beta$ , produciéndose un aumento de la expresión a este factor en células mesenquimatosas diferenciadas, las cuales también aparecieron fuertemente positivas al colágeno tipo II. Este hecho confirma la diferenciación de las células mesenquimatosas hacia tejido cartilaginoso.

La mutación del gen RB proporciona a las células una resistencia a la inhibición del TGF  $\beta$  (Pusztai y col., 1993).

Un concepto nuevo e interesante, en la inhibición del crecimiento celular es el reconcimiento de las moléculas de unión de los FC; frecuentemente las regiones o dominios de unión de los receptores específicos que recubren las células, pueden fomentar la actividad de los FC (Pusztai y col., 1993).

El mecanismo de regulación de la proliferación celular, comienza con la

activación en los puntos de unión de los receptores de FC, a través de cambios en la dimerización y conformación; esta activación dispara un sistema de procesos bioquímicos que incluye fosforilación de proteínas, glicerol diacil, fosfato de inositol, prostaglandinas y generación de nucleótidos cíclicos y alteración intracelular de las concentraciones iónicas de calcio, sodio e hidrógeno (Pusztai y col., 1993).

Estos procesos provocan cambios en la morfología y citoesqueleto, así como alteraciones en el modelo metabólico de la glucosa y síntesis de proteínas, y eventualmente culmina en la progresión del ciclo celular (Pusztai y col., 1993).

Los dos mayores "puntos críticos" ("check-point"), los cuales controlan la progresión de la fase G1 a S, es regulado por signos extracelulares, la mayoría por GF y hormonas. En células cancerosas, el control es frecuentemente alterado en este punto. El segundo "punto crítico" es independiente de las señales extracelulares y es controlado por procesos internos de cromosomas, replicación y aumento de la masa celular. Este mecanismo de control recae sobre la segregación cromosómica en casos de incompleta o anomala replicación del ADN. La pérdida de función de este mecanismo, es manifiesta en los tumores, considerando que las células neoplásicas son frecuentemente aneuploides. Sin embargo, poco es conocido acerca del mecanismo molecular de este control. En fibroblastos el progreso a través del periodo de transición G1/S es subdividido en dos pasos referidos como competencia y progresión. La competencia es el paso inicial en el cual el precursor celular de la transición de la fase quiescente (G0/G1), entra en la fase S. Una corta exposición al PDGF hace que las

células competentes avancen en su progresión hacia la fase S. Sin embargo, la progresión requiere la presencia de EGF y IGF. El mecanismo molecular de estos efectos complementarios inducidos por diferentes receptores tirosina quinasa no es comprendido todavía. También ha sido observado que el modelo competencia/progresión no es universal; muchos de los tipos responden a estímulos simples como la proliferación. La progresión del ciclo celular depende de cambios en la actividad de una familia de proteínas (quinasas ciclina-dependientes) (Pusztai y col., 1993).

La mayoría de los estudios de regulación de la proliferación en células de mamíferos, han sido desarrollados en distintos modelos animales o "in vitro". Las evidencias para implicar a los FC en la patología humana "in vivo" es circunstancial. Como resultado del amplio uso de la inmunocitoquímica e hibridación "in situ", hay una rápida acumulación de hallazgos para la expresión de FC y sus receptores en tejidos normales y condiciones patológicas. Sin embargo, la cuestión básica de si FC son además secretados por células tumorales "in vivo" ha de ser aclarada. Nuevos experimentos nos acercan a este hecho, como los ensayos realizados en placas hemolíticas, las cuales detectan la secreción de FC por células tumorales individuales. El impacto de los FC sobre el pronóstico y aplicación terapéutica, y sus resultados se comprobarán en años futuros (Pusztai y col., 1993).

#### V.2.4.- FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE: SINTESIS DE COLAGENO

El TGF  $\beta$  debe ser un factor importante que contribuye a la síntesis del tejido conjuntivo alterado en la fibrosis pulmonar. El aumento del contenido de colágeno en lesiones inflamatorias o fibróticas debe ser un resultado de las acciones combinadas del TGF  $\beta$  y el PDGF (Ooshima, 1981; Morton y Barnes, 1982; Narayanan y col., 1983).

Las células fibroblásticas son la mayor fuente de colágeno en el parénquima pulmonar. Durante la respuesta inflamatoria del pulmón, son expuestas a varias sustancias derivadas de la sangre, daño del tejido, y células inflamatorias. Estas sustancias, incluyen complejos inmunes, componentes del suero, factores de crecimiento y citoquinas, se cree que activan los fibroblastos causando la división, proliferación y síntesis del colágeno y otros componente de la matriz. Entre varias de estas moléculas que pueden influenciar la actividad de los fibroblastos merece atención el TGF  $\beta$ . Es secretado por plaquetas y macrófagos, mostrándose como puente de unión de fibrosis y angiogénesis, acelerando la curación de heridas, y causando un aumento persistente de la síntesis de colágeno I y III en cultivos de fibroblastos (Sporn y col., 1987; Ignatz y col., 1987; Varga y col., 1987). El papel principal del TGF  $\beta$  en la fibrosis pulmonar humana está expresada por macrófagos alveolares.

TGF  $\beta$  es un polipéptido regulador del crecimiento y diferenciación (Sporn y col., 1987), influye en la síntesis y degradación de componentes de la matriz por

diferentes tipos celulares, que específicamente promueven la síntesis de colágeno por fibroblastos pulmonares (Fine y Goldstein, 1987) y producen una respuesta de tejido fibrótico "in vivo" (Sporn y col., 1987). Como factor que desarrolla la acumulación de matriz, hay que considerarlo interesante en su posible implicación en la curación de heridas y fibrosis.

Recientemente ha sido demostrado que TGF  $\beta$  tiene un efecto regulador en la síntesis de proteoglicanos análogos al PGI (Biglican) y PGII (Deconina), y es originado por una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo fibroblastos pulmonares y células epiteliales del pulmón (Overall y col., 1989). El efecto del TGF  $\beta$  es incrementar dos veces más la síntesis de la estructura central y la masa molecular de glicosaminoglicanos.

Clark y col. (1989) han observado una disminución en la síntesis de colágeno por fibroblastos pulmonares del hombre, expuestos a gamma-interferon.

Antoniades y col. (1991) han estudiado la síntesis de colagenos en cultivos celulares de fibroblastos de muestras de pulmones humanos normales y fibróticos, y evaluaron los efectos del TGF  $\beta$ . Ambos fibroblastos de pulmones normales y fibróticos sintetizan cantidades similares de colágeno. El colágeno tipo I es el colágeno mayor sintetizado por ambos tipos celulares normales y fibróticos, y en relativa proporción el colágeno I, III y V. TGF  $\beta$  causa de 2 a 4 veces aumento en la estimulación de la producción de colágeno y los niveles de RNAm del colágeno sin casi proliferación fibroblástica "in vitro"; todos los tipos de colágeno (I,III y V) son

estimulados por el TGF  $\beta$ .

Bajo determinadas circunstancias es probable que el TGF  $\beta$  y otros FC pueden actuar como sinergistas o antagonistas de células fibroblásticas en el parénquima pulmonar "in vivo". Otros mecanismos tales como la disminución en la degradación y en la síntesis de colágeno, deben contribuir a la intrincada malla que tiene como resultado la alteración del tejido conjuntivo, y como consecuencia la fibrosis pulmonar (Antoniades y col., 1991).

## **MATERIALES Y METODOS**

---

## MATERIALES Y METODOS

### I.- ANIMALES UTILIZADOS.

Los animales objeto de estudio fueron caballos sacrificados mediante puntilla y degüello posterior. Durante la fase de faenado, se realizaba la extracción de la tráquea y pulmones. En ese momento realizábamos la inspección de estos órganos, y seleccionábamos las patologías pulmonares objeto de nuestro estudio.

#### I.1.- NUMERO

La recogida de muestras se realizó ininterrumpidamente desde Septiembre de 1991 a Agosto de 1992 en el Matadero Municipal de Madrid.

En el período indicado se sacrificaron 1425 caballos, que representa un 56,8% del total de los équidos. El número de pulmones decomisados supuso un 34,93% del porcentaje sobre el sacrificio total, de los cuales el 57% se correspondían con decomisos por neumonías inespecíficas.

En nuestro estudio hemos empleado los pulmones de 100 animales, correspondientes al grupo decomisado por neumonias, lo cual significa un 7% del total

de caballos que se sacrifican en el matadero Municipal de Madrid (Legazpi). Al mismo tiempo recogimos 5 pulmones sanos.

#### I.2.- PROCEDENCIA

Las zonas de origen de los caballos, fueron la Comunidad de Madrid y las provincias limítrofes de las comunidades de Castilla la Mancha y Castilla-León, en concreto: Toledo, Avila, Segovia, Guadalajara, Cuenca y Ciudad Real.

#### I.3.- RAZA

La gran mayoría de los animales estudiados se corresponden con caballos cruzados (n=92), y en un pequeño porcentaje Pura Raza Española (n=5), Pura Sangre Inglés (n=2) y Raza Árabe (n=1).

#### I.4.- EDAD

En los animales objeto de estudio la edad se determinó con arreglo a la dentición, empleando los criterios expuestos por la American Association of Equine Practitioners en 1988 (Tablas 2-6 y Gráfico 1).

### I.5.- SEXO

La distribución de los animales por sexo, se especifica en las Tablas 2-6.

Asimismo podemos comprobar en el Grafico 2 que un 80% de los animales eran hembras frente al 20% de machos. La razón que justifique este hecho podríamos encontrarla en el alto número de hembras reproductoras de desvieje con problemas obstétricos que son enviadas al matadero.

## **II.- TOMA DE MUESTRAS.**

### II.1.- MUESTRAS DE SANGRE

Tras el degüello recogíamos sangre total para el estudio virológico, centrifugando posteriormente a 2.500 r.p.m. De esta forma obteníamos el suero de cada animal para detectar los niveles de anticuerpos frente a los virus estudiados.

### II.2.- MUESTRAS DE PULMON

Una vez recogido el material en el Matadero, nos desplazábamos al Departamento de Patología Animal II (Facultad de Veterinaria de Madrid), donde realizábamos una detallada descripción macroscópica de los pulmones, y

fotografiábamos los casos más interesantes para nuestro trabajo.

A continuación procedíamos a la toma de muestras de las zonas objeto de estudio siguiendo las pautas indicadas por Viel (1983) y Drommer y col. (1985). Así obteníamos ocho muestras, cuatro de cada pulmón tal y como indica el Gráfico 3.

### **III.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS.**

Se realizaba dependiendo del tipo de estudio, y así podemos distinguir:

- Estudio microbiológico y virológico.
- Estudio histopatológico: Técnicas Convencionales

Técnicas Immunocitoquímicas

#### **III.1.- ESTUDIO MICROBIOLOGICO Y VIROLOGICO.**

Para ello se utilizaron hisopos con medio de transporte "Stuart Biomedics" (Ref. T 1004 8E) y medio de transporte "Stuart Modificado Difco" (Ref. 9340-26-0), los cuales eran introducidos en los bronquios principales de cada pulmón; se tomaban asimismo muestras de parénquima para aislamiento microbiológico. Antes de 24 horas las muestras se sembraron en placas de cultivo. El procesado e identificación se desarrollaron siguiendo la metodología utilizada en el Laboratorio Agropecuario Regional de Algete (Madrid).

El estudio virológico se realizó sobre muestras de sangre total obtenidas en el sangrado de los animales y tras la centrifugación a 1500 r.p.m., obtuvimos un suero que era congelado a - 18° C. La valoración de los anticuerpos se realizó frente a Paramixovirus tipo 1 y 2, mediante inhibición de la hemaglutinación (IHA). Para ello titulamos el virus usando el método de aglutinación de glóbulos rojos de oveja, determinando así la unidad vírica aglutinante (UVA) para cada subtipo, necesarias como patrón para la prueba posterior de la IHA:

$$1 \text{ UVA} = A/\text{Equi } 1 = 1/167$$

$$1 \text{ UVA} = A/\text{Equi } 2 = 1/367$$

El laboratorio Agropecuario de Algete señala el título de anticuerpos frente a influenza tipo A en 1/20 como valor significativo, para la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

### III.2.- ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.

#### III.2.1.- TECNICAS CONVENCIONALES

##### III.2.1.1.- **FIJACION E INCLUSION**

Las muestras destinadas para este estudio fueron fijadas en formol al 10%. Tras la fijación se tallaron e introdujeron en "cassettes" de plástico y lavadas en agua

corriente durante 2-4 horas. Para incluir las muestras hemos utilizado un procesador automático de tejidos "Shandon-Elliot Bench SCE 0400". La inclusión fue en parafina sintética "Histotec pastillas" (Merck) con punto de fusión 56°- 58°C. La formación de los bloques se realizó en una consola Tissue-Tek (Dispensadora de parafina, Consola Térmica y Crioconsola: Miles Scientific).

### III.2.1.2.- CORTE

Una vez confeccionados los bloques de parafina fueron cortados en un microtomo de rotación Leitz, modelo 1516 de cuchillas desechables, con un grosor de 3-5  $\mu\text{m}$ .

Las secciones obtenidas eran depositadas en la superficie de agua caliente a una temperatura aproximadamente de 37-40° C para favorecer la eliminación de pliegues. A continuación se recogieron las muestras mediante portas, desengrasados previamente con alcohol-eter y secadas en una estufa a 37° C, durante 12 horas.

### III.2.1.3.- TINCION

Para el diagnostico histopatológico se aplicaron diversas técnicas convencionales de tinción:

- Hematoxilina/eosina.

- Tricrómico de Masson.
- Tricrómico de Gallego.
- P.A.S. (Acido Peryodico de Schiff).

Tanto los colorantes como los tiempos empleados en cada una de ellas son los habituales seguidos en nuestro laboratorio de Histopatología.

### III.2.2.- TECNICAS INMUNOCITOQUIMICAS

#### III.2.2.1.- **FIJACION, INCLUSION Y CORTE**

La fijación se realizó en líquido de Bouin (75 % de ácido pícrico a saturación, 25 % de formalina comercial, y 1-2 gotas de ácido acético glacial por cada 10cc de la mezcla anterior) durante un período de 10-12 horas. Posteriormente las muestras se lavaron mediante cambios sucesivos en alcohol de 40°, donde permanecieron varias horas o días hasta su inclusión.

Formol tamponado comercial en proporción 1/10 (Assens Llofriu S.A., Cod. n° 0713).

El proceso de tallado, inclusión y corte es análogo al desarrollado para microscopía convencional, si bien, los portas estaban recubiertos con poli-L-Lisina-Agarosa (MN: 4,000 - 15,000; Sigma Chemical Company) y se secaron a temperatura ambiente durante 24 horas antes de su utilización.

### III.2.2.2.- INMUNOTINCION

Las técnicas inmunocitoquímicas aplicadas han sido peroxidasa-antiperoxidasa (P.A.P.) según el protocolo de tinción descrito por Sternberger (1978) e inmunofluorescencia indirecta (I.F.I).

La técnica de **P.A.P.** se desarrolló según las distintas etapas establecidas:

- 1º.- ~~Desparafinar:~~ Xilol.....10 min. x2  
           Etanol 100º.....5 min. x2  
           Etanol 96º.....5 min.

En el caso de la fibronectina, colágeno tipo IV y laminina era necesario utilizar un tratamiento enzimático suave con pepsina, para aumentar la capacidad antigénica de la muestra. Tras la inhibición de la peroxidasa endógena y el posterior lavado en agua destilada (5 min. x3), las preparaciones se sumergieron en una solución 0,4% de pepsina comercial (procedente de la mucosa del estómago de suidos: 1:10000; 515 unidades/mg solido; 2,200 unidades/mg proteína: Sigma Chemical Co.) en CIH 0,01 N a ph 2,0, constituida por:

- \* 99,6 ml de CIH 0,01 N.
- \* 0,4 g de pepsina comercial.

Las muestras se mantuvieron en esta solución a 37º C durante 5-10 min. como máximo. Realizada la digestión las secciones se volvieron a lavar en agua destilada 5 min. x3.

2°.- Lavar con tampón PBS, ph 7,2.....5 min. x3

La preparación de la solución tampón se realizó empleando el siguiente protocolo:

\* Cloruro sodico (NaCl).....8,7 grs.

\* Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).....0,272 grs.

\* Fosfato bisódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).....1,136 grs.

Las cantidades utilizadas se disuelven en un litro de agua destilada, midiendose posteriormente en un Phmetro y ajustándose el ph a 7,2.

3°.- Inhibición de la Peroxidasa Endógena.....30 min.

\* Para ello se sumergen las preparaciones en una solución de agua oxigenada al 0,3% en PBS (1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en 100 ml de PBS).

4°.- Lavar en tampón PBS, ph 7,2.....5 min. x3

5°.- Bloqueo de la tinción inespecífica (blackground):- Depositar 25 ul de suero normal de cerdo (DAKO-PATTS 901. Dilución óptima 1/30) por corte, incubando durante 30 min. a temperatura ambiente, en cámara húmeda.

6°.- Incubación con el primer anticuerpo:- Esta capa era variable, dependiendo del tipo de antisuero empleado. En nuestro trabajo hemos usado antisueros frente a las siguientes **proteínas de matriz extracelular**:

\* Proteínas no fibrilares.

- Laminina.

- Fibronectina.

\* Proteínas fibrilares: Colágenos.

- Colágenos Mayores: colágeno tipo I y III.

- Colágenos Menores: colágeno tipo IV.

Así los anticuerpos empleados como primera capa fueron:

#### 6°.1.- FIBRONECTINA

Suero antifibronectina plasmática humana obtenida en conejo (Chemicon INT.- AB 1940). Dilución de trabajo 1/100.

#### 6°.2.- LAMININA

Antilaminina policlonal de membrana basal del tumor "engelbreth-holmswarm" de ratón obtenido en conejo (Chemicon INT.- AB 940). Dilución de trabajo 1/100.

#### 6°.3.- COLAGENO TIPO I

Suero anticolágeno tipo I de dermis bovina obtenido en conejo (Chemicon INT.- AB 749). Dilución de trabajo 1/100.

#### 6°.4.- COLAGENO TIPO III

Suero anticolágeno tipo III bovino obtenido en conejo (Chemicon INT.- AB 750). Dilución de trabajo 1/100.

#### 6°.5.- COLAGENO TIPO IV

Suero anticolágeno tipo IV procedente de placenta humana obtenido en conejo (INC Immunobiologicals- 68124). Dilución de trabajo 1/100.

\* Los distintos anticuerpos eran incubados durante 24 horas a 4°C en cámara húmeda.

7°.- Lavar en tampón PBS, ph 7,2.....5 min. x3

8°.- Incubación con la capa puente: puesto que la totalidad de los primeros anticuerpos han sido obtenidos en conejo, utilizamos como puente anticuerpos de conejo obtenidos en cerdo (Swine antirabbit immunoglobulins. DAKO-PATTS Z. 196). Dilución de trabajo 1/100. Las muestras se incubaron durante al menos 30 minutos en cámara húmeda.

9°.- Lavar en tampón PBS, ph 7,2.....5 min. x3

10°.- Incubación con el complejo P.A.P.: Empleamos PAP de conejo(PAP rabbit DAKO-PATTS Z.96) a dilución 1/64 durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

11°.- Lavar en tampón PBS, ph 7,2 .....5 min. x3

12°.- Revelado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) tetrahydrochlorada en tabletas de concentración 10 mg (Sigma Immunochemicals.D-5905). La solución empleada constaba de: 40 ml/PBS, 40  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% y una tableta de 10 mg DAB.

Los tiempos empleados en el revelado se adjuntan en la siguiente Tabla 7:

<b>ANTICUERPO</b>	<b>TIEMPO DE DAB</b>
<b>FIBRONECTINA</b>	2 MIN.
<b>LAMININA</b>	7 MIN.
<b>COLAGENO TIPO I</b>	3 MIN.
<b>COLAGENO TIPO III</b>	10 MIN.
<b>COLAGENO TIPO IV</b>	10 MIN.

- 13°.- Lavar en agua destilada durante 10 min.
- 14°.- Contrastado con hematoxilina de Carrazzi....5 min.
- 11°.- Deshidratar: Etanol 96°.....1 min.  
                   Etanol 100°.....1 min. x2
- 12°.- Aclarar: Xilol.....2 min. x2
- 13°.- Montaje con Histoclaclac o DPX.

La técnica de **I.F.I.** fue utilizada para detectar factores de crecimiento en los pulmones de los animales objeto de estudio. Así despues del desparafinado y lavado con PBS según lo descrito para la técnica de P.A.P., incubamos las muestras con el **anticuerpo primario**:

\* **FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE  $\beta$**  (Transforming Growth Factor - TGF  $\beta$ ):

Suero anti-TGF  $\beta$  procedente de plaquetas porcinas obtenido en conejo (British Biotechnology Products Ltd. BDA 5). Dilución de trabajo 1/5.

\* **FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS** (Platelet Derived Growth Factor - PDGF):

Suero anti-PDGF procedente de PDGF natural humano obtenido en cabra (British Biotechnology Products Ltd. BDA 16). Dilución de trabajo 1/30.

El 2° paso de esta técnica consistía en lavar con PBS ph 7,2 (5 min.x3).

A continuación incubamos en completa oscuridad y en cámara húmeda con el conjugado correspondiente para cada factor de crecimiento:

\* Utilizamos Ig G (H+L) de oveja anti Ig G de conejo FITC (Conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína: ImmunoBiologicals 683081-0012) para el TGF  $\beta$ . Dilución de trabajo 1/50.

\* En el caso del PDGF usamos Ig G (H+L) de conejo anti Ig G de cabra FITC (Conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína. Sigma Immuno Chemicals. F-7367). Dilución de trabajo 1/64.

Posteriormente se lavan las preparaciones con PBS ph 7,2 (5 min.x3) y se montan en un medio acuoso (Glicerina tamponada: 9 partes de PBS ph 7 + 1 parte de glicerina -Merck. No 4094).

### III.2.2.3.- DILUCION OPTIMA DE TRABAJO

Para determinar la dilución óptima de trabajo en los diferentes **anticuerpos primarios**, se utilizaban varios cortes seriados de una misma muestra además de una sección de tejido pulmonar normal. A partir de ahí, y teniendo como patrón la dilución que la casa comercial recomienda en cada caso, estandarizamos las distintas diluciones de trabajo en 1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300 y 1/500, eligiendo como óptima aquella más alta y con mayor reacción tintorial a nivel tisular.

En el caso de los factores de crecimiento, capa puente y PAP de conejo, se utilizaron las diluciones recomendadas por el fabricante.

### III.2.2.4.- UTILIZACION DE CONTROLES

#### III.2.2.4.1.- Controles Negativos

Realizamos los controles negativos pertinentes mediante la sustitución del anticuerpo primario por PBS. El resto de la técnica era idéntica.

#### III.2.2.4.2.- Controles Positivos

La mayoría de los anticuerpos primarios utilizados tienen como inmunógenos proteínas de otras especies (colágeno bovino, laminina de ratón, entre otras) y no habían sido testados en tejidos equinos por lo que no se conocía su reactividad para el caballo. Al poner a punto las diversas técnicas se han utilizado como controles positivos secciones de tejidos de las correspondientes especies, siempre que ha sido posible.

Una vez comprobada la reacción cruzada para los tejidos equinos, nos sirvieron como controles positivos internos determinadas estructuras pulmonares inmunorreactivas frente a los distintos anticuerpos, basándonos en estudios inmunocitoquímicos previos.

En el caso de los factores de crecimiento con inmunofluorescencia utilizamos tumores mamarios caninos con una marcada fibroplasia, con sus correspondientes

controles negativos.

#### **IV.- ICONOGRAFIA**

Las imágenes macroscópicas se realizaron con una cámara Reflex "Minolta" dotada de un objetivo macro de 50 mm, 1:3,5, con película Kodak Ektachrome 160.

Para las microfotografías empleamos película Kodak Ektachrome 64 de Tungsteno y microscopio Olympus AH-3 (Vanox AHB53), con sistema de autofocus y dos cámaras incorporadas.

En el caso de las muestras para inmunofluorescencia, las fotografías fueron realizadas con una cámara Orthomat transistorizada acoplada a un microscopio Orthoplan, utilizandose película Kodak Ektachrome 160 (luz artificial).

## **RESULTADOS**

---

## **RESULTADOS**

Una vez realizada la revisión bibliográfica la cual pone de manifiesto la importancia de las neumonías intersticiales y la fibrosis pulmonar, principalmente en hombre y equinos, expondremos nuestros resultados de acuerdo con el siguiente esquema:

### I.- Estudio microbiológico.

#### I.1.- Aislamiento microbiológico.

#### I.2.- Valoración virológica.

### II.- Estudio anatomopatológico.

#### II.1.- Macroscópico.

#### II.2.- Histopatológico.

### III.- Estudio Inmunocitoquímico.

## **I.- ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.**

### **I.1.- AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO**

El análisis microbiológico de los pulmones, reveló las siguientes bacterias clasificadas según la tinción de Gram: \* Gram positivas: Staphylococcus sp.

Streptococcus grupo C

Streptococcus zooepidemicus

Streptococcus alpha hemolítico

Corynebacterium sp.

Actinobacillus equuli

\* Gram negativas: Escherichia coli

Pseudomonas sp.

Bacillus sp.

Klebsiella oxytoca

Klebsiella pneumoniae

Providencia sp.

Asimismo se han aislado levaduras en un 12% de los animales objeto de estudio.

De los 100 animales procesados un 47% tenían crecimiento significativo, un

39% presentaban aislamiento negativo y un 14% tenían crecimiento no significativo.

Estas tres categorías se establecieron de acuerdo a los siguientes parámetros:

- \* crecimiento o no,
- \* aislamiento en pureza y
- \* número de colonias.

Los resultados del examen bacteriológico se reflejan en las Tablas 7-16 y Gráfico 4. Establecemos las distintas categorías, anteriormente mencionadas, valorando cada crecimiento bacteriano de 1 a 3 cruces, tal y como señalamos en este esquema:

- \* Crecimiento negativo: ausencia de colonias en la placa de agar (-).
- \* Crecimiento no significativo: detectamos su presencia, sin embargo el crecimiento no es importante. Se representa por una cruz (+).
- \* Crecimiento significativo: Su aislamiento es valorable, el crecimiento es en pureza, por ello los consideramos potencialmente patógenos. Se representan con dos a tres cruces: ++ significativo o +++ altamente significativo.

La incidencia que mostraba cada uno de los organismos aislados queda reflejada en la Tabla 13, y en ambos casos, supera el 100%, al considerar el 39% de los animales con crecimiento negativo. Este hecho se explica por el aislamiento de múltiples microorganismos en un mismo pulmón, siendo incluso significativo para más de un agente, que en nuestro caso representa el 34,4% de los animales del grupo de caballos con aislamiento microbiano.

La máxima incidencia sobre el número total de animales estuvo representada por *Streptococcus* sp. (35%), *Levaduras* sp. (12%), *Staphylococcus* sp. (11%) y *Pseudomonas* sp. (10%).

Es importante señalar que en el caso de las levaduras, sólo se consideran patógenas aquellas que crecen a temperatura de 37°C, con lo que la incidencia se reduce a un 4%.

Asimismo las tres bacterias potencialmente patógenas tuvieron en un gran número de casos (58% para *Streptococcus* sp.; 20% para *Pseudomona* sp.; 12% para *Staphylococcus* sp.) un crecimiento altamente significativo y por ello las consideramos causantes de procesos patológicos respiratorios en los animales objeto de estudio.

## I.2.- VALORACION VIROLOGICA

La detección vírica se realizó midiendo el nivel de anticuerpos en sangre frente al Mixovirus Influenza: variedades Praga 56 (A/Equi 1) y Miami 63 (A/Equi 2)

Los resultados de este estudio reflejan que un 79% de los caballos, presentaban título de anticuerpos negativo frente a las distintas variedades víricas enfrentadas.

Un 21% mostraban tasas de anticuerpos considerados como significativos. Hemos de señalar que de este grupo un 62,5% tenían títulos altos sólo frente a una de las dos variedades (A/Equi-1) y el 37,5% restante frente a ambas variedades víricas (Grafico 5). Dentro de este último grupo observamos dos animales que presentaban títulos muy elevados:

	<u>A/Equi-1</u>	<u>A/Equi-2</u>
Caballo nº 33.....	1/640	1/1280
Caballo nº 95.....	1/320	1/80

Asimismo, hemos intentado establecer una relación estadística entre la detección vírica de anticuerpos y los estudios macroscópicos e histológicos.

El resultado no ha sido significativamente estadístico, sin embargo

consideramos que son de interés algunas de las asociaciones realizadas entre la valoración vírica y algunas categorías histológicas.

Así los cinco équidos diagnosticados histológicamente con neumonía intersticial linfoide (NIL), presentaron todos títulos de anticuerpos significativos sólo frente a la variedad A/Equi-1.

Igualmente pudimos comprobar que los animales con neumonía intersticial bronquiolitis obliterante (NIBO), mostraron títulos frente a A/Equi-1 (2 caballos) y A/Equi-2 (3 animales).

Los équidos serológicamente negativos representaban un 85% y estaban diagnosticados en su mayoría de neumonía intersticial usual (NIU); en este mismo grupo se incluyen las dos neumonías intersticiales eosinofílicas.

## **II.- ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO.**

### **II.1.- MACROSCOPICO**

Desde el punto de vista anatomopatológico macroscópico podemos agrupar los distintos procesos pulmonares de nuestros caballos en tres tipos diferentes (Tablas 18-21):

**TIPO A.**- Este presentaba focos neumónicos recientes, distribuidos de forma irregular, y afectando a lobulillos o lobulos, dependiendo de su extensión. Los lóbulos en los que normalmente se asientan estas lesiones son los craneales, así como la zona de unión entre los lóbulos craneal y caudal.

Macroscópicamente estas áreas aparecen consolidadas y atelectásicas; según la naturaleza del proceso y la antigüedad del mismo su color varía del rojo oscuro al rosa grisáceo. Alrededor de estas áreas se observan pequeñas zonas prominentes de color blanquecino correspondientes a enfisemas vicariantes (Fig. 1).

A la palpación estas zonas eran firmes y de una consistencia semejante a la del hígado. La superficie de corte era irregular, y de la misma fluía un líquido que variaba del color rojizo al blanco. Los bronquios de estas zonas estaban afectados frecuentemente, y presentaban un contenido mucosanguinolento en su interior.

Estas lesiones anatómicas se corresponden con las típicas bronconeumonías lobares de los "Síndromes Respiratorios" (Bronquiolo Intersticiales).

**TIPO B.**- El segundo grupo de pulmones se caracterizan por ser muy voluminosos, sobre todo, en la región del hilio más que en áreas periféricas. Así, hemos valorado el abombamiento de los mismos, designando a cada uno con cruces (de una a tres):

- Ligeramente voluminoso +
- Voluminoso ++
- Muy voluminoso +++

Además el parénquima presentaba un aspecto tostado o púrpura con pequeñas áreas blanquecinas. La consistencia era firme, y la superficie de corte mostraba también color tostado. Las imágenes macroscópicas coinciden con las propias de una neumonía intersticial (Fig. 2).

**Tipo C.**- Los pulmones mostraban lesiones antiguas de procesos neumónicos. Normalmente se trataba de cicatrices fibrosas localizadas en los dos lóbulos craneales, o en uno de ellos. La imagen más típica de estos pulmones, son densas masas subpleurales en el borde fundamental del lóbulo caudal del pulmón. Al corte se presentan extensas áreas del parénquima pulmonar de aspecto blanquecino, con una consistencia semejante al caucho. Masas semejantes se observan alrededor de los bronquios. Al primer proceso se le denominada neumonía lardácea y al segundo bronquitis nodosa. Estas imágenes coinciden con las propias de Neumonías Crónicas.

Asimismo se observan enfisemas localizados a nivel de los lóbulos craneales y las zonas más marginales de los lóbulo caudales (Fig. 3).

La incidencia de cada uno de los distintos tipos anatomopatológicos descritos

se recoge en el Gráfico 5 y fué:

- \* 17% de los caballos tenían el tipo A,
- \* 34% de los pulmones de caballo presentaban un patrón C,
- \* 49% de animales corresponden al tipo B.

Un 15 % de los animales presentaban depósito de carbón en los linfáticos de la pleura (antracosis).

Asimismo, comprobamos la existencia de vasos varicosos subpleurales en alguno de los pulmones estudiados.

## II.2.- HISTOPATOLOGICO

Para el estudio y clasificación de los distintos procesos respiratorios observados en los équidos objeto de estudio y desde el punto de vista histológico, hemos realizado una división en base a otras clasificaciones previas establecidas tanto en medicina humana (Liebow, 1975; Selman y Barrios, 1991) como en veterinaria (Dungworth, 1993). Con esa base hemos obtenido los siguientes resultados (Tablas 18-21 y Grafico 5):

II.2.1.- Neumonía Intersticial Linfoide (NIL) . . . . .	5%
II.2.2.- Neumonía Intersticial Eosinofílica (NIE) . . . . .	2%
II.2.3.- Neumonía Intersticial Descamativa (NID) . . . . .	8%
II.2.4.- Neumonía Intersticial de Células	
Gigantes (NICG) . . . . .	2%
II.2.5.- Neumonía Bronquiolo Intersticial (NBI) . . . . .	10%
II.2.6.- Neumonía Intersticial con Bronquiolitis Obliterante (NIBO) . . . . .	5%
II.2.7.- Neumonía Intersticial Usual (NIU) . . . . .	68%

Desarrollaremos las lesiones observadas en cada tipo enunciado, centrando el estudio en la luz alveolar, septo alveolar y porción conductora (bronquio y bronquiolo).

### **II.2.1.- NEUMONIA INTERSTICIAL LINFOIDE**

En nuestro estudio representa un 5 % de la incidencia total de neumonías.

Se aprecian masas de aspecto polipoide en algunas luces alveolares, compuestas por fibras de colágeno, fibroblastos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Estas estructuras se corresponden con organizaciones fibróticas intraluminales que se unen a los septos colindantes.

En el septo alveolar, la NIL presenta una fibrosis septal variable con un fuerte infiltrado de células redondas, principalmente linfocitos, y en menor número, histiocitos y células plasmáticas.

Se observan mangitos perivasculares linfocíticos, sobre todo alrededor de grandes vasos.

Existen verdaderas formaciones linfoides en el parénquima y alrededor de los bronquiolos con las estructuras típicas de centro germinal claro y corona linfocitaria. Tanto en los septos como en la lámina propia de bronquios y bronquiolos aparece un discreto número de eosinófilos.

La mucosa de los bronquiolos está infiltrada por una gran número de linfocitos (Fig. 4 y 5).

### **II.2.2.- NEUMONIA INTERSTICIAL EOSINOFILICA**

Este tipo histológico, junto con la neumonía intersticial de células gigantes

(NICG), representan la menor incidencia dentro de las neumonías estudiadas (2%).

El lumen de algunos alveolos aparece ocupado por un líquido de color rosado (edema alveolar).

En este edema alveolar, se observa un escaso número de células tales como linfocitos, células plasmáticas y neumocitos descamados.

Se comprueba gran número de eosinófilos en la mayoría de las luces alveolares, algunos de los cuales aparecen degranulados.

En otras zonas, se aprecia una organización intraluminal de redes de fibrina; dichas masas están rodeadas por células fibroblásticas, y eosinófilos que quedan atrapados en su interior.

El septo alveolar aparece recubierto, en algunas áreas, por células de aspecto cúbico, con núcleo grande y rico en heterocromatina; en otras zonas se aprecia la proliferación de células muy semejantes pero con núcleo y nucleolo claros que asemejan a neumocitos tipo II. Existen áreas donde parece que existe una total disolución de la arquitectura del septo interalveolar.

En algunos casos se aprecia un engrosamiento fibrótico de la pared interalveolar, con numerosos eosinófilos dispersos entre dicho tejido conjuntivo.

Los capilares interalveolares aparecen dilatados. Algunos de ellos contienen eosinófilos.

Observamos verdaderos tapones de eosinófilos en la luz de bronquios y bronquiolos, así como una peribronquitis y peribronquiolitis eosinofílica.

Existe un aumento de tejido conjuntivo que rodea a estas porciones conductoras, comprobándose, en el seno del mismo algunos manguitos perivasculares con abundantes eosinófilos y algunos linfocitos.

Las fibras musculares lisas que rodean a bronquios y bronquiolos, aparecen disueltas en algunas zonas e infiltradas por eosinófilos, macrófagos e histiocitos en otras (Fig. 6 y 7).

### **II.2.3.- NEUMONIA INTERSTICIAL DESCAMATIVA**

---

Ocupa el tercer lugar, con un 8% de incidencia dentro de las neumonías estudiadas.

En las luces alveolares se observa abundante cantidad de macrófagos alveolares desprendidos y activados, con numerosas vacuolas en su citoplasma. Existe en algunas zonas una gran cantidad de células binucleadas siendo escasas las células gigantes.

En algunos alveolos podemos apreciar membranas hialinas, las cuales aparecen, a veces, rodeadas por células de núcleo alargado y cromatina laxa que se corresponden con fibroblastos jóvenes.

Existe una hipertrofia del septo alveolar con proliferación y dilatación de capilares. Se observan edema e hialinosis; estas masas hialinas rosáceas con hematoxilina-eosina presentan abundantes células de aspecto fibroblástico, sin ser todavía una auténtica fibrosis septal. En esta localización se aprecia también un

discreto infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos (Fig. 8). La porción conductora tiene aspecto normal.

#### **II.2.4.- NEUMONIA INTERSTICIAL DE CELULAS GIGANTES.**

Representa tan sólo el 2% de las imágenes histopatológicas observadas en nuestros animales de estudio.

Microscópicamente presentan las mismas características que una neumonía intersticial descamativa (NID), aunque con un grado más avanzado en el proceso de fibrosis intraluminal e interalveolar. Dentro de las distintas células que aparecen dispersas en la luz alveolar, se aprecia un significativo aumento del número de células gigantes multinucleadas, con respecto al resto de elementos que la componen (Fig. 9 y 10).

#### **II.2.5.- NEUMONIA BRONQUIOLO INTERSTICIAL**

Este grupo representa el 10% de las neumonías clasificadas histológicamente; la mayoría se encuadran dentro del 17% de los pulmones, que se clasifican macroscópicamente como grupo A.

Se observan las luces de los alveolos tanto de los adyacentes a los bronquiolos y bronquios, como de los más alejados, repletos de neutrófilos, glóbulos rojos, detritus

celulares, exudado serofibrinoso, macrófagos de aspecto espumoso cargados de vacuolas y células epiteliales descamadas.

Asimismo, se aprecian en algunos puntos del parénquima focos necróticos, compuestos principalmente por detritus celulares y acúmulo de polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos.

Existe una marcada dilatación de los capilares septales, así como una proliferación de neovasos.

La superficie alveolar aparece libre de células, salvo en algunas zonas donde se aprecian reepitelizaciones de neumocitos tipo II.

El tejido conjuntivo peribronquial y peribronquiolar, se halla fuertemente infiltrado, principalmente por neutrófilos, linfocitos, histiocitos y células plasmáticas en disposición perivascular o dispersos en la lámina propia. Los tabiques interlobulillares presentan un marcado edema.

En bronquios y bronquiolos, existen verdaderos tapones mucosos con hipertrofia e hiperplasia de células caliciformes y abundantes neutrófilos. Sin embargo en algunos casos, encontramos hiperplasia epitelial y asimismo una metaplasia escamosa en la mucosa bronquial, que origina una marcada disminución del número de células caliciformes.

A nivel bronquiolar se observa un crecimiento hiperplásico por parte de las células epiteliales, que dan a la mucosa un aspecto fruncido. Algunos bronquiolos presentan necrosis de la mucosa, con una fuerte infiltración de neutrófilos, linfocitos,

macrófagos y un pequeño número de eosinófilos (Fig. 11, 12 y 13).

## **II.2.6.- NEUMONIA INTERSTICIAL BRONQUIOLITIS**

### **OBLITERANTE**

Presenta una incidencia del 6% dentro de nuestro estudio. Histológicamente el parénquima de este tipo de neumonía intersticial es semejante al de una NIU (fase II) con un grado variable de fibrosis septal.

Por ello, nuestra atención se centra en la descripción de la bronquiolitis obliterante. Dentro de los distintos animales hemos observado una infiltración discreta de células redondas en el epitelio y lámina propia de los bronquiolos. La luz de estos presentaba dos imágenes diferentes dependiendo de la antigüedad del proceso.

Una fase inicial caracterizada por tapones constituidos por moco, linfocitos y células epiteliales descamadas.

Por otro lado, cuando el proceso localizado en la luz de los bronquiolos avanza, y existen lesiones más severas en el epitelio, se observa una masa más organizada, como consecuencia de la migración de fibroblastos o células semejantes, desde la lámina propia de la mucosa bronquial, así como macrófagos y células endoteliales al exudado localizado en el lumen.

Primero las células fibroblásticas rodean a la masa central, y después aparecen aisladas en su interior; esta estructura intraluminal queda adherida a la lámina

propia del bronquiolo, produciendo la obstrucción total o parcial de esta porción respiratoria (Fig. 14 y 15).

### II.2.7.- NEUMONIA INTERSTICIAL USUAL

---

Es el tipo de neumonía que se presenta con mayor incidencia (68%). Para su mejor comprensión, hemos dividido esta entidad en tres fases, las cuales pueden observarse a la vez dentro del mismo animal; sin embargo, a veces, existe un predominio de alguna de ellas sobre el resto.

#### N.I.U. FASE I

---

Se aprecia un líquido de color rosado con hematoxilina-eosina en algunos alveolos (edema alveolar), que tiende a organizarse (Fig. 16).

Se observan macrófagos septales activados que se localizan en el lumen alveolar.

La mayoría de los alveolos aparecen desnudos u ocasionalmente presentan neumocitos tipo II.

Es una etapa, caracterizada por la dilatación y proliferación de los capilares septales (Fig. 17), cuyas membranas basales aparece claramente teñida con la técnica de P.A.S.

No observamos lesiones en la porción conductora.

## N.I.U. FASE II

Desaparece la arquitectura propia del parénquima pulmonar. Las luces alveolares son reemplazadas en algunas zonas, por nuevos capilares de reciente formación (Fig. 18).

El exudado extravasado se organiza alrededor de los capilares y en las luces alveolares, dando lugar a membranas hialinas, caracterizadas por ser masas eosinófilas y acelulares con técnicas habituales, que rápidamente son invadidas por células con núcleo alargado y cromatina densa junto a otras de núcleo más claro y nucleolo evidente, ambas son de aspecto fibroblástico; estas células se organizan dentro de las masas hialinas, y quedan adheridas a los septos alveolares.

En ocasiones la organización intraluminal se aprecia como en casos anteriores y con carácter puntual, y otras veces se observan extensas fibrosis intraalveolares (Fig. 19 y 20).

Destacan pequeñas áreas de proliferación epitelial (neumocitos tipo II) con intentos de recubrir los alveolos desnudos (Fig. 21).

En esta fase son muy espectaculares las imágenes e hipertrófias e hiperplasias vasculares que denominamos áreas de angiogénesis y que se evidencian en zonas de septos alveolares afectadas con las lesiones descritas.

Las áreas enfisematosas se aprecian alrededor de las zonas descritas y sobre todo en localizaciones subpleurales.

### N.I.U. FASE III

Al confluír las masas fibróticas intraluminares y septales se forman amplias áreas de fibrosis pulmonar caracterizadas por una intensa proliferación de células fibroblásticas y un aumento en el depósito de proteínas de matriz extracelular (Fig. 22).

Estos hechos producen un engrosamiento de los septos alveolares, unido a pequeñas zonas enfisematosas adyacentes dan al pulmón la típica imagen de panal de abeja descrito en humana. En este caso los tipos celulares que predominan son fibroblastos, y un discreto infiltrado de células redondas (linfocitos y células plasmáticas) (Fig. 23).

Dentro de las masas fibróticas hay dos diferentes imágenes histológicas. En algunas zonas se observa un aumento en el número de fibroblastos jóvenes, con escasa cantidad de matriz extracelular, y en otras el número de fibroblastos es escaso con un predominio de matriz extracelular tipo colágeno, observándose en ambos casos un discreto infiltrado de células plasmáticas y linfocitos entre el tejido conjuntivo.

Algunas zonas de las masas fibróticas con intensa proliferación fibroblástica presentaban una matriz extracelular de aspecto mucoide, a diferencia del aspecto fibrilar típico del colágeno observado con tricrómico de Masson.

Asimismo visualizamos una clara proliferación de formaciones vasculares en áreas de crecimiento fibroblástico, mientras que estos neovasos aparecen más dispersos en las zonas de fibrosis marcada.

Hemos de destacar acúmulos de linfocitos semejantes a nódulos linfoides en el interior de estas masas compactas de tejido conjuntivo (Fig. 24).

En las áreas de evidente organización conjuntiva se aprecian hendiduras epiteliales, tapizadas por células cúbicas de núcleo claro, células planas con núcleo denso de aspecto endoteliforme y a veces se recubren de células ciliadas cúbicas o cilíndricas. Además de estos tipos celulares observamos unas células con núcleo redondeado y picnótico en disposición central, con halo claro alrededor, que recuerdan a células bronquiolares; estas imágenes descritas dan al parénquima un aspecto glandular, semejante a pulmones fetales e incluso en algunos animales, recuerdan a tumores pulmonares (Fig. 23).

Hay una marcada fibrosis peribronquial y peribronquiolar, muy semejante a la descrita anteriormente, con gran abundancia de vasos sanguíneos.

A nivel de los bronquios y bronquiolos existe una hiperreactividad de células secretoras, con hiperplasia tanto de células caliciformes como de glándulas bronquiales. Este fenómeno disminuye a medida que aumenta la fibrosis pulmonar, sobre todo pericanalicular. Observamos asimismo fibrosis perivasculares.

Finalmente comprobamos la existencia de una relación estadísticamente significativa ( $\text{Chi } X^2 = 25,495 - \text{GL} = 12 - \text{Probabilidad} = 0,0126$  menor o igual que  $0,05$ ) entre hallazgos histopatológicos y el aislamiento microbiológico.

Así del 39% de neumonías intersticiales con aislamiento negativo un 82% correspondió a las neumonías intersticiales usuales.

En lo referente al aislamiento microbiológico casi la totalidad de las neumonías intersticiales presentaron algún tipo de crecimiento salvo las neumonías intersticiales linfoides y eosinofílicas.

Muy importante de destacar es el crecimiento significativo obtenido en la mayoría de las neumonías bronquiolointersticiales (n=10), neumonías intersticiales descamativas (n=7), neumonías intersticiales de células gigantes (n=1) y neumonías intersticiales bronquitis obliterante (n=2).

Aunque no encontramos una relación significativamente estadística entre los distintos grupos histopatológicos y bacterianos, siempre hallamos crecimiento frente a *Streptococcus* sp. en las neumonías bronquiolo intersticiales y neumonías intersticiales descamativas.

### III.- ESTUDIO INMUNOCITOQUIMICO

Centraremos la atención en el estudio inmunocitoquímico de las proteínas de matriz extracelular y factores de crecimiento durante las neumonías equinas observadas en nuestro estudio histopatológico con técnicas habituales. El desarrollo de este apartado sería demasiado amplio, y en muchos casos incluso repetitivo, por ello para referirnos a nuestros hallazgos inmunocitoquímicos agruparemos los distintos procesos en tres categorías o fases, teniendo como referencia la deposición de las proteínas de matriz extracelular en el transcurso del fenómeno de fibrosis en las tres fases de la neumonía intersticial usual (NIU).

Así consideramos tres fases:

III.1.- **Fase inicial** En la cual podemos incluir las neumonías:

- \* intersticiales descamativas (NID),
- \* intersticiales usuales en fase I (NIU),
- \* intersticiales eosinofílicas (NIE),
- \* intersticiales de células gigantes (NICG),
- \* bronquiolointersticiales (NBI).

En todas ellas se aprecian fenómenos infiltrativo-exudativos.

III.2.- **Fase intermedia**, integrada por:

- \* neumonías intersticiales usuales en fase II (NIU),
- \* neumonías intersticiales linfoides (NIL),
- \* neumonías intersticiales con bronquiolitis obliterante (NIBO).

En conjunto se observa principalmente el desarrollo de fibrosis intraalveolar e interalveolar. Si las lesiones iniciales no son demasiado severas, no se desarrolla la fibrosis intraalveolar, progresando sólo a nivel del intersticio, así como alrededor de vasos, bronquios y bronquiolos.

III.3.- **Fase final**, caracterizada por fenómenos de fibrosis pulmonar total; se identifica con la fase III de la neumonía intersticial usual (NIU) y se caracteriza por la sustitución de amplias zonas del parénquima pulmonar por tejido conjuntivo. Las imágenes observadas se corresponden con el término inglés de "honeycomb" (panal de abeja).

Comenzaremos a describir las proteínas de matriz extracelular estudiadas y existentes en cada una de las fases anteriormente descritas, y que recogemos en las Tablas 22-25.

### **III.1.- FASE INICIAL**

#### **LAMININA Y COLAGENO TIPO IV**

Son las proteínas mayoritarias de la membrana basal. Ambas presentan el mismo patrón de inmunotinción extracelular. Este modelo es muy uniforme siguiendo el contorno de las membranas basales de las distintas estructuras de la arquitectura pulmonar. Por ello nos referiremos indistintamente a cualquiera de las dos. Sin embargo, en algunas ocasiones tuvimos problemas con reactividad de la laminina, incluso después del tratamiento enzimático.

Esta fase se caracteriza por un proceso infiltrativo-exudativo. El septo alveolar aparece engrosado por el edema, el infiltrado de células inflamatorias (linfocitos, histiocitos y células plasmáticas) y la proliferación de células de aspecto fibroblástico. Estas paredes son recorridas por unas membranas, semejantes a bandas longitudinales irregulares, fuertemente positivas a laminina y colágeno tipo IV. Entre estas bandas se observan algunos capilares septales. En determinadas áreas se aprecian densos nidos de membranas discontinuas, que confluyen en algunos puntos, donde encontramos células de aspecto fibroblástico. Estas zonas presentan una mayor inmunotinción frente a ambas proteínas extracelulares.

Observamos en el perfil de la luz alveolar, una fuerte expresión frente a

colágeno tipo IV, y en menor intensidad a laminina; en ocasiones apreciamos algunas zonas con una fuerte positividad lineal, la cual aparece discontinua y fragmentada frente a laminina y colágeno tipo IV, formando auténticos nidos de membranas basales.

Las fibras musculares lisas tanto de los vasos sanguíneos como de los músculos de Reissensen, presentan una positividad difusa, en contraste con la tinción nítida que se observa en los pulmones normales equinos (Fig. 25).

### **FIBRONECTINA**

Hemos observado que la positividad lineal en las membranas basales del septo a laminina y colágeno tipo IV, aparecen desdibujadas. Sin embargo la inmunoreacción a la fibronectina en esta fase, se presenta como una complicada y entramada red, que parece constituir el armazón pulmonar.

La fibronectina se expresa en el contorno de las fibras musculares lisas de vasos y porción conductora, así como en fibroblastos y membranas basales de capilares, siendo más difusa en el citoplasma de los macrófagos.

Existen unas masas que rodean a los capilares, y que a veces los separa dentro del septo alveolar, que se muestra fuertemente positiva frente a esta proteína.

Acúmulos extracelulares subepiteliales de esta proteína, aparecen en los bronquios y bronquiolos, justo por encima de las fibras musculares lisas. Además hemos observado pequeñas áreas perivasculares fuertemente positivas.

Las masas intraluminales que se organizan en esta fase (membranas hialinas) presentan una marcada positividad frente a la fibronectina con un aspecto más o menos fibrilar, y forma concéntrica en la luz alveolar.

Las membranas basales donde asientan las áreas de reepitelización aparecen fuertemente teñidos con este anticuerpo, siendo más intenso en algunos acúmulos puntuales de dichas membranas (Fig. 26).

### **COLAGENO TIPO III**

Existe también una clara disminución de positividad en relación al pulmón equino normal.

El tejido conjuntivo que rodea a los bronquios, bronquiolos y grandes vasos, aparece fuertemente teñido frente al colágeno tipo III, observándose como progresa la reacción hacia los septos alveolares más cercanos.

Algunas placas intraluminares aparecen ligeramente teñidas, sobre todo en aquellas que existe en ellas una proliferación fibroblástica.

En las áreas de angiogénesis se visualiza un discreto entramado fibrilar positivo, que rodea los capilares y ocupa el septo alveolar. Esta positividad del tabique alveolar es más evidente en los alveolos adyacentes a vasos, bronquios y bronquiolos.

En esta etapa podemos apreciar una mayor inmunopositividad del pulmón de los équidos, frente al colágeno tipo III que al tipo I (Fig. 27).

### **COLAGENO TIPO I**

Desde un punto de vista cualitativo, la cantidad de colágeno tipo I que se tiñe con estos métodos inmunocitoquímicos es mucho menor, que el observado en el pulmón de équido normal, sin embargo, se mantiene la misma distribución.

Pequeñas cantidades de colágeno tipo I aparecen positivas, rodeando a los capilares y en forma puntual en el septo alveolar.

Las áreas de tejido conjuntivo peribronquial y peribronquiolar, presentan inmunotinción frente al procolágeno tipo I.

Algunas regiones del parénquima presentan paredes alveolares y masas intraluminares organizadas con expresión a este tipo de colágeno (Fig. 28).

### **PDGF**

Durante esta fase inicial hemos observado una positividad heterogénea entre las distintas poblaciones de macrofágos que observábamos a nivel luminal. Así apreciamos células que expresaron una fuerte positividad frente a la proteína PDGF, a diferencia de otras con una débil o incluso nula expresión.

El epitelio bronquiolar, y en menor medida bronquial, presentó algunas células basales con una fuerte inmunofluorescencia frente al PDGF, más marcada a nivel del polo apical de la célula (Fig. 29 y 30).

**TGF  $\beta$** 

La única reacción observada se presentó en bronquiolos. La reacción se observó de forma aislada en células epiteliales bronquiolares, situadas preferentemente en la capa más externa del epitelio (Fig. 31).

### **III.2. - FASE INTERMEDIA**

#### **LAMININA Y COLAGENO TIPO IV**

Histológicamente observamos que las áreas de angiogénesis, alrededor de los capilares del tabique interalveolar, presentan una fuerte inmunotinción frente a laminina y colágeno tipo IV.

Apreciamos una marcada tinción frente a ambas proteínas, que rodea la membrana plasmática de las fibras musculares lisas, en vasos de mediano calibre, bronquios y bronquiolos.

Existen unas masas de aspecto amorfo y acelular, alrededor de los capilares septales, rodeadas por una pequeña membrana positiva a estas proteínas; frecuentemente esta inmunorreacción pericelular corresponde con las prolongaciones citoplásmicas de células de morfología alargada y núcleo oval central, semejantes a fibroblastos (Fig. 32 y 33).

#### **FIBRONECTINA**

Se observa positividad frente a la fibronectina, que dibuja el contorno del septo y define el perfil de los capilares alveolares, sobre todo en las áreas de angiogénesis; sin embargo existe una inmunorreacción muy intensa en masas adyacentes a los

capilares alveolares que adoptan formas diversas.

Asimismo esta proteína extracelular aparece fuertemente positiva en la matriz que rodea vasos, bronquios y bronquiolos; los límites de la membrana plasmática de las fibras musculares lisas de vasos de mediano y gran calibre, así como el músculo de Reissensen aparecen con una inmunotinción muy marcada.

Las masas intraluminares que observamos en estadios iniciales, aparecen muy organizadas y adheridas a la pared. Estas estructuras presentan una inmunoreacción marcada frente a la fibronectina, la cual no se observa en los citoplasmas de las células fibroblásticas que lo componen, apreciándose un halo negativo entre el núcleo y la matriz que rodea a la membrana plasmática de estas células.

La pleura aparece engrosada y presenta un positividad de aspecto fibrilar (Fig. 34).

### **COLAGENO TIPO III**

Se observa un depósito positivo frente al colágeno tipo III alrededor de los capilares que se extiende al resto de la pared infiltrandola y separando estos vasos del lumen alveolar. Como consecuencia de esta infiltración de colágeno tipo III, aumenta la distancia alveolo/capilar.

En el lumen alveolar, las masas que aparecían positivas a la fibronectina, se mostraron intensamente teñidas frente a este tipo de colágeno.

El tejido conjuntivo que rodea los vasos, bronquios y bronquiolos tiene una

expresión poco intensa de colágeno tipo III.

La pleura aparece engrosada y positiva frente a este tipo de colágeno.

Consideramos que durante esta fase la reacción frente a este procolágeno es máxima (Fig. 35).

### **COLAGENO TIPO I**

Presenta el mismo patrón de inmunotinción que el colágeno tipo III aunque la inmunopositividad es menor desde un punto de vista cuantitativo, si bien observamos que es más fuerte y puntual en las paredes alveolares.

Es importante destacar, que las masas intraluminales organizadas con fuerte proliferación de células fibroblásticas y débil reacción al colágeno tipo III, son discretamente positivas (Fig. 36).

### **PDGF**

En áreas de fibrosis intraluminal la reacción frente a este factor de crecimiento se presenta en el citoplasma de células fibroblásticas que proliferan en dichas masas fibróticas, adosadas al septo alveolar.

Asimismo existe un aumento en el número de células del epitelio sobre todo bronquiolar que expresan esta proteína a nivel del citoplasma, más marcado a nivel del polo apical (Fig. 37 y 38).

**TGF  $\beta$** 

Existe un aumento del número de células epiteliales bronquiolares que presentan positividad frente al TGF  $\beta$ , semejante al que se produce frente al PDGF, pero menos significativo (Fig. 39).

### **III.3.- FASE FINAL**

#### **LAMININA Y COLAGENO TIPO IV**

---

En las áreas de fibrosis, se observa una total negatividad a estas proteínas de matriz, con la excepción de las membranas de los neocapilares y de las hendiduras vasculares, que disminuyen a manera que aumenta dicha fibrosis (fig. 40).

#### **FIBRONECTINA**

El aumento de la positividad a la fibronectina observado en estadios previos a nivel del septo, disminuye paulatinamente en fases más avanzadas, quedando reducida al tejido conjuntivo que rodea grandes vasos, bronquios y bronquiolos, así como en las fibras musculares lisas que componen las estructuras anteriores.

En la pared alveolar quedan pequeñas reacciones focales frente a este anticuerpo; que en algunos casos se hace más patente en áreas de proliferación vascular.

Las zonas con marcada desorganización arquitectural, con sustitución del parénquima pulmonar por extensas masas de tejido conjuntivo presentan una inmunorreacción difusa de fibronectina, que forma en estas áreas, una complicada malla de aspecto fibrilar (Fig. 41 y 42).

### **COLAGENO TIPO III**

A medida que avanza el proceso de fibrosis hacia la imagen de "pulmón en panal" ("honeycomb"), se observa que la positividad frente al colágeno tipo III, desaparece, quedando reducida a pequeñas zonas en: pleura, septo interlobulillar, matriz que rodea vasos, bronquios y bronquiolos.

Las estructuras organizadas a nivel intraluminal aparecen adheridas al septo alveolar, y presentan una débil expresión de inmunotinción frente al procolágeno tipo III.

Existen unas áreas extensas de tejido conjuntivo que sustituyen al parénquima con una marcada proliferación fibroblástica, y es en estos lugares donde se aprecia una fuerte inmunorreacción frente a esta proteína fibrilar. Las áreas de matriz que han sustituido al parénquima pulmonar en estos animales, aparecen por tanto positivas al colágeno tipo III. Sin embargo el comportamiento en esta fibrosis pulmonar no es homogéneo. Así encontramos:

- \* Areas con una reacción menos intensa en zonas ricas en matriz, y escaso número de fibrocitos (fibroblastos viejos).
- \* Zonas de abundante proliferación fibroblástica (fibroblastos jóvenes), en las que la matriz aparece fuertemente positiva.
- \* Imágenes con proliferación fibroblástica y matriz de aspecto mucoide negativa.

En las dos últimas áreas podemos apreciar el citoplasma de los fibroblastos fuertemente positivos frente a este procolágeno tipo III, sobre todo más evidente en

el último caso donde contrasta la positividad citoplásmica de color marrón frente al color azul-violeta de la hematoxilina de la matriz extracelular (Fig. 43, 44 y 45).

### **COLAGENO TIPO I**

---

Al igual que hemos descrito en la fase anterior, a medida que aumenta la cantidad de tejido conjuntivo en el parénquima pulmonar, se hace más evidente la intensidad y cantidad de colágeno tipo I. Sin embargo al igual que comentamos anteriormente existen unas áreas que presentan negatividad a nivel de la matriz extracelular, observándose una positividad intracelular evidente frente al procolágeno tipo I en los fibroblastos que proliferan.

El patrón del colágeno tipo I es semejante al colágeno tipo III en las tres modalidades de fibrosis expuestas anteriormente (Fig. 44 y 45).

### **PDGF**

Existe un espectacular aumento en el número de células que expresan PDGF a nivel citoplasmático. Además encontramos una positividad difusa en este período en las fibras musculares lisas del músculo de Reissensen.

El modelo de tinción con inmunofluorescencia que presenta el PDGF, se asemeja a lo descrito en los colágenos tipo I y III, y así encontramos:

\* Areas ricas en matriz y algunos fibrocitos: tienen positividad algunas células y la matriz es negativa.

\* Zonas de abundantes fibroblastos jóvenes y escasa matriz. La positividad celular es espectacular.

\* Imágenes con pocos fibroblastos positivos y matriz de aspecto mucoide y negativa.

También encontramos una marcada positividad en epitelios bronquiales hiperplasiados (Fig. 46, 47, 48 y 49).

### **TGF $\beta$**

En contraposición a las otras dos etapas, es durante esta fase cuando hallamos la máxima expresión frente a TGF  $\beta$ ; sin embargo, nunca alcanza la fuerte positividad que hemos observado durante las tres etapas con PDGF.

La máxima fluorescencia se aprecia a nivel del epitelio bronquiolar, con una fuerte hiperplasia. Algunas células expresan una intensa reacción en el citoplasma, tanto en las zonas marginales como en los polos basal y apical, extendiéndose desde la membrana basal hasta el lumen bronquiolar y que contrasta con la negatividad del núcleo.

En las masas fibróticas encontramos una discreta inmunofluorescencia en el citoplasma de algunos fibroblastos, manteniéndose esta positividad incluso en zonas de abundante matriz extracelular; sin embargo esta reacción desaparece en las áreas de fibrosis madura con escasez de células fibroblásticas (Fig. 50).

## **TABLAS E ICONOGRAFIA**

---

**TABLA 3.- IDENTIFICACION DE LOS ANIMALES.**

<b>Nº ANIMALES</b>	<b>SEXO</b>	<b>EDAD</b>
E - 1	HEMBRA	8 AÑOS
E - 2	HEMBRA	4 AÑOS
E - 3	MACHO	6 AÑOS
E - 4	HEMBRA	5 AÑOS
E - 5	HEMBRA	40 MESES
E - 6	HEMBRA	30 MESES
E - 7	HEMBRA	18 MESES
E - 8	HEMBRA	8 AÑOS
E - 9	MACHO	18 MESES
E - 10	HEMBRA	30 MESES
E - 11	MACHO	8 AÑOS
E - 12	MACHO	20 MESES
E - 13	MACHO	15 AÑOS
E - 14	MACHO	2 AÑOS
E - 15	HEMBRA	30 MESES
E - 16	HEMBRA	7 AÑOS
E - 17	HEMBRA	9 AÑOS
E - 18	HEMBRA	11 AÑOS
E - 19	MACHO	2 AÑOS
E - 20	HEMBRA	22 AÑOS
E - 21	HEMBRA	20 MESES
E - 22	HEMBRA	3 AÑOS
E - 23	MACHO	12 AÑOS
E - 24	HEMBRA	17 AÑOS
E - 25	HEMBRA	12 AÑOS

**TABLA 4.- IDENTIFICACION DE LOS ANIMALES.**

<b>Nº ANIMALES</b>	<b>SEXO</b>	<b>EDAD</b>
E - 26	MACHO	2 AÑOS
E - 27	HEMBRA	20 MESES
E - 28	HEMBRA	15 AÑOS
E - 29	HEMBRA	6 AÑOS
E - 30	HEMBRA	3 AÑOS
E - 31	HEMBRA	7 AÑOS
E - 32	HEMBRA	10 AÑOS
E - 33	HEMBRA	3 AÑOS
E - 34	HEMBRA	17 AÑOS
E - 35	HEMBRA	23 AÑOS
E - 36	HEMBRA	17 AÑOS
E - 37	HEMBRA	20 AÑOS
E - 38	HEMBRA	13 AÑOS
E - 39	HEMBRA	18 AÑOS
E - 40	HEMBRA	16 AÑOS
E - 41	MACHO	8 AÑOS
E - 42	HEMBRA	5 AÑOS
E - 43	MACHO	20 AÑOS
E - 44	HEMBRA	8 AÑOS
E - 45	HEMBRA	2 AÑOS
E - 46	HEMBRA	7 AÑOS
E - 47	HEMBRA	3 AÑOS
E - 48	MACHO	7 AÑOS
E - 49	MACHO	8 AÑOS
E - 50	HEMBRA	2 AÑOS

**TABLA 5.- IDENTIFICACION DE LOS ANIMALES.**

<b>Nº ANIMALES</b>	<b>SEXO</b>	<b>EDAD</b>
E - 51	MACHO	9 AÑOS
E - 52	HEMBRA	7 AÑOS
E - 53	MACHO	14 AÑOS
E - 54	HEMBRA	6 AÑOS
E - 55	HEMBRA	14 AÑOS
E - 56	HEMBRA	10 AÑOS
E - 57	HEMBRA	19 AÑOS
E - 58	HEMBRA	15 AÑOS
E - 59	MACHO	30 MESES
E - 60	HEMBRA	15 AÑOS
E - 61	MACHO	7 AÑOS
E - 62	HEMBRA	3 AÑOS
E - 63	HEMBRA	2 AÑOS
E - 64	HEMBRA	20 MESES
E - 65	HEMBRA	9 AÑOS
E - 66	HEMBRA	15 AÑOS
E - 67	MACHO	3 AÑOS
E - 68	MACHO	2 AÑOS
E - 69	HEMBRA	20 AÑOS
E - 70	MACHO	5 AÑOS
E - 71	HEMBRA	2 AÑOS
E - 72	HEMBRA	12 AÑOS
E - 73	HEMBRA	13 AÑOS
E - 74	MACHO	2 AÑOS
E - 75	HEMBRA	17 AÑOS

**TABLA 6.- IDENTIFICACION DE LOS ANIMALES.**

<b>Nº ANIMALES</b>	<b>SEXO</b>	<b>EDAD</b>
E - 76	HEMBRA	3 AÑOS
E - 77	HEMBRA	20 MESES
E - 78	HEMBRA	2 AÑOS
E - 79	HEMBRA	4 AÑOS
E - 80	HEMBRA	3 AÑOS
E - 81	HEMBRA	30 MESES
E - 82	HEMBRA	8 AÑOS
E - 83	HEMBRA	9 AÑOS
E - 84	HEMBRA	12 AÑOS
E - 85	HEMBRA	4 AÑOS
E - 86	MACHO	40 MESES
E - 87	HEMBRA	15 AÑOS
E - 88	MACHO	14 AÑOS
E - 89	MACHO	4 AÑOS
E - 90	HEMBRA	25 AÑOS
E - 91	HEMBRA	12 AÑOS
E - 92	HEMBRA	3 AÑOS
E - 93	HEMBRA	14 AÑOS
E - 94	HEMBRA	40 MESES
E - 95	HEMBRA	2 AÑOS
E - 96	MACHO	3 AÑOS
E - 97	HEMBRA	20 AÑOS
E - 98	HEMBRA	2 AÑOS
E - 99	HEMBRA	15 AÑOS
E - 100	HEMBRA	18 MESES

**TABLA 7. - AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO EN PULMON EQUINO.**

CULTIVO MICROBIOLÓGICO	NUMERO DE ANIMALES									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NEGATIVO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
ACTINOBACILLUS EQUULI										
BACILLUS sp.										
CORYNEBACTERIUM						+	+			
E. COLI									+++	
K. PNEUMONIE										
K. OXYTOCA										
LEV. Tª AMBIEM.										
LEV. Tª 37°C										
PROVIDENCIA										
PSEUDOMONAS sp.									++	
STAPHYLOCOCCUS		+	+++	+	+++			++		
STREPTOCOCCUS ZOOEPIDIDIMUS										+++
STREPTOCOCCUS α HEMOLITICO										
STREPTOCOCCUS GRUPO C			++							

**TABLA 8. - AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO EN PULMON EQUINO.**

CULTIVO MICROBIOLÓGICO	NUMERO DE ANIMALES									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
NEGATIVO	NO	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI	NO	SI
ACTINOBACILLUS EQUULI										
BACILLUS sp.		+								
CORYNEBACTERIUM										
E. COLI	++									
K. PNEUMONIE		+								
K. OXYTOCA										
LEV. Tª AMBIEM.		+								
LEV. Tª 37°C										
PROVIDENCIA										
PSEUDOMONAS sp.										
STAPHYLOCOCCUS	+									
STREPTOCOCCUS ZOOEPIDIDIMUS									+++	
STREPTOCOCCUS α HEMOLITICO	+									
STREPTOCOCCUS GRUPO C										

Escasamente significativo (+), Medianamente significativo (++), Significativo (+++).

**TABLA 9. - AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO EN PULMON EQUINO.**

NUMERO DE ANIMALES

CULTIVO MICROBIOLÓGICO	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
NEGATIVO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
ACTINOBACILLUS EQUULI										
BACILLUS sp.										
CORYNEBACTERIUM										
E. COLI										
K. PNEUMONIE										
K. OXYTOCA										
LEV. Tª AMBIEM.				+	+					+
LEV. Tª 37°C				+						
PROVIDENCIA										
PSEUDOMONAS sp.										
STAPHYLOCOCCUS										
STREPTOCOCCUS ZOOEPIDIDIMUS	++	+++				+++	+++			
STREPTOCOCCUS α HEMOLITICO								++		
STREPTOCOCCUS GRUPO C									+++	

**TABLA 10. - AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO EN PULMON EQUINO.**

NUMERO DE ANIMALES

CULTIVO MICROBIOLÓGICO	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
NEGATIVO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO
ACTINOBACILLUS EQUULI										
BACILLUS sp.										
CORYNEBACTERIUM										
E. COLI										
K. PNEUMONIE										
K. OXYTOCA										
LEV. Tª AMBIEM.	+									
LEV. Tª 37°C										
PROVIDENCIA										
PSEUDOMONAS sp.										
STAPHYLOCOCCUS	+									
STREPTOCOCCUS ZOOEPIDIDIMUS										
STREPTOCOCCUS α HEMOLITICO	+							+++		+
STREPTOCOCCUS GRUPO C									+++	

**TABLA 11. - AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO EN PULMON EQUINO.**

CULTIVO MICROBIOLÓGICO	NUMERO DE ANIMALES									
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
NEGATIVO	SI	NO	SI	SI	NO	NO	SI	SI	NO	NO
ACTINOBACILLUS EQUULI		+++								
BACILLUS sp.										
CORYNEBACTERIUM										
E. COLI										
K. PNEUMONIE										
K. OXYTOCA										
LEV. Tª AMBIEM.					++					
LEV. Tª 37°C										
PROVIDENCIA										
PSEUDOMONAS sp.									++	
STAPHYLOCOCCUS										
STREPTOCOCCUS ZOOEPIDIDIMUS										
STREPTOCOCCUS α HEMOLITICO					++					
STREPTOCOCCUS GRUPO C						+++			+++	++

**TABLA 12. - AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO EN PULMON EQUINO.**

CULTIVO MICROBIOLÓGICO	NUMERO DE ANIMALES									
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
NEGATIVO	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	SI	SI
ACTINOBACILLUS EQUULI										
BACILLUS sp.										
CORYNEBACTERIUM										
E. COLI										
K. PNEUMONIE										
K. OXYTOCA										
LEV. Tª AMBIEM.										
LEV. Tª 37°C										
PROVIDENCIA										
PSEUDOMONAS sp.										
STAPHYLOCOCCUS								++		
STREPTOCOCCUS ZOOEPIDIDIMUS										
STREPTOCOCCUS α HEMOLITICO										
STREPTOCOCCUS GRUPO C										

TABLA 13. - AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO EN PULMON EQUINO.

## NUMERO DE ANIMALES

CULTIVO MICROBIOLÓGICO	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
NEGATIVO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
ACTINOBACILLUS EQUULI					+++	++				
BACILLUS sp.			++							
CORYNEBACTERIUM				++						
E. COLI										
K. PNEUMONIE										
K. OXYTOCA									++	
LEV. Tª AMBIEM.				+	+					
LEV. Tª 37°C						++				
PROVIDENCIA										+++
PSEUDOMONAS sp.							++	+++		
STAPHYLOCOCCUS					++		++			
STREPTOCOCCUS ZOOEPIDIDIMUS	++								+++	
STREPTOCOCCUS α HEMOLITICO										
STREPTOCOCCUS GRUPO C										

TABLA 14. - AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO EN PULMON EQUINO.

## NUMERO DE ANIMALES

CULTIVO MICROBIOLÓGICO	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
NEGATIVO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
ACTINOBACILLUS EQUULI										
BACILLUS sp.										
CORYNEBACTERIUM										
E. COLI										
K. PNEUMONIE					++					
K. OXYTOCA										
LEV. Tª AMBIEM.										
LEV. Tª 37°C										
PROVIDENCIA										
PSEUDOMONAS sp.							+++	++		
STAPHYLOCOCCUS				+						
STREPTOCOCCUS ZOOEPIDIDIMUS										
STREPTOCOCCUS α HEMOLITICO					++	+++			+	
STREPTOCOCCUS GRUPO C	+	++								

**TABLA 15. - AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO EN PULMON EQUINO.**

CULTIVO MICROBIOLÓGICO	NUMERO DE ANIMALES									
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
NEGATIVO	NO	NO	SI	SI	NO	NO	SI	NO	SI	SI
ACTINOBACILLUS EQUULI										
BACILLUS sp.										
CORYNEBACTERIUM	++					++				
E. COLI					++					
K. PNEUMONIE					+++					
K. OXYTOCA										
LEV. Tª AMBIEM.					+					
LEV. Tª 37°C										
PROVIDENCIA										
PSEUDOMONAS sp.								++		
STAPHYLOCOCCUS										
STREPTOCOCCUS ZOOEPIDIDIMUS		+++								
STREPTOCOCCUS α HEMOLITICO								++		
STREPTOCOCCUS GRUPO C										

**TABLA 16. - AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO EN PULMON EQUINO.**

CULTIVO MICROBIOLÓGICO	NUMERO DE ANIMALES									
	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
NEGATIVO	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
ACTINOBACILLUS EQUULI								++		
BACILLUS sp.										
CORYNEBACTERIUM										
E. COLI									+++	
K. PNEUMONIE							+++			+++
K. OXYTOCA				++						
LEV. Tª AMBIEM.										
LEV. Tª 37°C									+++	
PROVIDENCIA										
PSEUDOMONAS sp.						+++		++		+++
STAPHYLOCOCCUS										
STREPTOCOCCUS ZOOEPIDIDIMUS					+++					
STREPTOCOCCUS α HEMOLITICO				++			++			
STREPTOCOCCUS GRUPO C										++

**TABLA 17 .- INCIDENCIA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS SOBRE EL NUMERO TOTAL DE ANIMALES. GRUPO DE EQUIDOS CON CRECIMIENTO SIGNIFICATIVO.**

ORGANISMO AISLADO	Nº ANIMALES CTO SIGN.	INCIDENCIA SOBRE GRUPO CON CTO SIGN. (n=50)	INCIDENCIA Nº TOTAL ANIMALES (n=100)
	Nº ANIMALES CT NO SIGN.		
STREPTOC.	29	29/50	35
	6		
STAPHYLOC.	6	6/50	11
	5		
BACILLUS	1	1/50	2
	1		
PROVIDENC.	1	1/50	1
	0		
PSEUDOMONA	10	10/50	10
	0		
E. COLI	4	4/50	4
	0		
KLEBSIELLA	6	6/50	7
	1		
ACTINOB. EQUULI	4	4/50	4
	0		
LEVADURAS	11	11/50	12
	1		
CORYNEBACT	2	2/50	4
	2		

**TABLA 18.- RESULTADOS ANATOMOPATOLOGICOS (MACROSCOPICOS E HISTOLOGICOS) Y MICROBIOLOGICOS.**

NUMERO ANIMAL	DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLIGO	AISLAMIENTO MICROBIOLOGICO	DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO
1	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U
2	TIPO B	NO SIGNIFICAT.	N.I.U.
3	TIPO C	SIGNIFICATIVO	N.I.D.
4	TIPO B	NO SIGNIFICAT.	N.I.U.
5	TIPO C	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
6	TIPO B	NO SIGNIFICAT.	N.I.D.
7	TIPO B	NO SIGNIFICAT.	N.I.L.
8	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.D.
9	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U
10	TIPO C	SIGNIFICATIVO	B.I.
11	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
12	TIPO A	NO SIGNIFICAT.	N.I.E.
13	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
14	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
15	TIPO B	NEGATIVO	N.I.L.
16	TIPO C	NO SIGNIFICAT.	N.I.U.
17	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U
18	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U
19	TIPO A	SIGNIFICATIVO	B.I.
20	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
21	TIPO A	SIGNIFICATIVO	B.I.
22	TIPO A	SIGNIFICATIVO	B.I.
23	TIPO B	NEGATIVO	N.I.L.
24	TIPO C	NO SIGNIFICAT.	N.I.U.
25	TIPO C	NO SIGNIFICAT.	N.I.U.

**TABLA 19.- RESULTADOS ANATOMOPATOLOGICOS (MACROSCOPICOS E HISTOLOGICOS) Y MICROBIOLOGICOS.**

<b>NUMERO ANIMAL</b>	<b>DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLIGO</b>	<b>AISLAMIENTO MICROBIOLOGICO</b>	<b>DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO</b>
26	TIPO A	SIGNIFICATIVO	B.I.
27	TIPO A	SIGNIFICATIVO	B.I.
28	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
29	TIPO A	SIGNIFICATIVO	N.I.L.
30	TIPO B	NO SIGNIFICAT.	N.I.U.
31	TIPO B	NO SIGNIFICAT.	N.I.U.
32	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
33	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
34	TIPO B	NEGATIVO	N.I.E.
35	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
36	TIPO B	NEGATIVO	N.I.C.G.
37	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
38	TIPO C	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
39	TIPO A	SIGNIFICATIVO	B.I.
40	TIPO C	NO SIGNIFICAT.	N.I.U.
41	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
42	TIPO A	SIGNIFICATIVO	N.I.D.
43	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
44	TIPO A	NEGATIVO	N.I.U.
45	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
46	TIPO A	SIGNIFICATIVO	N.I.D.
47	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
48	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
49	TIPO A	SIGNIFICATIVO	B.I.
50	TIPO C	SIGNIFICATIVO	N.I.U.

**TABLA 20.- RESULTADOS ANATOMOPATOLOGICOS (MACROSCOPICOS E HISTOLOGICOS) Y MICROBIOLOGICOS.**

<b>NUMERO ANIMAL</b>	<b>DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLIGO</b>	<b> AISLAMIENTO MICROBIOLOGICO</b>	<b>DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO</b>
51	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
52	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
53	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
54	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
55	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
56	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
57	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
58	TIPO C	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
59	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
60	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
61	TIPO A	SIGNIFICATIVO	N.I.B.O.
62	TIPO B	NEGATIVO	N.I.L.
63	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
64	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
65	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.B.O
66	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
67	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
68	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
69	TIPO C	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
70	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U
71	TIPO B	NO SIGNIFICAT.	N.I.U
72	TIPO C	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
73	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
74	TIPO B	NO SIGNIFICAT.	N.I.U.
75	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.C.G.

**TABLA 21.- RESULTADOS ANATOMOPATOLOGICOS (MACROSCOPICOS E HISTOLOGICOS) Y MICROBIOLOGICOS.**

<b>NUMERO ANIMAL</b>	<b>DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLIGO</b>	<b>AISLAMIENTO MICROBIOLOGICO</b>	<b>DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO</b>
76	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.D.
77	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
78	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.L.
79	TIPO C	NO SIGNIFICAT.	N.I.U.
80	TIPO B	NEGATIVO	N.I.B.O.
81	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
82	TIPO A	SIGNIFICATIVO	B.I.
83	TIPO B	NEGATIVO	N.I.B.O.
84	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
85	TIPO A	SIGNIFICATIVO	B.I.
86	TIPO C	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
87	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
88	TIPO C	SIGNIFICATIVO	N.I.D.
89	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
90	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
91	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
92	TIPO B	NEGATIVO	N.I.U.
93	TIPO C	NEGATIVO	N.I.U.
94	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.B.O.
95	TIPO A	SIGNIFICATIVO	N.I.D.
96	TIPO A	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
97	TIPO C	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
98	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
99	TIPO C	SIGNIFICATIVO	N.I.U.
100	TIPO B	SIGNIFICATIVO	N.I.U.

**TABLA 22.- POSITIVIDAD EXTRACELULAR FRENTE AL COLAGENO TIPO IV Y LAMININA DURANTE LA NEUMONIA INTERSTICIAL CRONICA EQUINA.**

	MEMBRANA BASAL CAPILARES	MEMBRANA BASAL EPITELIO	
FASE INICIAL	+++	+1	+++2
FASE INTERMEDIA	+++3	+	++4
FASE FINAL	+++5		
	SEPTO ALVEOLAR	LUMEN ALVEOLAR	

- (1) Lineal y discontinua.
- (2) Formación de nidos de membrana basal.
- (3) Areas de angiogenesis.
- (4) Superficie de la membrana plasmática de células fibroblásticas.
- (5) Durante la fase final las masas fibróticas ocupan ambos compartimentos.

**TABLA 23.- POSITIVIDAD FRENTE A FIBRONECTINA DURANTE LA NEUMONIA INTERSTICIAL CRONICA EQUINA.**

	EXTRACELULAR		INTRACELULAR
	SEPTO ALVEOLAR	LUMEN ALVEOLAR	MACROFAGOS (Citoplasma)
FASE INICIAL	+++1	+++2	+++
FASE INTERMEDIA	+++3	++4	++
FASE FINAL	++5		-

- (1) Lineal.
- (2) Trama o red.
- (3) En masas perivasculares y septo alveolar.
- (4) Masas intraalveolares.
- (5) Las masas fibróticas ocupan ambos compartimentos. Se observa una positividad difusa en áreas de proliferación celular, formando un entramado en zonas de fuerte colagenización.

(+++) Inmunorreacción fuertemente positiva; (++) Positiva; (+) Ligeramente positiva; (-) Ausencia de reacción.

**TABLA 24.- REACCION FRENTE AL COLAGENO TIPO III Y TIPO I EN LAS NEUMONIAS INTERSTICIALES CRONICAS EQUINAS.**

	COLAGENO TIPO III			COLAGENO TIPO I		
	F.I.	F.INT.	F.F.	F.I.	F.INT.	F.F.
PERIVASCULAR	+	++ +	++	-/+	+ / ++	+++
PERIBRONQUIAL/PE RIBRONQUIOLAR	+	++	++	+	++	+++
SEPTO ALVEOLAR	-/+	++ +	++*	-/+	+	+++*
LUMEN ALVEOLAR	-	++		-	+ / ++	

(\*) Durante la fase final ambos compartimentos estan ocupados por una fibrosis masiva.  
F.I. = FASE INICIAL; F.INT. = FASE INTERMEDIA; F.F. = FASE FINAL.

**TABLA 25.- INMUNORREACCION DEL COLAGENO TIPO III Y TIPO I EN LAS DIFERENTES AREAS ESTABLECIDAS DURANTE LA FASE FINAL DE LAS NEUMONIAS INTERSTICIALES CRONICAS EQUINAS.**

		FASE FINAL	
		COLAGENO TIPO III	COLAGENO TIPO I
AREAS FUERTE PROLIFERACION CELULAR	M.E. <sup>1</sup>	-	-/+
	F.B. <sup>2</sup>	++	-/+, ++
AREAS DEPOSITO DE MATRIZ Y PROLIFERACION CELULAR MEDIA	M.E. <sup>1</sup>	+ / ++	++
	F.B. <sup>2</sup>	++	++
ZONAS DE MAXIMA COLAGENIZACION	M.E. <sup>1</sup>	+ / ++	+++
	F.B. <sup>2</sup>	+	+ / ++

(1) M.E. = matriz extracelular. (2) F.B. = fibroblastos. Positividad citoplasmática.

(+++ ) Inmunorreacción fuertemente positiva; (++) Positiva;  
(+) Ligeramente positiva; (-) Ausencia de reacción.

**TABLA 26.- POSITIVIDAD DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS EN LAS DISTINTAS FASES DE LA FIBROSIS PULMONAR EQUINA.**

		FASE INICIAL	FASE INTERMEDIA	FASE FINAL
<b>FIBRAS MUSCULARES LISAS</b>		-	-	+
<b>MACROFAGOS ALVEOLARES</b>		+ / + +	- / +	-
<b>FIBROBLASTOS*</b>	<b>MASAS INTRALUMINARES</b>	-	+ / + +	
	<b>SEPTO ALVEOLAR</b>	-	- / +	++ +
<b>CELULAS* EPITELIALES</b>	<b>BRONQUIOS</b>	- / +	+ / + +	++
	<b>BRONQUIOLOS</b>	+	++	++ +

(\*) La inmunofluorescencia frente al PDGF fue citoplasmática.

(+ + +) Inmunorreacción fuertemente positiva; (+ +) Positiva;  
(+) Ligeramente positiva; (-) Ausencia de reacción.

**TABLA 27.- POSITIVIDAD DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE  $\beta$  EN LAS DISTINTAS ETAPAS DE FIBROSIS PULMONAR EQUINA.**

		FASE INICIAL	FASE INTERMEDIA	FASE FINAL
CELULAS* EPITELIALES	BRONQUIOS	-	-/+	+
	BRONQUIOLOS	-/+	+	++
FIBROBLASTOS*	MASAS INTRALUMINARES	-	+ / + +	+ + +
	SEPTO ALVEOLAR	-	-/+	

(\*) La inmunofluorescencia frente al TGF  $\beta$  fue citoplasmática.

(+ + +) Inmunorreacción fuertemente positiva; (+ +) Positiva;  
(+) Ligeramente positiva; (-) Ausencia de reacción.

# EDAD DE LOS ANIMALES

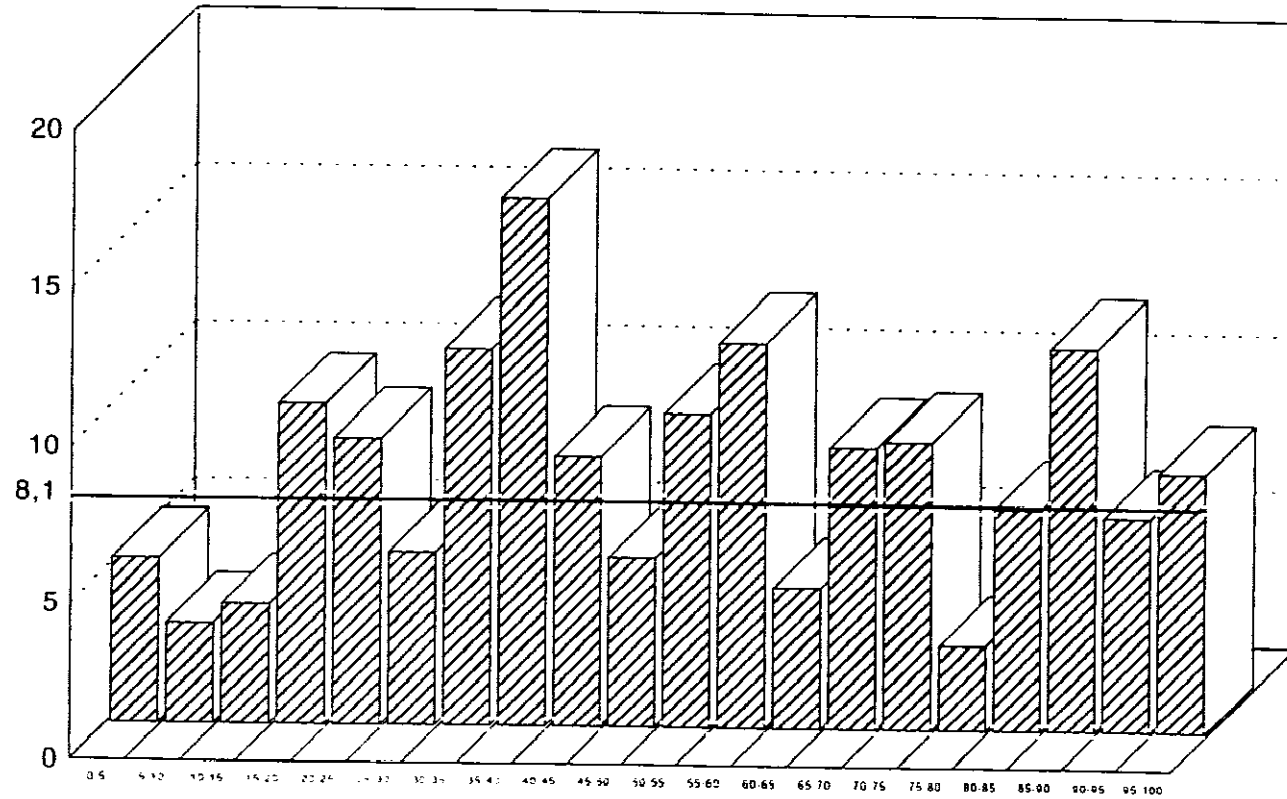


GRAFICO 1

# DISTRIBUCION DE SEXOS EN LOS ANIMALES

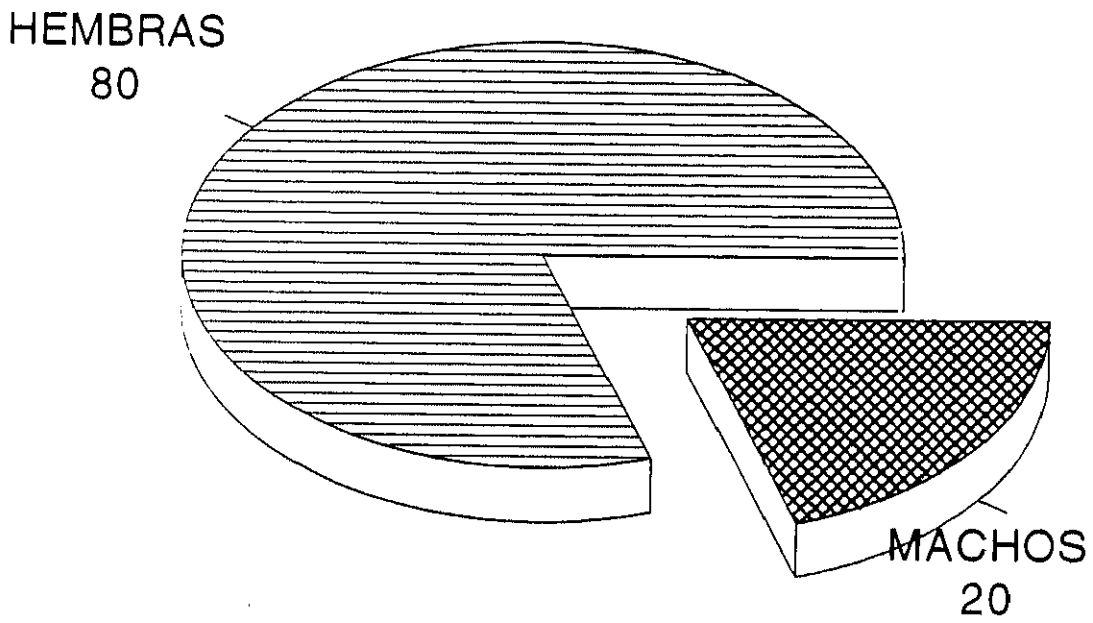
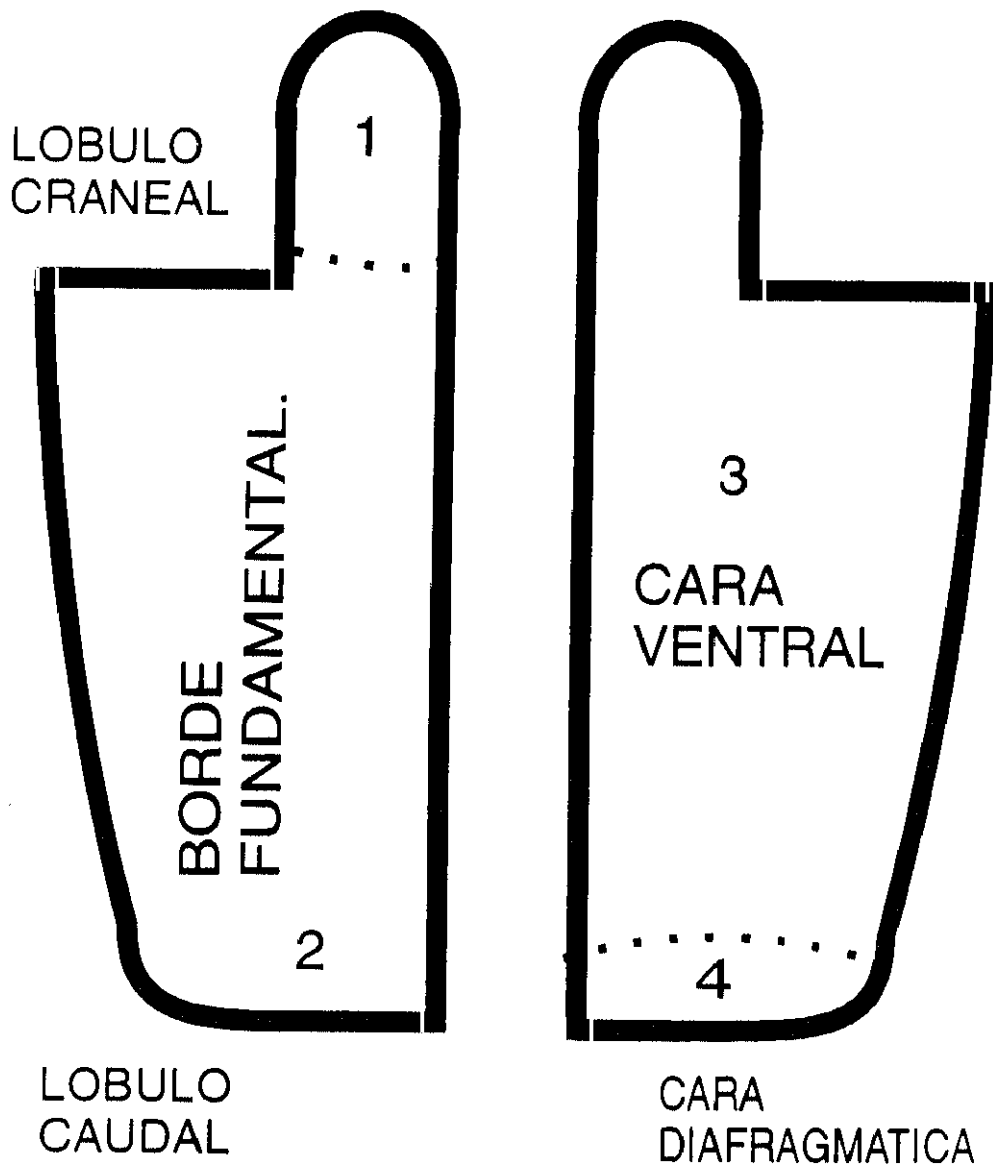


GRAFICO 2

**GRAFICO 3**  
**ANATOMIA DEL PULMON**  
**EQUINO**

VISTA  
DORSAL

VISTA  
VENTRAL



# INCIDENCIA MICROBIOLÓGICA EN LOS PULMONES EQUINOS

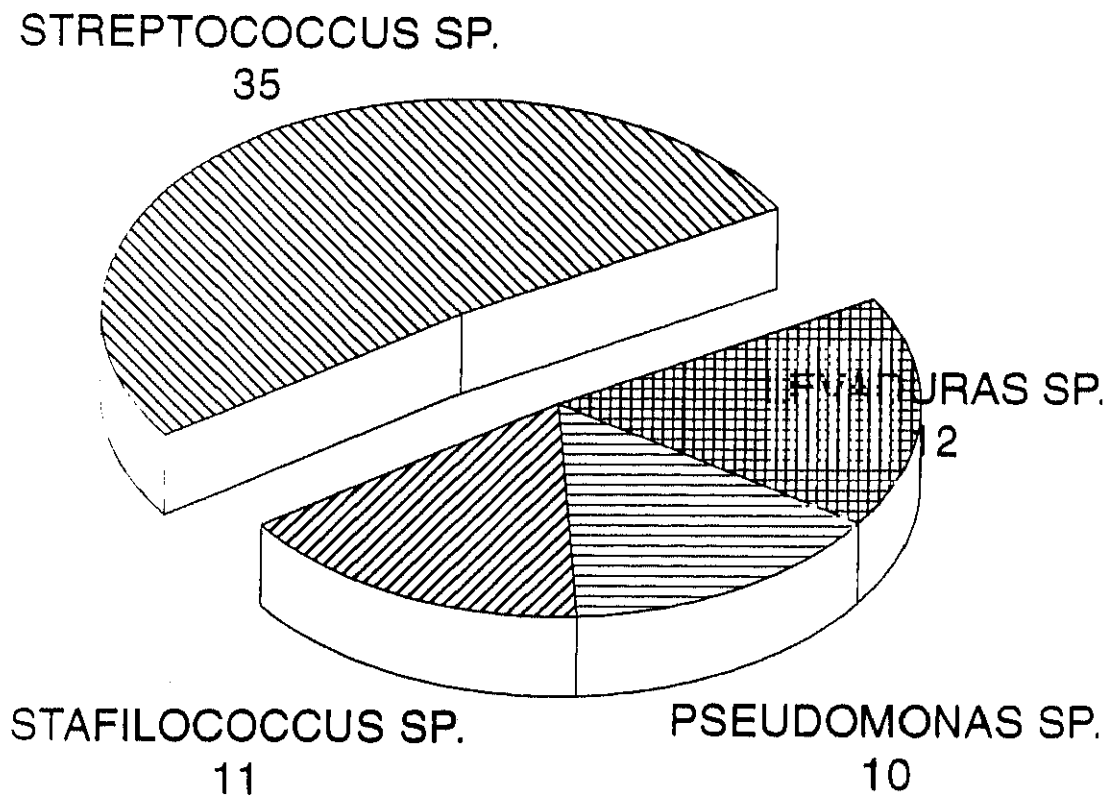


GRAFICO 4

# VALORACION VIROLOGICA DE LOS EQUIDOS

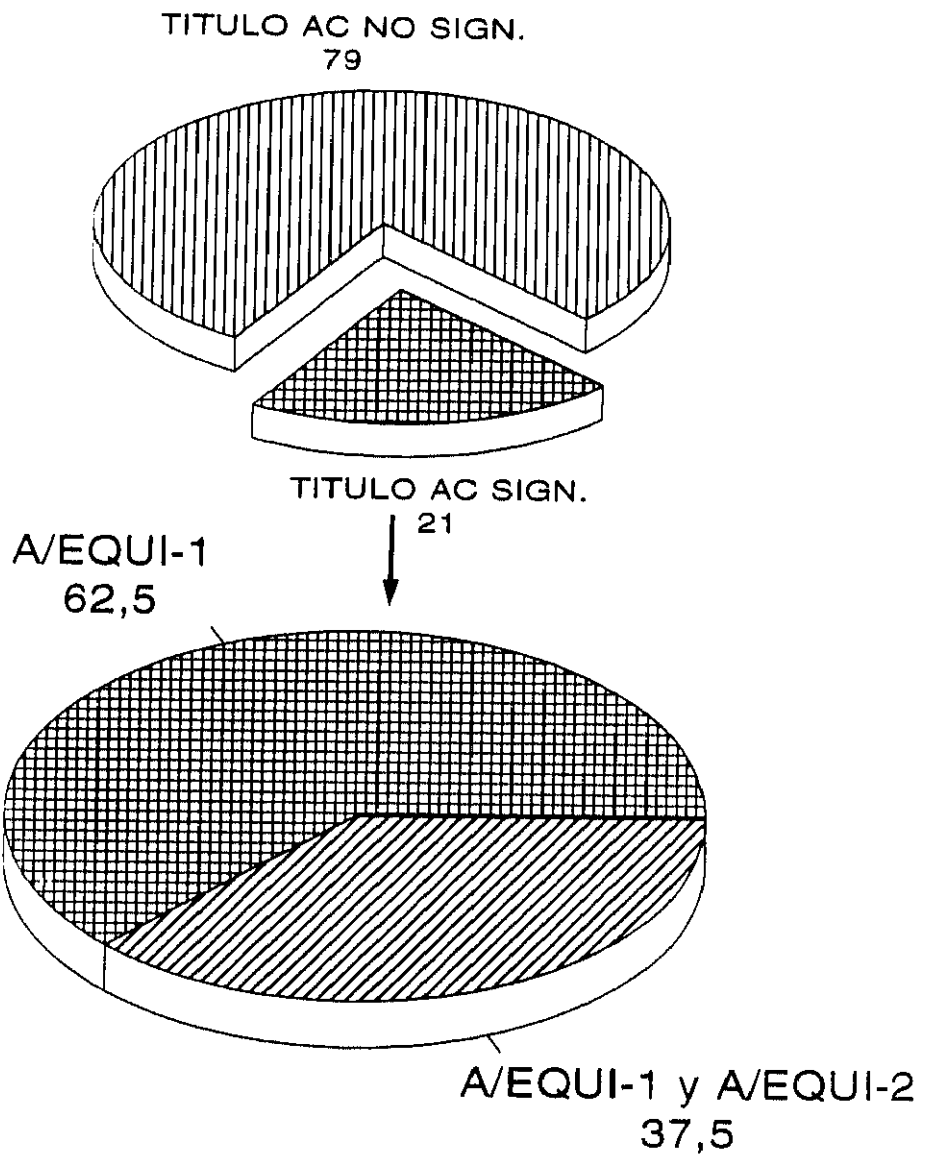


GRAFICO 5

# RESULTADOS MACROSCOPICOS DE LOS PULMONES EQUINOS

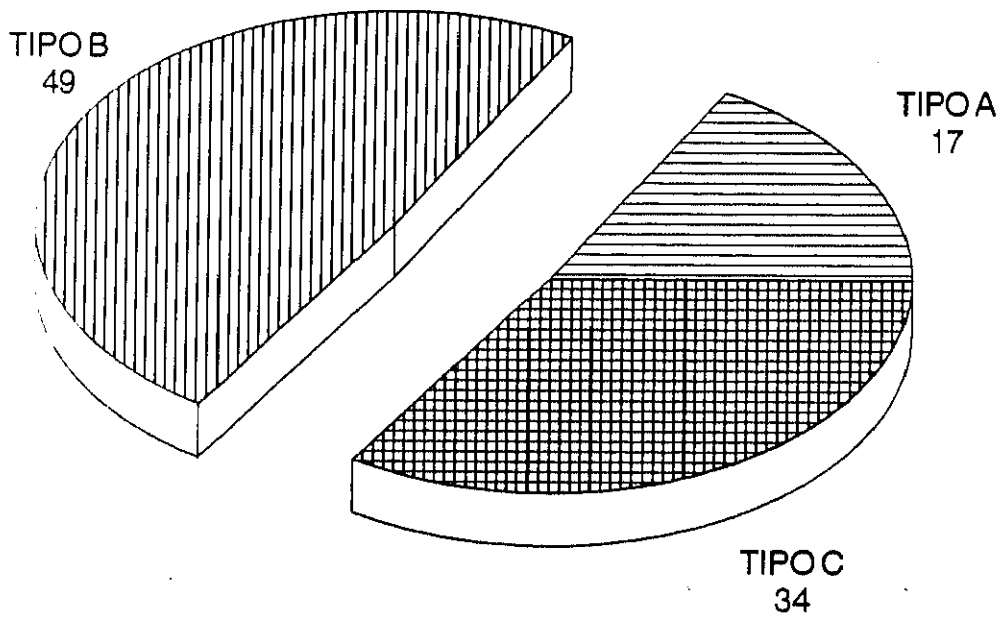


GRAFICO 6

# RESULTADOS HISTOPATOLOGICOS DE LOS PULMONES EQUINOS

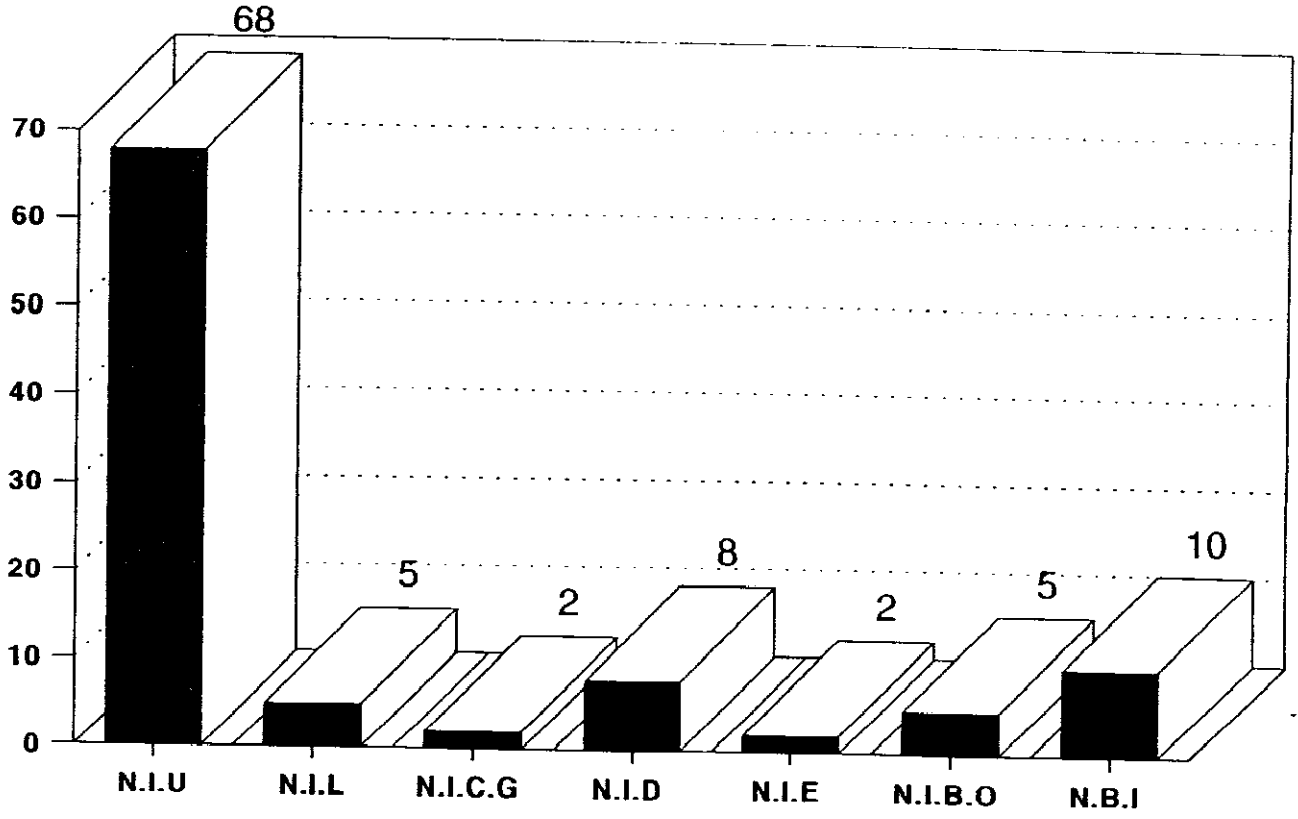


GRAFICO 7

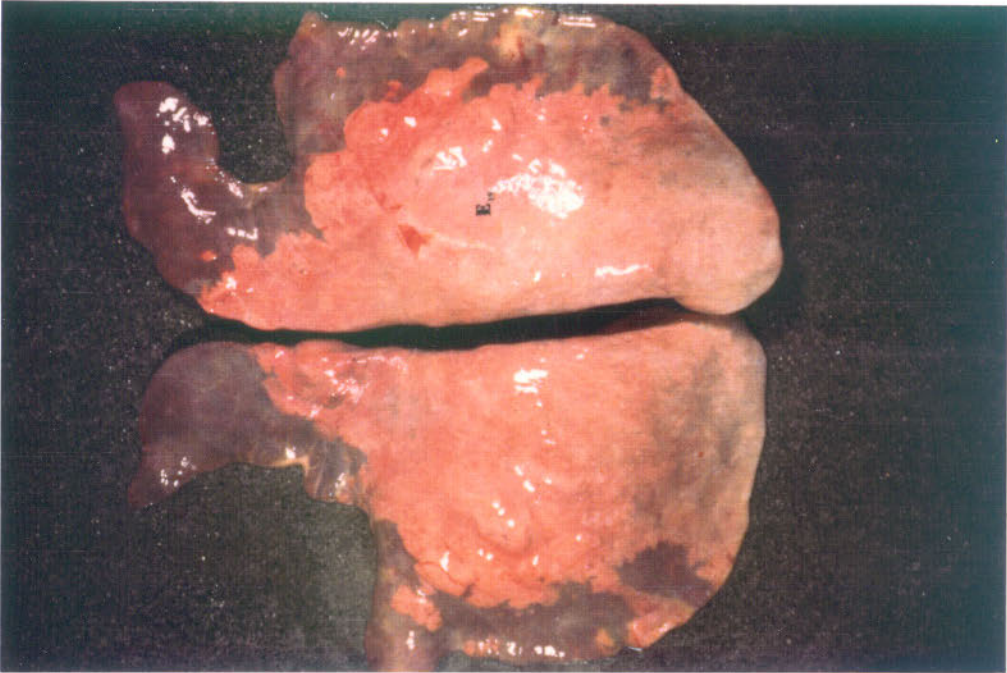


Fig. 1.- Pulmones tipo A. Vista dorsal.

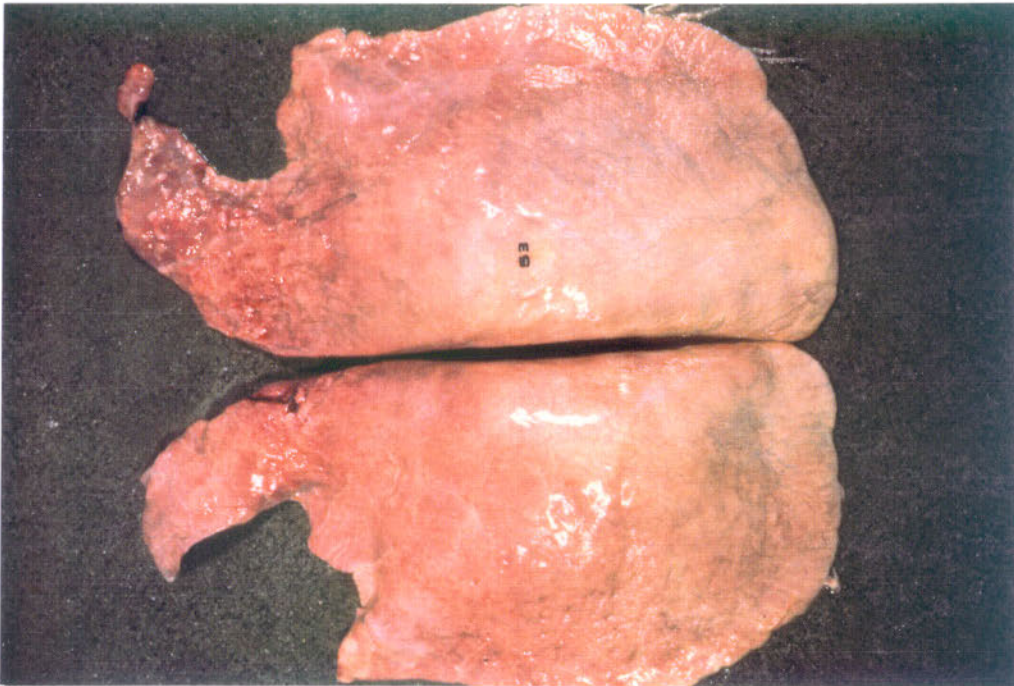


Fig. 2.- Pulmones tipo B. Vista dorsal.

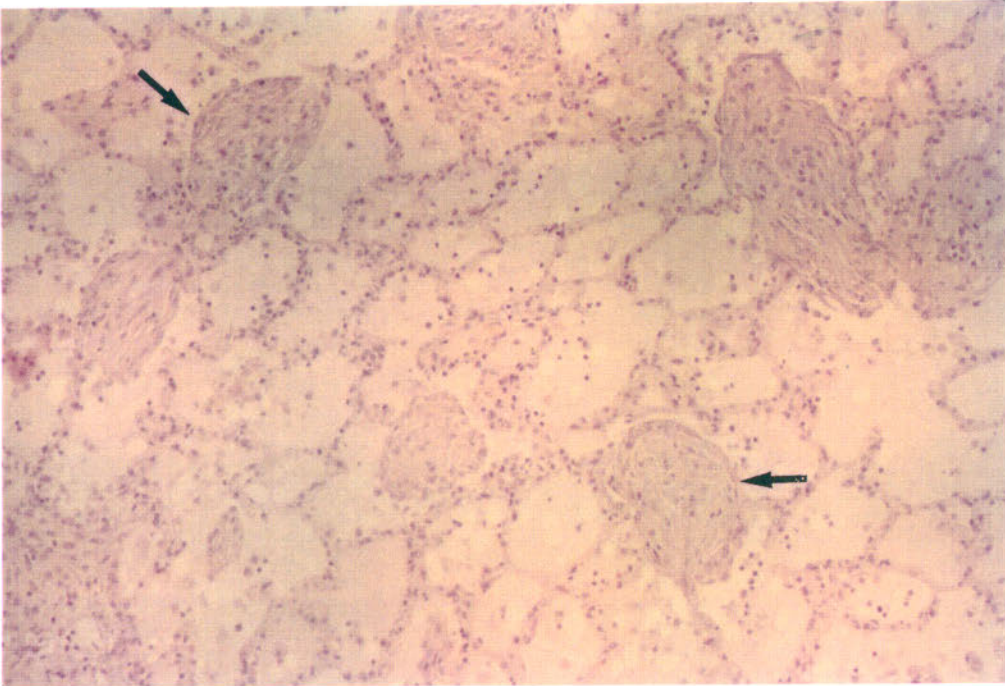


Fig. 19.- Neumonía intersticial usual (N.I.U.). Fase intermedia. Masas fibróticas intraalveolares focales(†). H&E x 150.

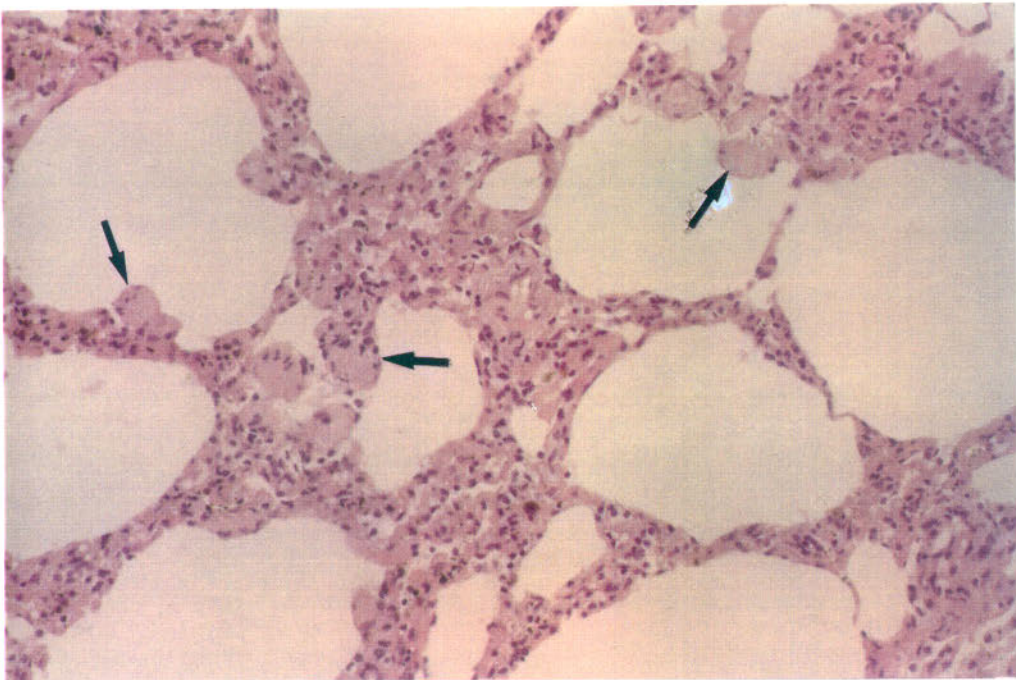
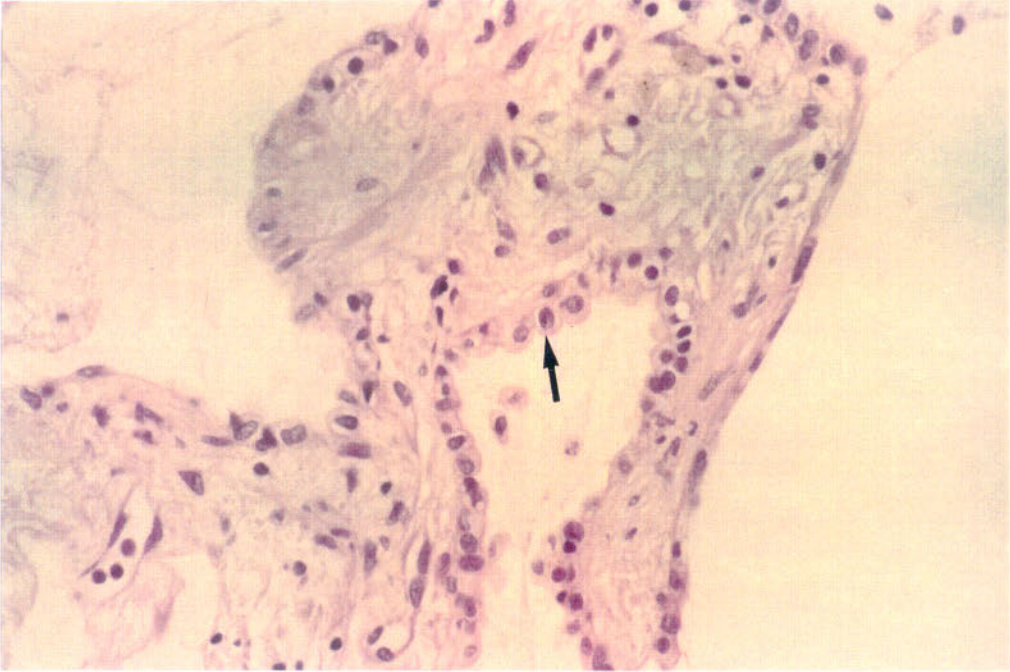
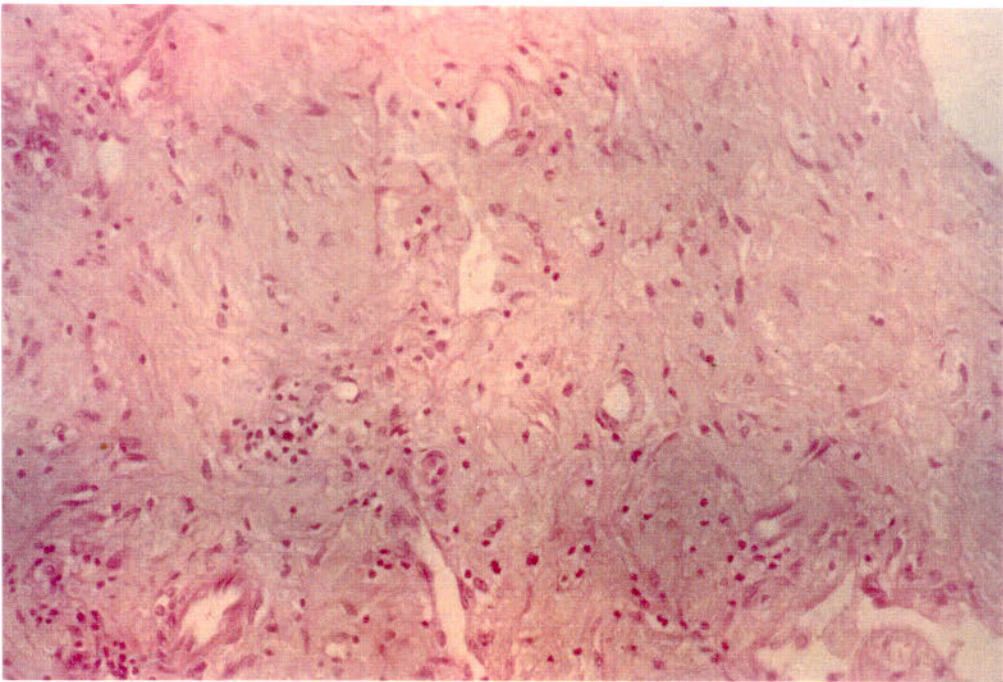


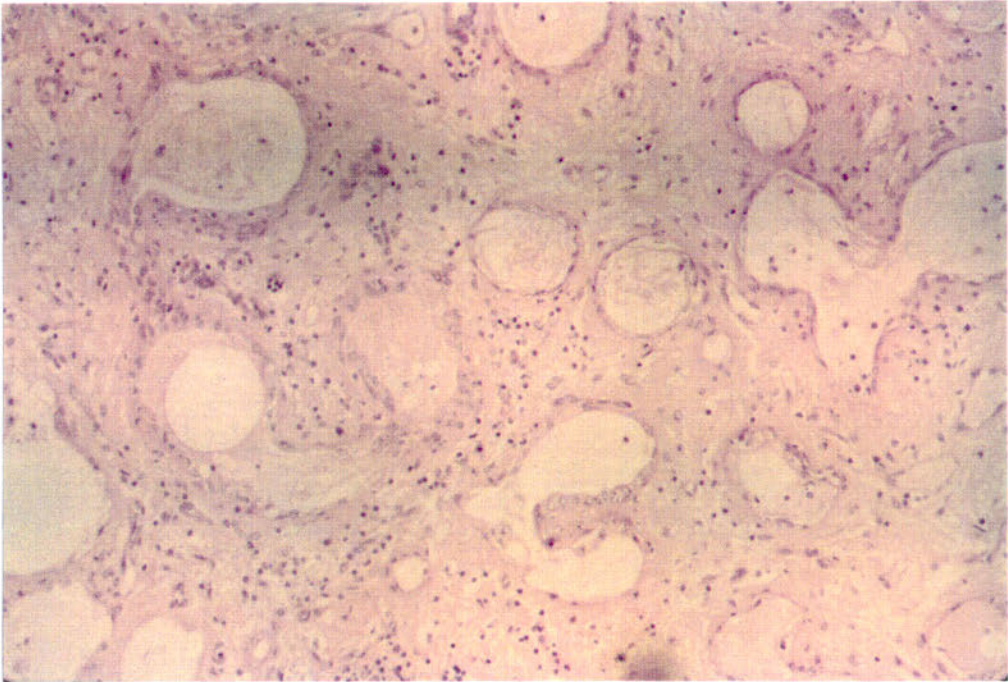
Fig. 20.- Neumonía intersticial usual (N.I.U.). Fase intermedia. Masas de fibrosis intraalveolares adheridas al septo (†). H&E x 198.



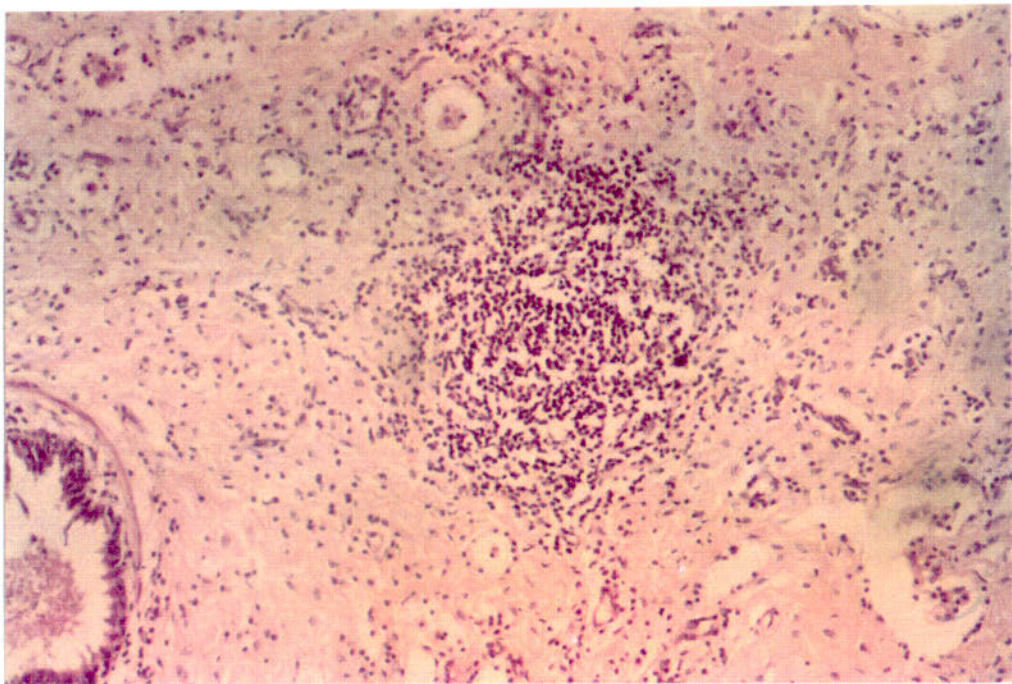
**Fig. 21.-** Neumonía intersticial usual (N.I.U.). Fase intermedia. Reepitelización en áreas fibróticas (f). H&E x 300.



**Fig. 22.-** Neumonía intersticial usual (N.I.U.). Fase final. Reorganización conjuntiva. Fibrosis masiva que sustituye al parénquima pulmonar. H&E x 185.



**Fig. 23.-** Neumonía intersticial usual (N.I.U.). Fase final. Pulmón con aspecto de panal de abeja (honeycomb). H&E x 150.



**Fig. 24.-** Neumonía intersticial usual (N.I.U.). Fase final. Formación linfoide en el interior de áreas de fibrosis madura. H&E x 185.

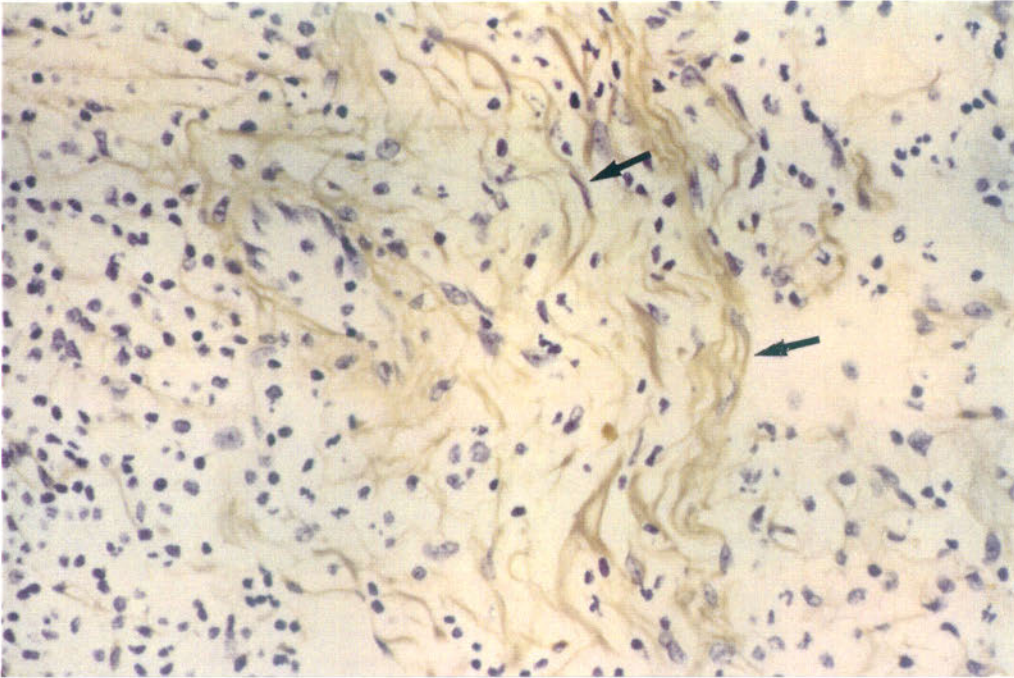


Fig. 25.- P.A.P. anticolágeno tipo IV. Fase inicial. Nidos de membranas basales en luz y septo alveolar (f). x 198.

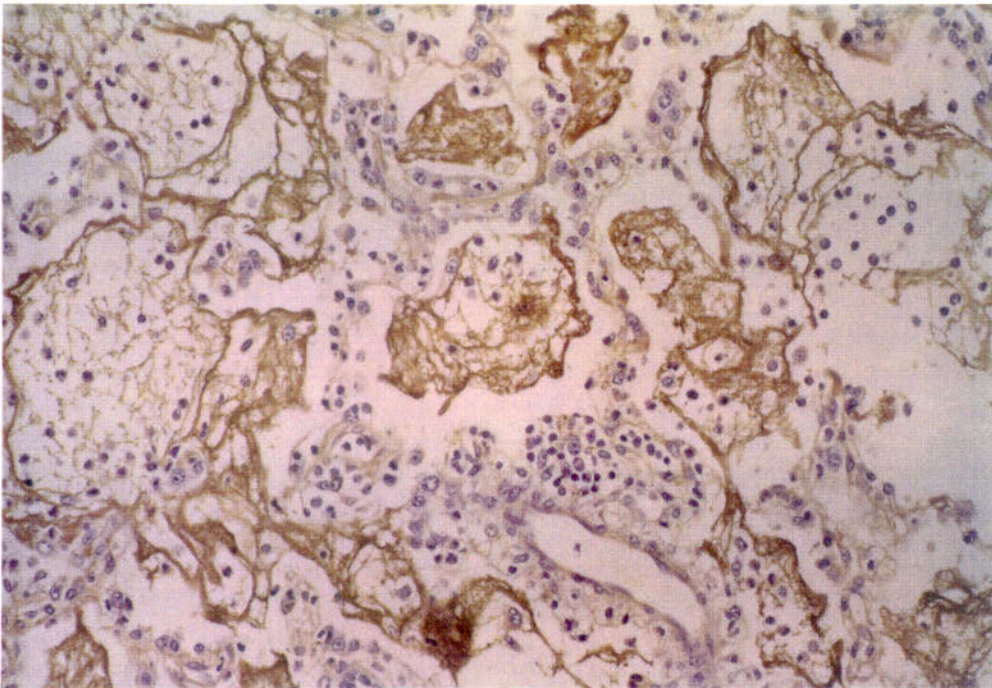


Fig. 26.- P.A.P. antifibronectina. Fase inicial. Formaciones intraluminares de aspecto fibrilar fuertemente positivas. x 150.

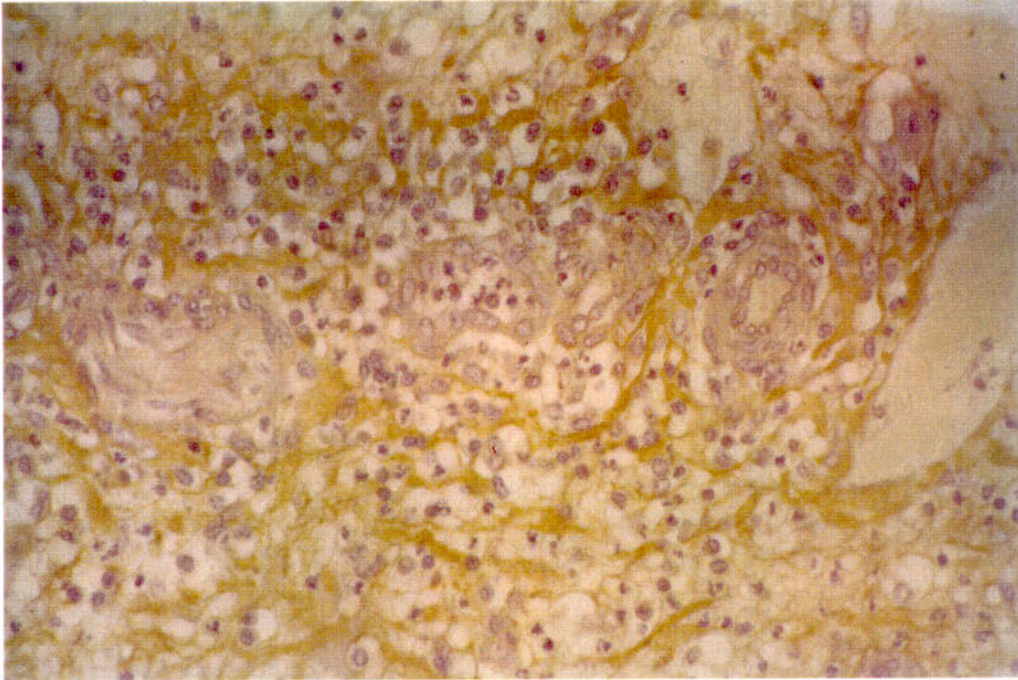


Fig. 27.- P.A.P. anticólageno tipo III. Fase inicial. Fuerte inmunorreacción alrededor de las estructuras vasculares. x 240.

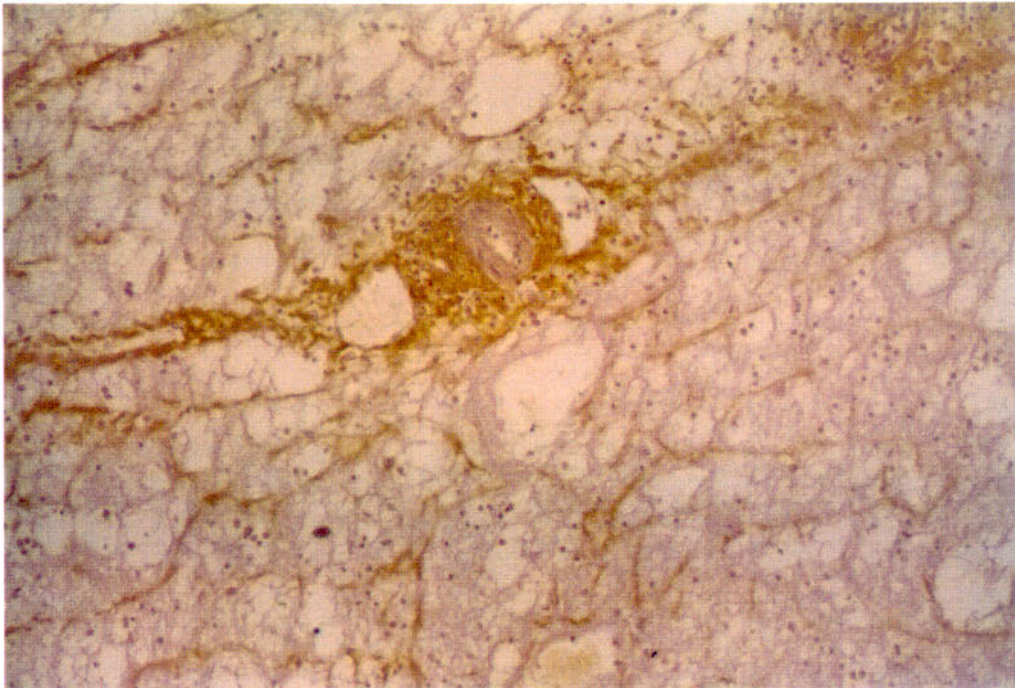


Fig. 28.- P.A.P. anticólageno tipo I. Fase inicial. Discreta positividad de la matriz extracelular septal, que comienza alrededor de los vasos. x 150.

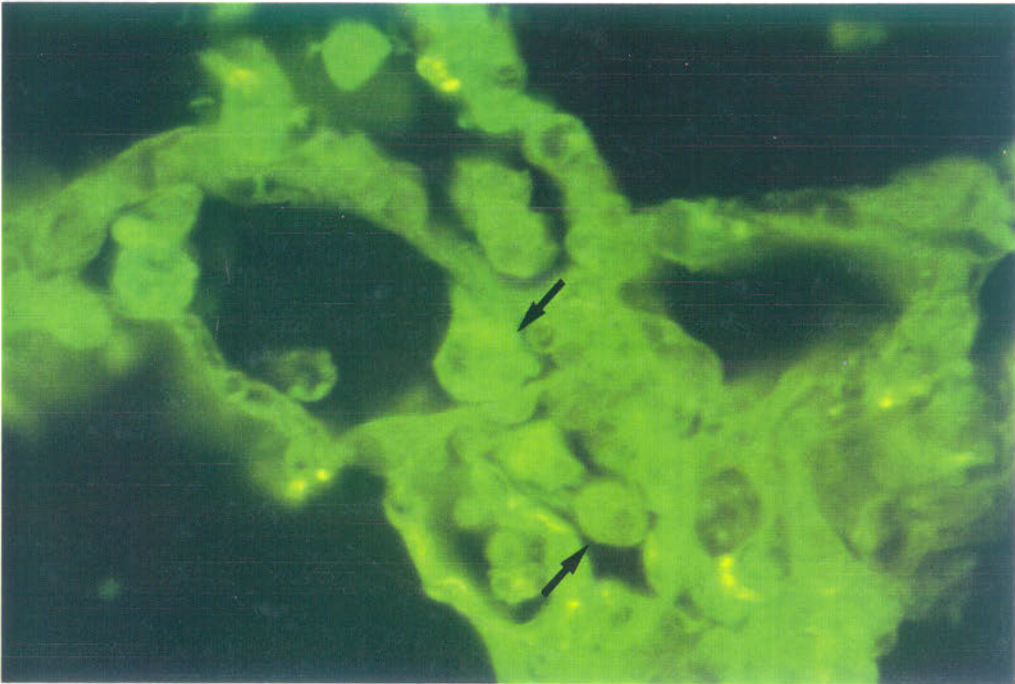


Fig. 29.- I.F.I. antiPDGF. Fase inicial. Positividad heterogénea de los macrófagos (†). x 1875.



Fig. 30.- I.F.I. antiPDGF. Fase inicial. Positividad en las células epiteliales basales del bronquiolo (A). x 470.

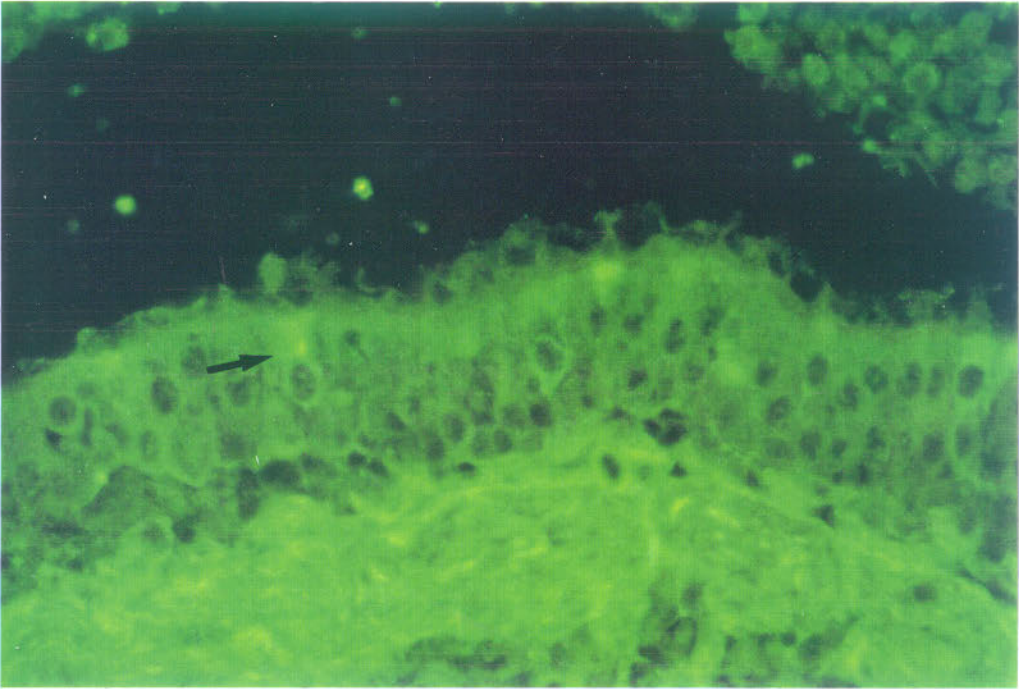


Fig. 31.- I.F.I. antiTGF  $\beta$ . Fase inicial. Escaso número de células positivas en el epitelio bronquiolar (\*). x 750.

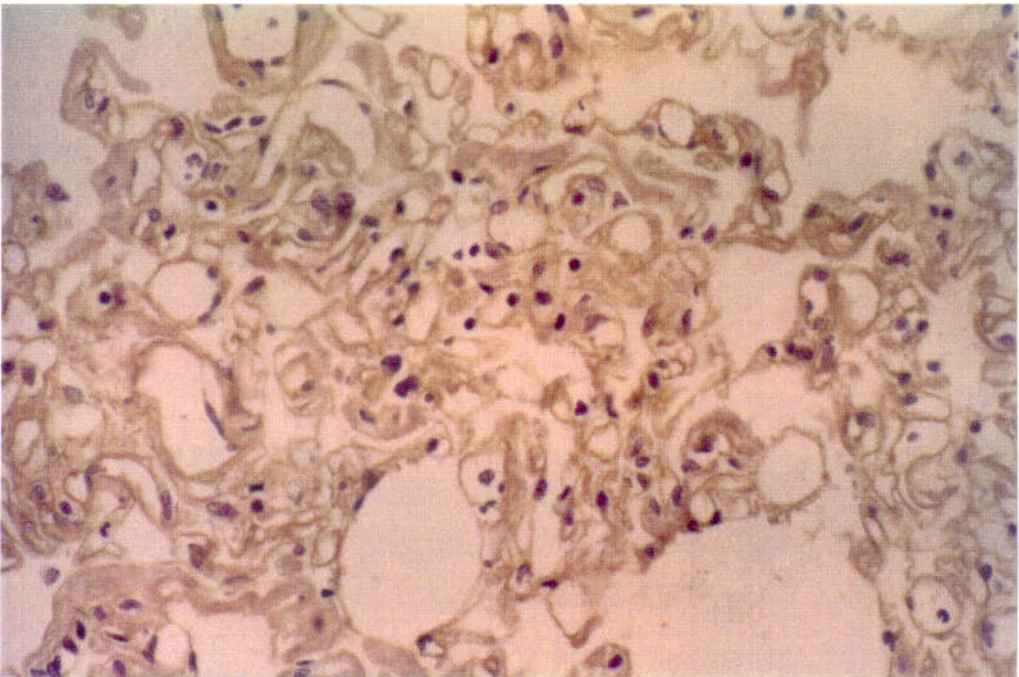


Fig. 32.- P.A.P. antilaminina. Fase intermedia. Fuerte inmunorreacción en las membranas basales de los capilares en áreas de angiogénesis. x 120.

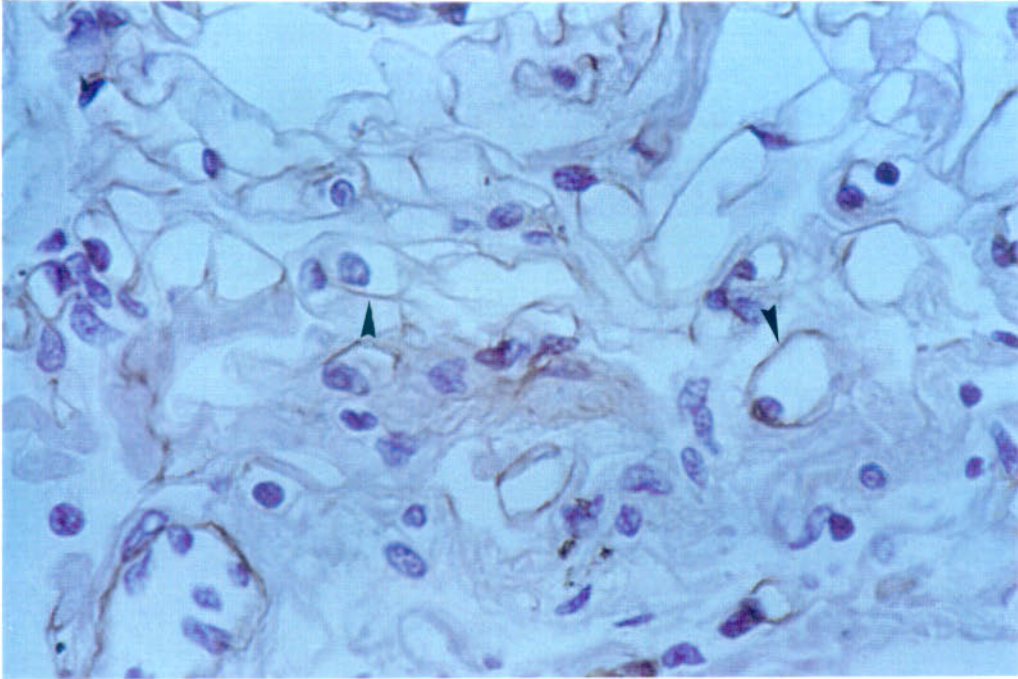


Fig. 33.- P.A.P. anticolágeno tipo IV. Fase intermedia. Marcada positividad en membranas basales de los capilares en zonas de proliferación vascular (▲). x 600.

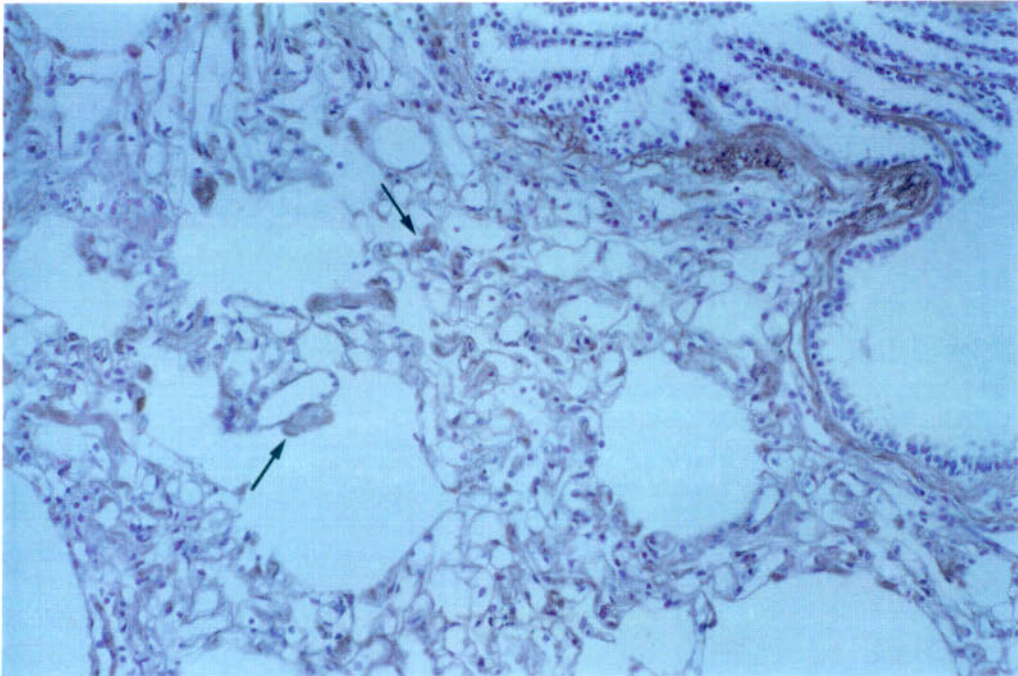


Fig. 34.- P.A.P. antifibronectina. Fase intermedia. Inmunorreacción de la matriz peribronquiolar, de pequeñas masas perivasculares y membranas basales en áreas de angiogénesis (†). x 90.

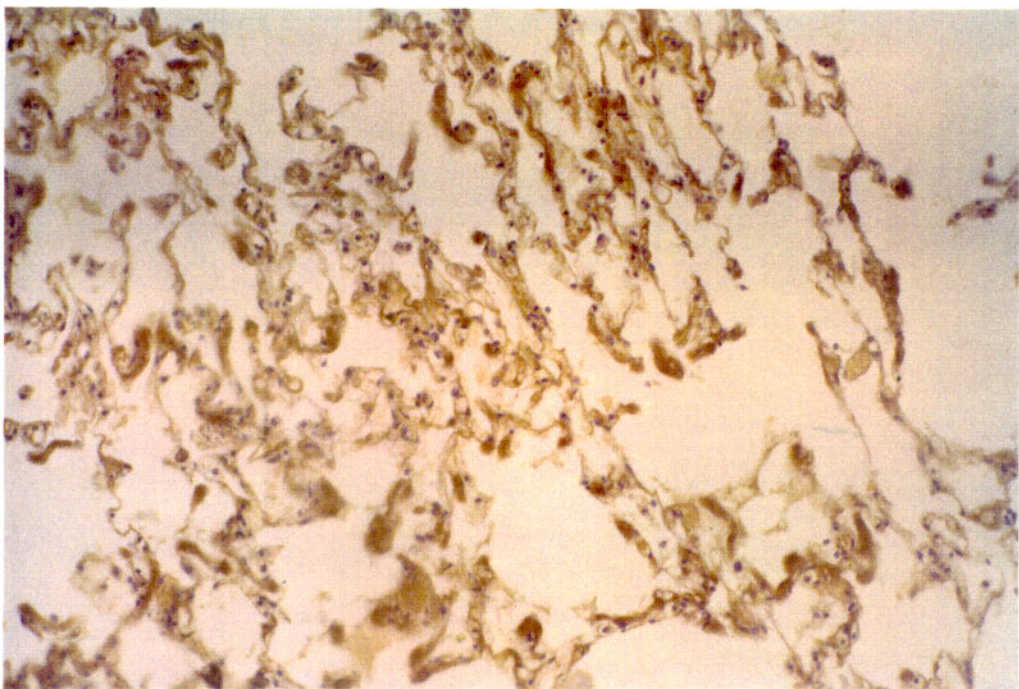


Fig. 35.- P.A.P. anticólageno tipo III. Fase intermedia. Positividad muy extensa de la matriz extracelular en el parénquima pulmonar. x 120.

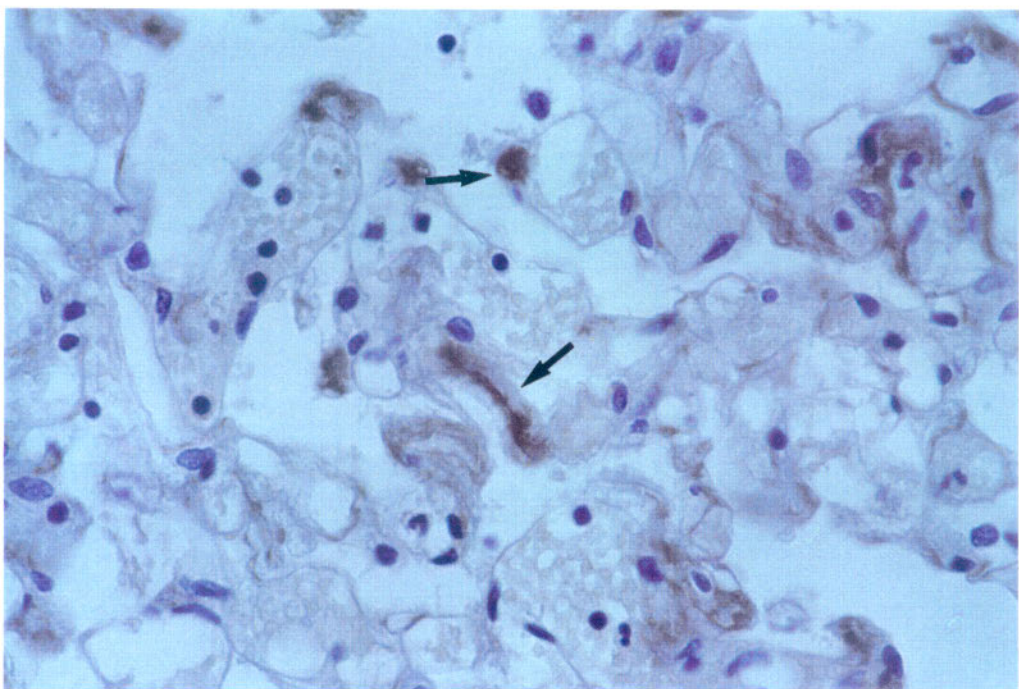


Fig. 36.- P.A.P. anticólageno tipo I. Fase intermedia. Fuerte positividad focal de algunas masas perivasculares en el septo alveolar (t). x 300.

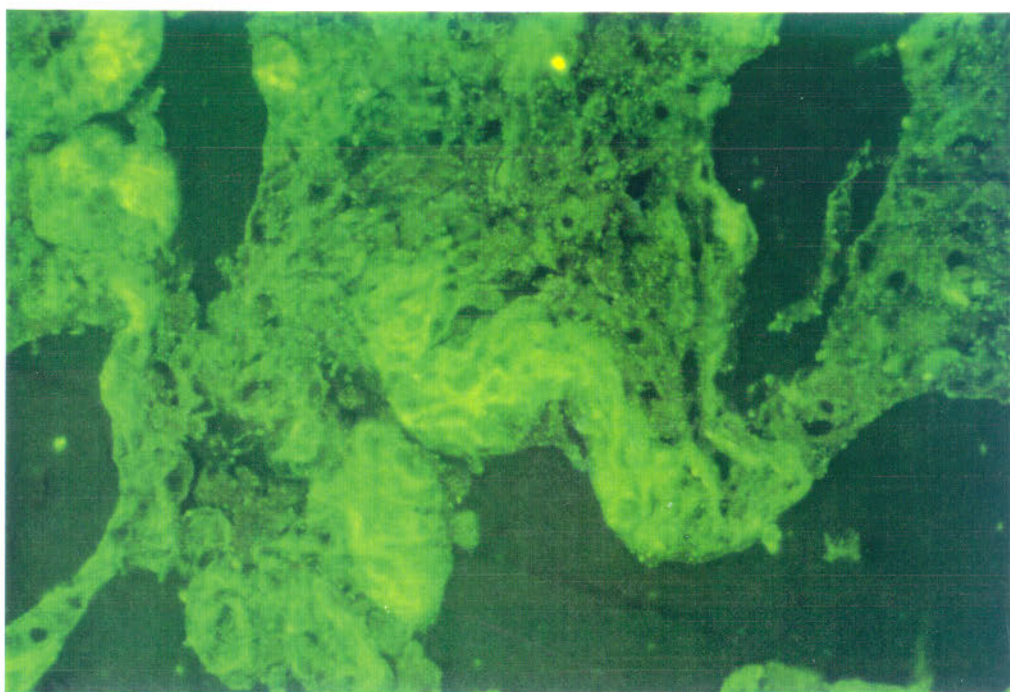


Fig. 37.- I.F.I. antiPDGF. Fase intermedia. Masa intraluminal adherida al septo alveolar, donde se aprecia una fuerte fluorescencia citoplasmática de los fibroblastos. x 185.

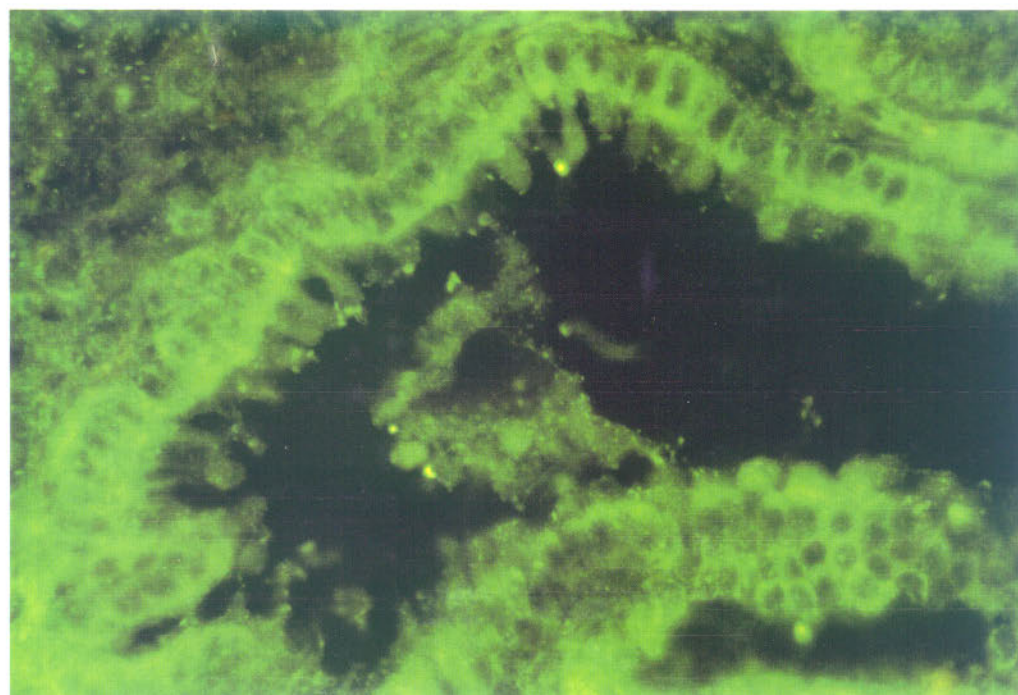


Fig. 38.- I.F.I. antiPDGF. Fase intermedia. Epitelio bronquiolar. Células positivas con marcada fluorescencia en el polo luminal. x 470.

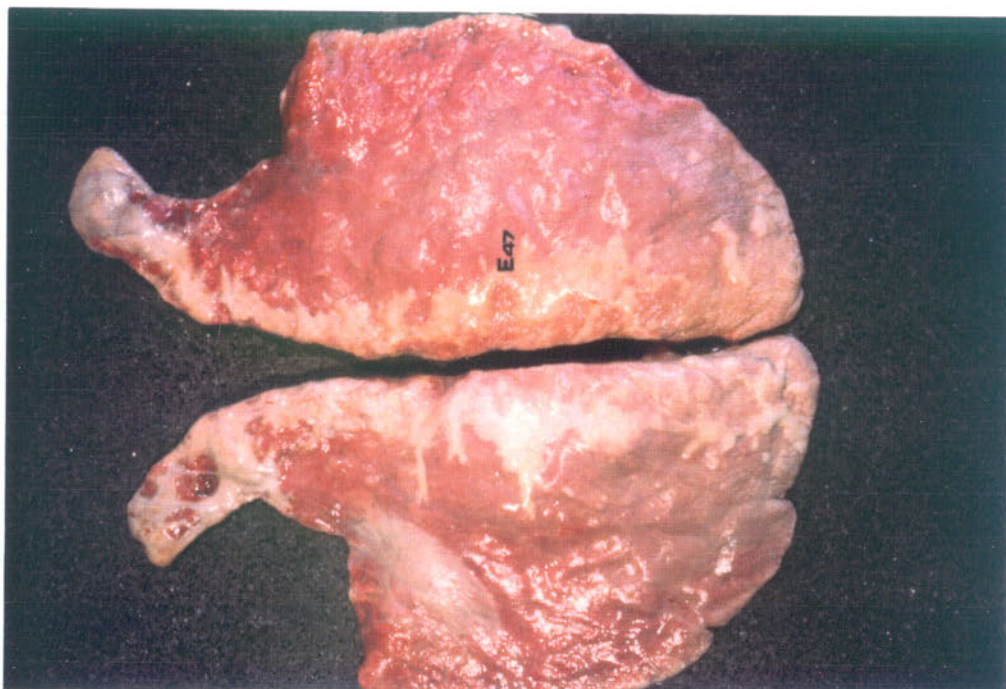


Fig. 3.- Pulmones tipo C. Vista dorsal.

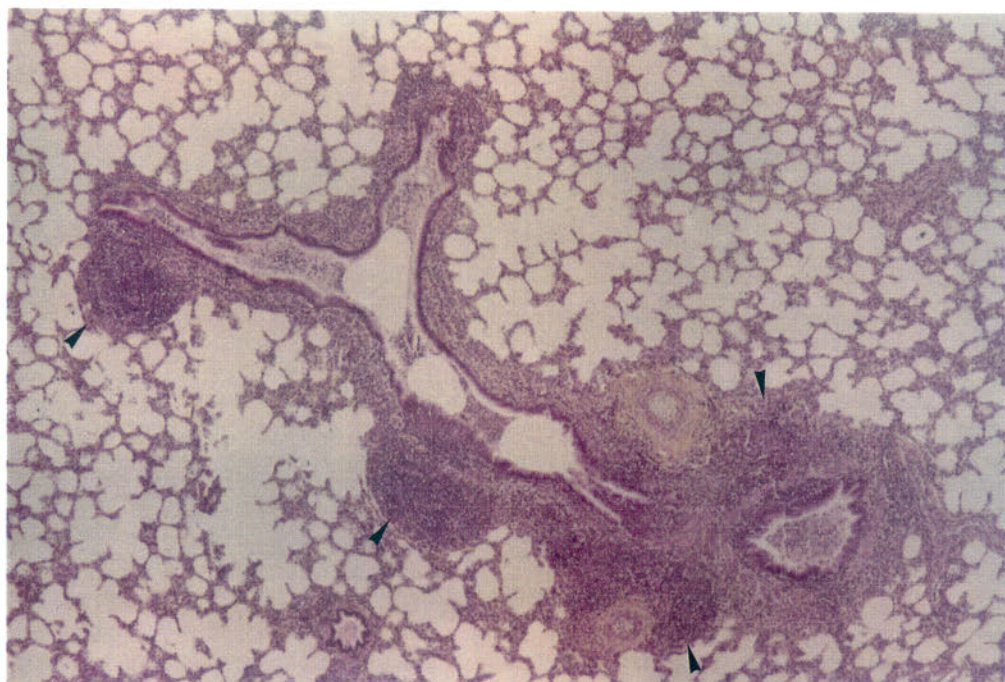


Fig. 4.- Neumonía intersticial linfoide (N.I.L.). Numerosas formaciones linfoides asociadas a bronquiolos (▲). H&E x 300.

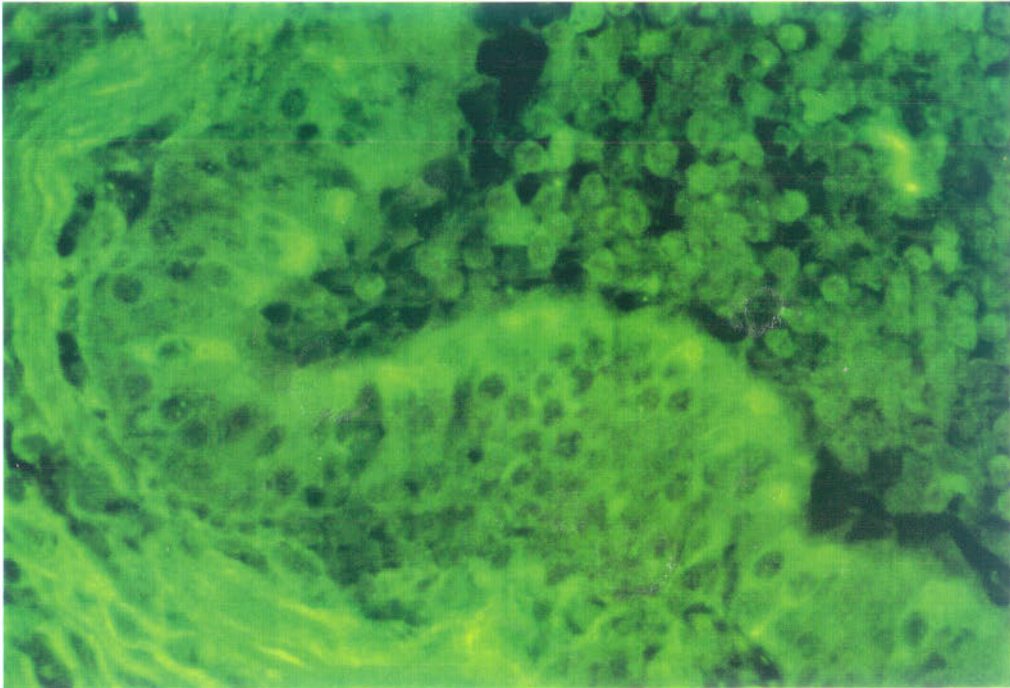


Fig. 39.- I.F.I. antiTGF  $\beta$ . Fase intermedia. Epitelio bronquiolar. Células con positividad predominantemente en el polo luminal. x 470.

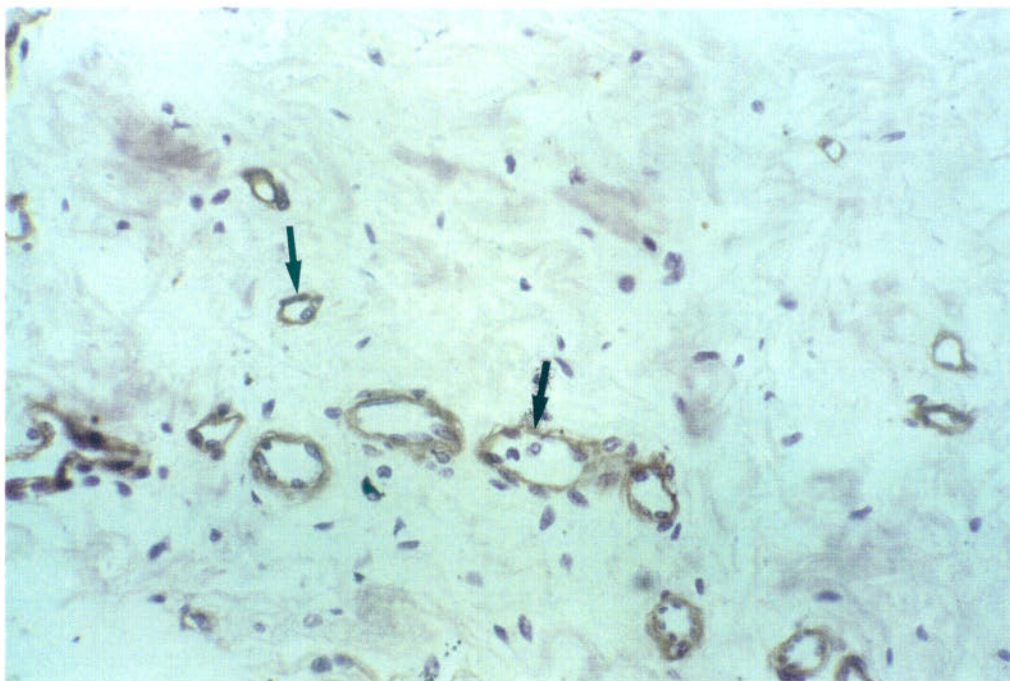


Fig. 40.- P.A.P. anticólageno tipo IV. Fase final. Membranas basales de capilares, positivas, en áreas fibróticas (†). x 150.

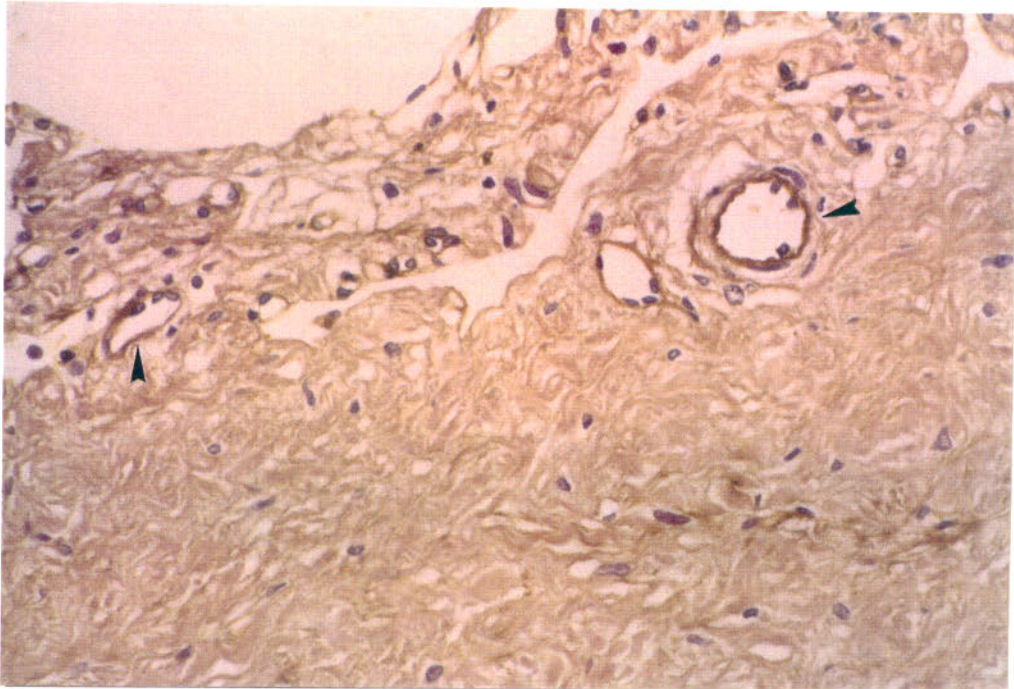


Fig. 41.- P.A.P. antifibronectina. Fase final. Positividad difusa del tejido conjuntivo e intensa reacción de membranas basales de capilares (▲). x 150.

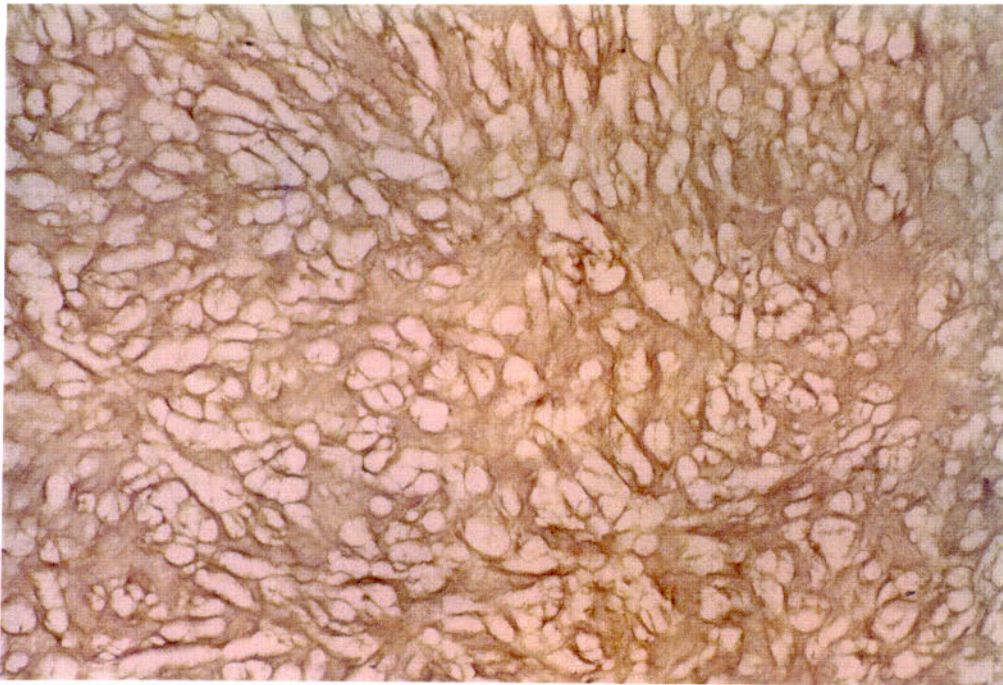
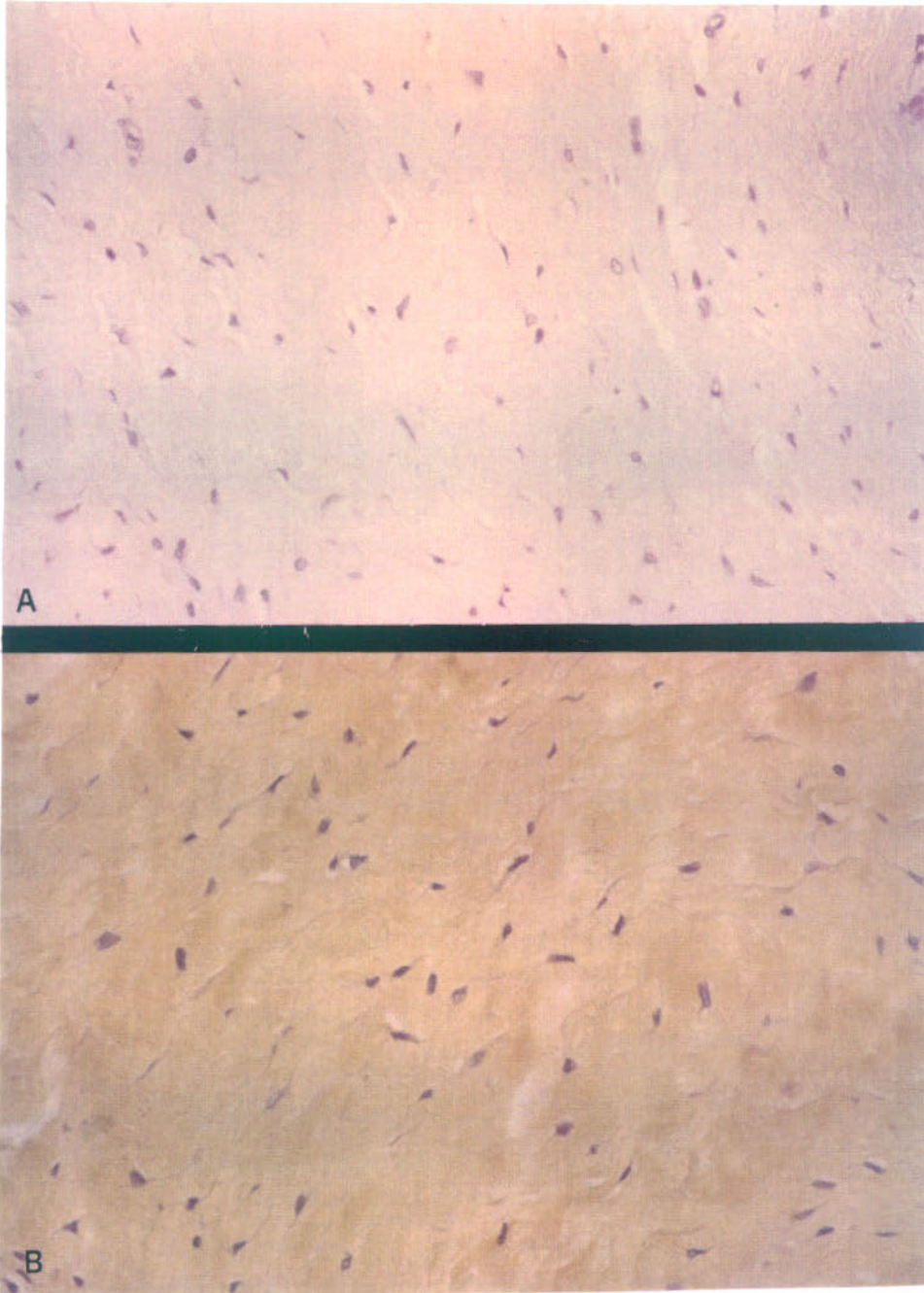
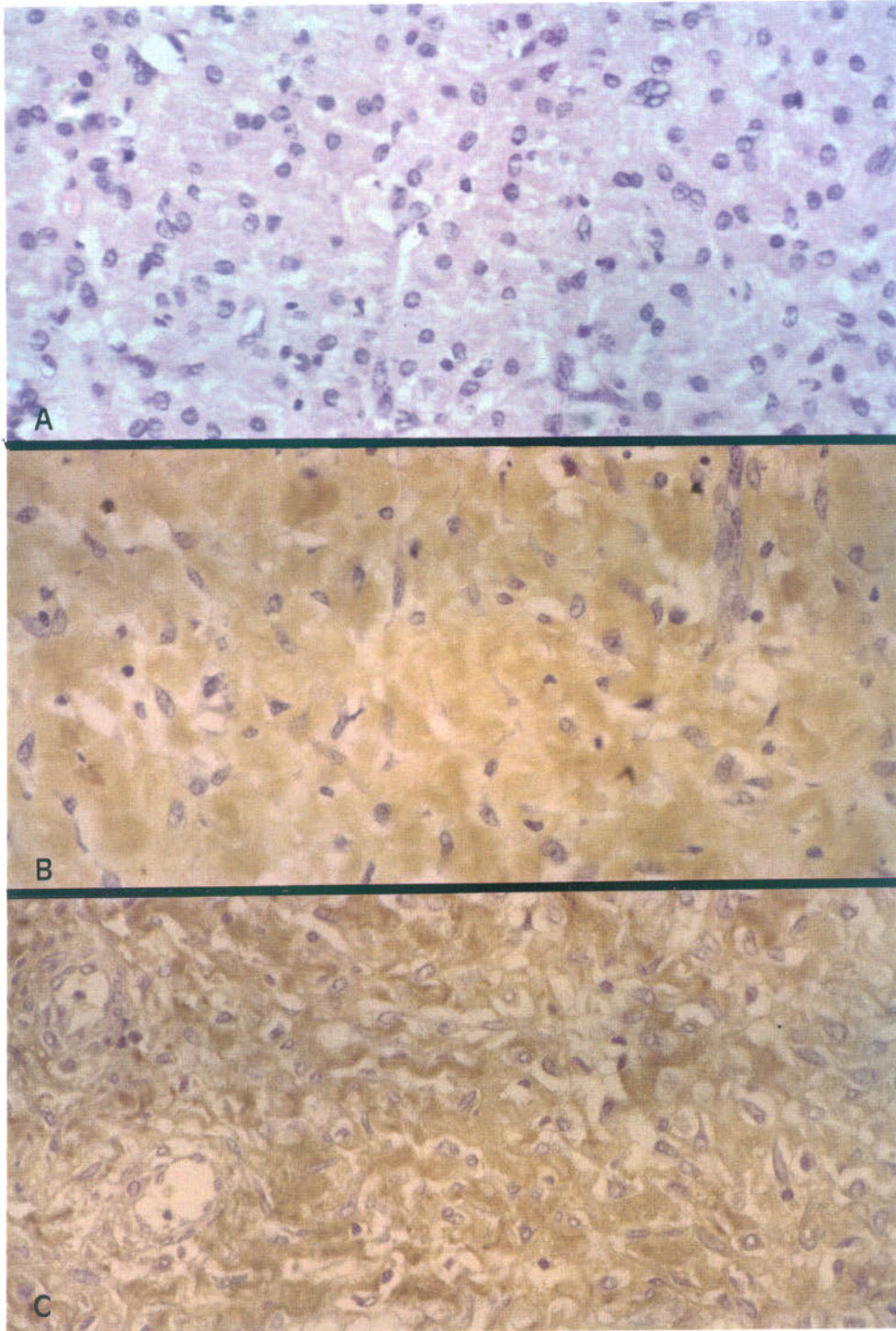


Fig. 42.- P.A.P. antifibronectina. Fase final. Inmunorreacción de fibronectina en masas fibróticas con imagen a manera de red. x 75.



**Fig. 43.- Fase final. A) Fibrosis pulmonar. H&E x 150; B) P.A.P. anticógeno tipo III. Escasa reacción en zonas ricas en matriz extracelular. x 150.**



**Fig. 44.- Fase final. Proliferación fibroblástica en áreas de fibrosis pulmonar. A) H&E x300.; B) P.A.P. anticógeno tipo III. Positividad en matriz extracelular. x 300; C) P.A.P. anticógeno tipo I. Fuerte reacción frente a este tipo de colágeno. x 300.**

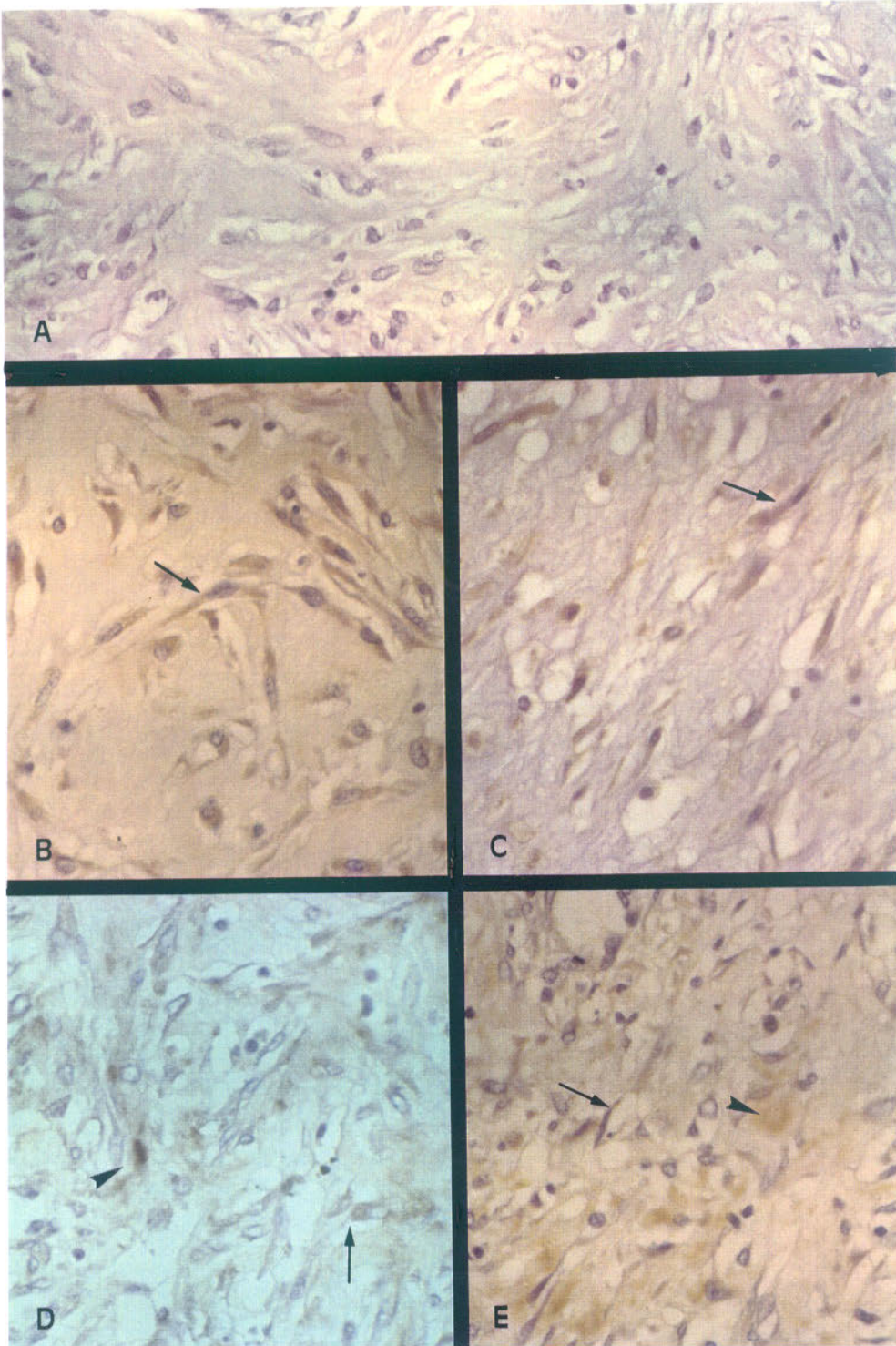
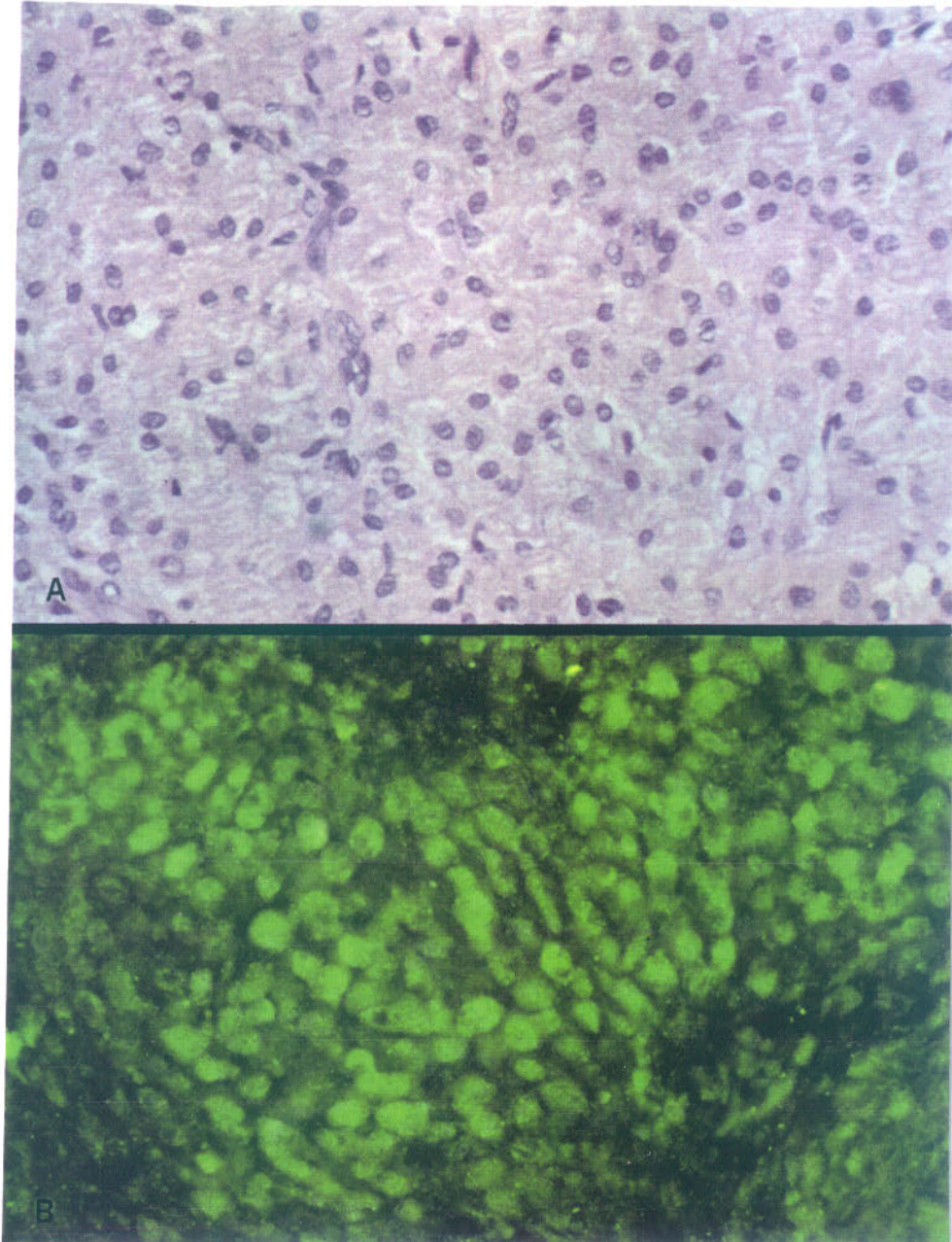


Fig. 45.- Fibrosis pulmonar con matriz extracelular de aspecto mucoso. A) H&E x150; B) Matriz extracelular negativa y fibroblastos positivos (†). P.A.P. anticógeno tipo III x300 y C) Matriz negativa y fibroblastos positivos (†). P.A.P. anticógeno tipo I x200. Areas de matriz (†) y fibroblastos débilmente positivos (†) en D) P.A.P. anticógeno tipo III x240 y en E) P.A.P. anticógeno tipo I x240.



**Fig. 46.- Fase final. Zona de proliferación fibroblástica: A) H&E x300; B) Numerosos fibroblastos fluorescentes frente a PDGF. I.F.I. antiPDGF x470.**

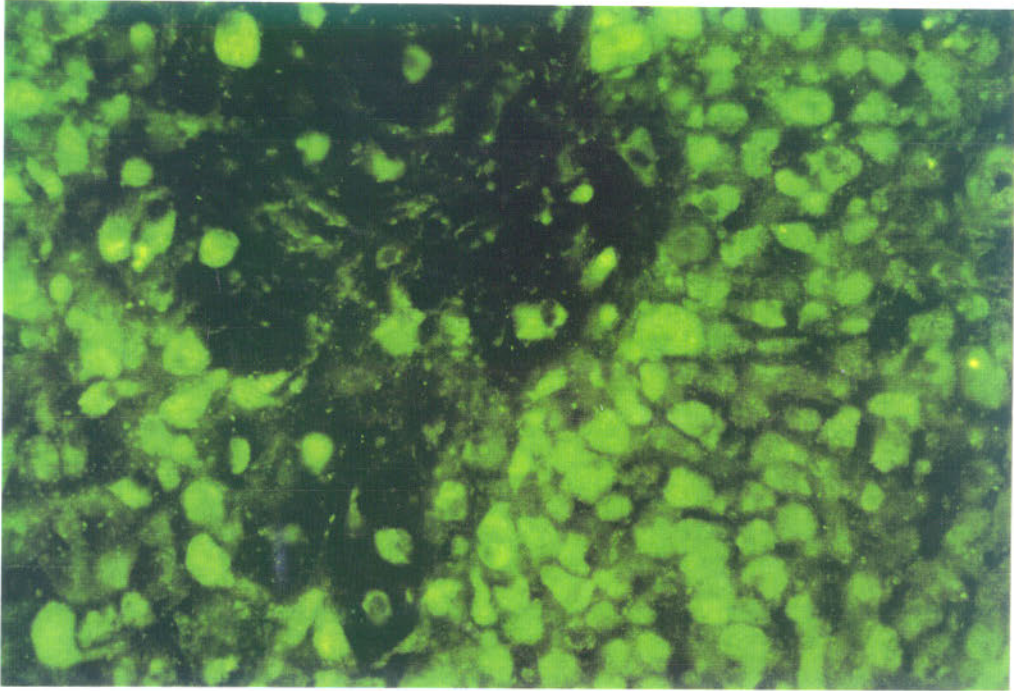


Fig. 47.- I.F.I. antiPDGF. Fase final. Intensa positividad de los fibroblastos que contrasta con la negatividad de la matriz extracelular. x 470.

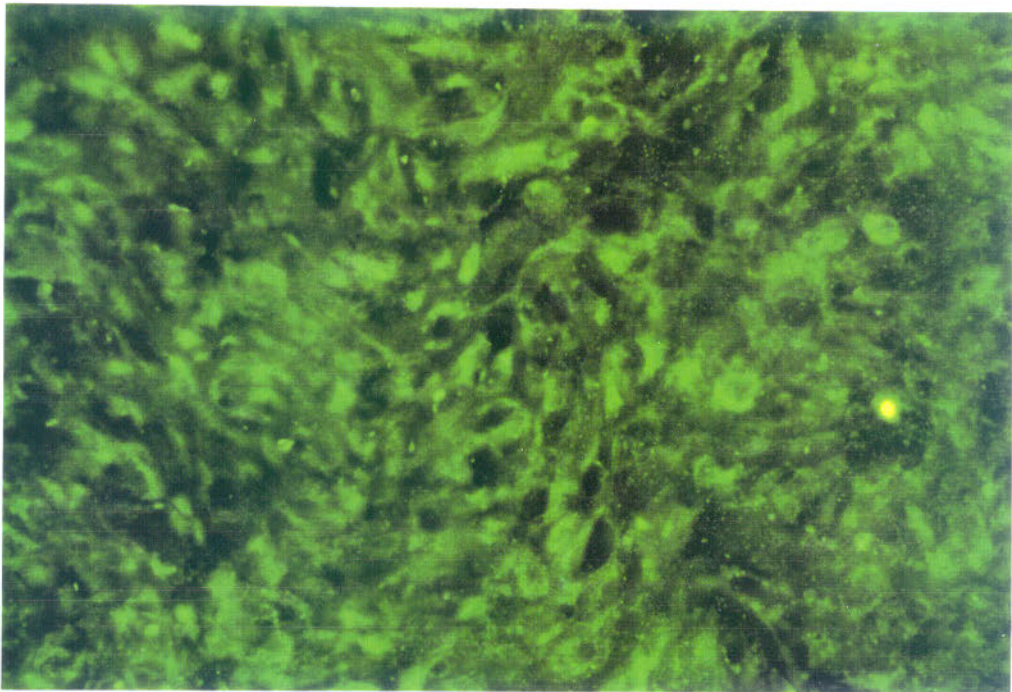


Fig. 48.- I.F.I. antiPDGF. Fase final. Matriz de aspecto mucoide negativa y fluorescencia marcada del citoplasma de los fibroblastos que proliferan. x 470.

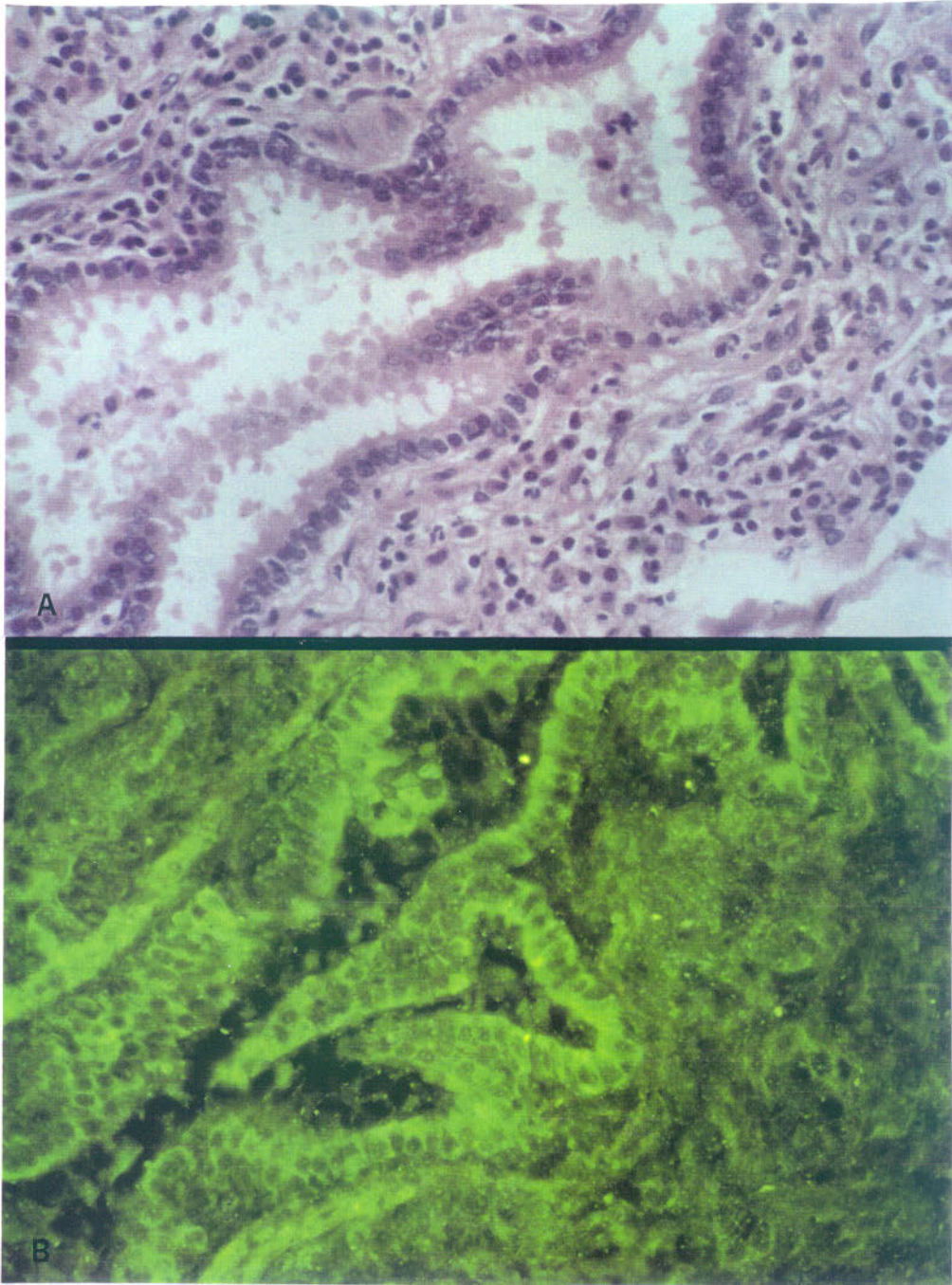


Fig. 49.- Fase final. Epitelio bronquiolar: A) H&E x312; B) Creciente positividad de las células epiteliales frente a PDGF. I.F.I. antiPDGF x 185.

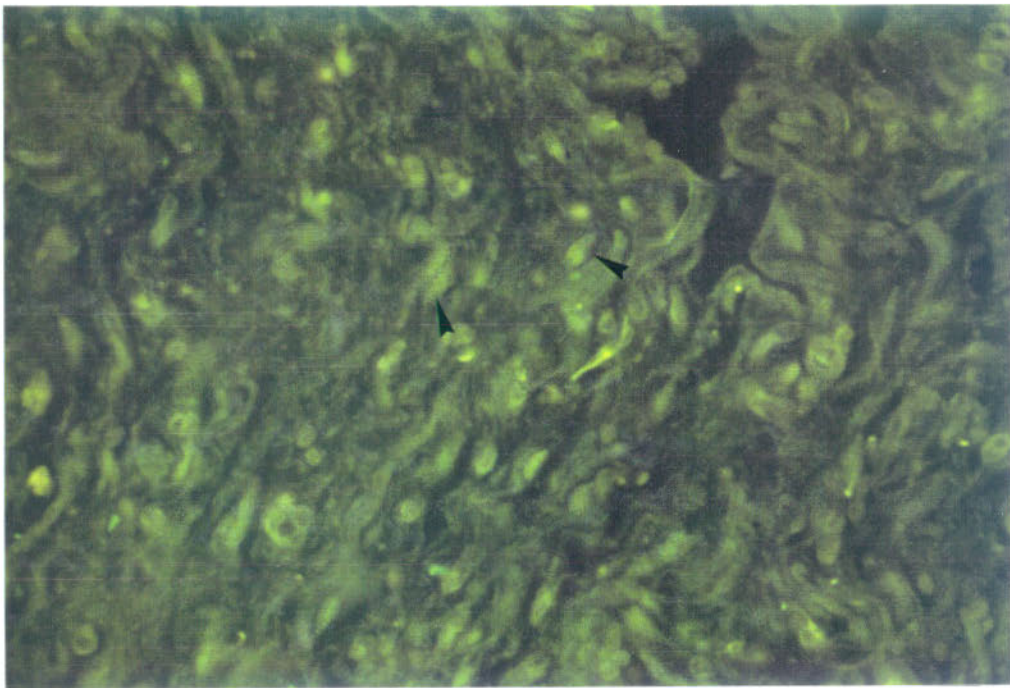


Fig. 50.- P.A.P. antiTGF  $\beta$ . Fase final. Discreta reacción de los fibroblastos al TGF  $\beta$ , en áreas ricas en colágeno (A). x 185.

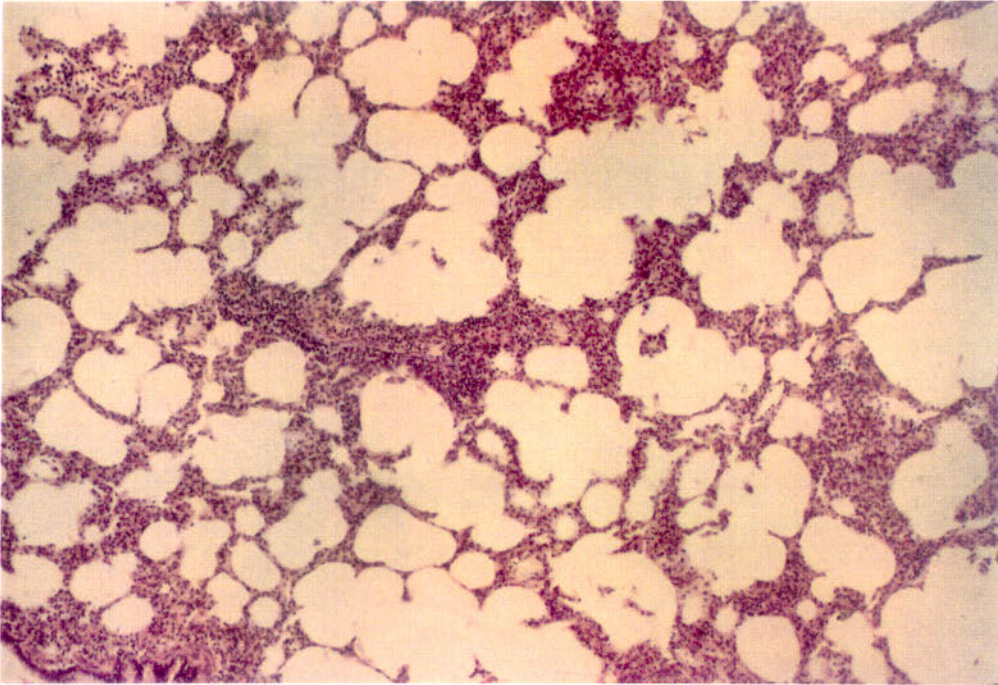


Fig. 5.- Neumonía intersticial linfoide (N.I.L.). Infiltración masiva de linfocitos en el intersticio alveolar. H&E x 300.

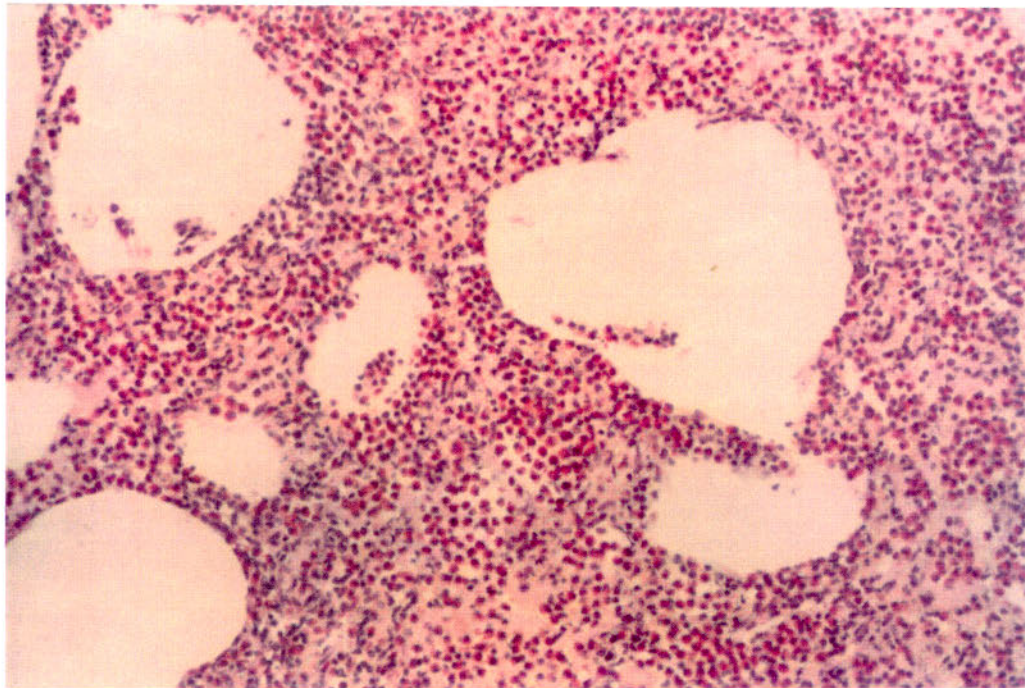


Fig. 6.- Neumonía intersticial eosinoflica (N.I.E.). Infiltrado eosinoflico en el parénquima pulmonar. H&E x 240.

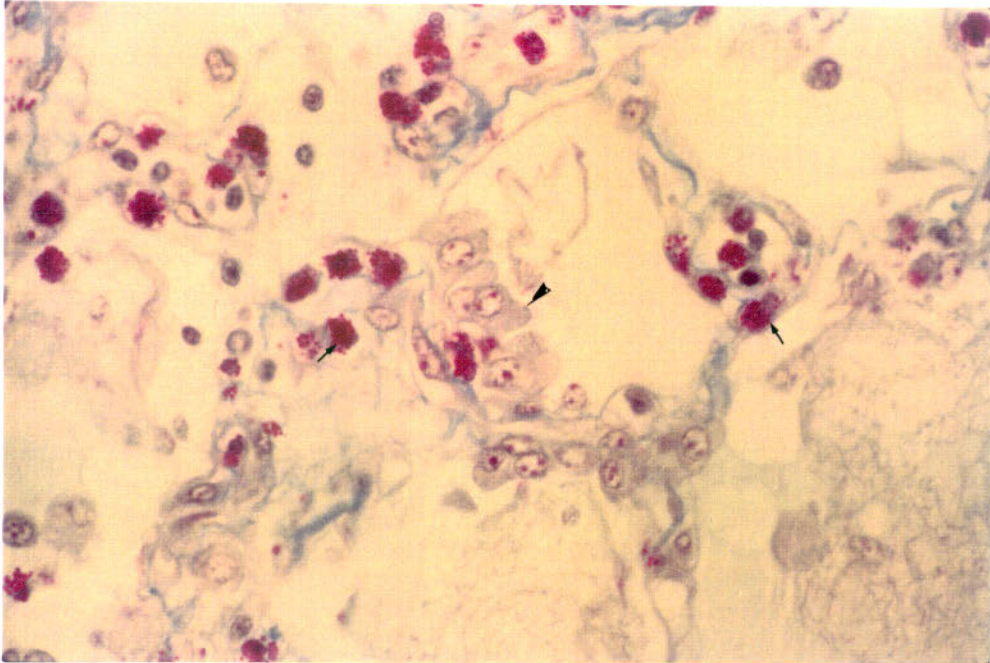


Fig. 7.- Neumonía intersticial eosinofílica (N.I.E.). Eosinófilos (†) y área de reepitelización (▲). Tricrómico de Masson x 600.

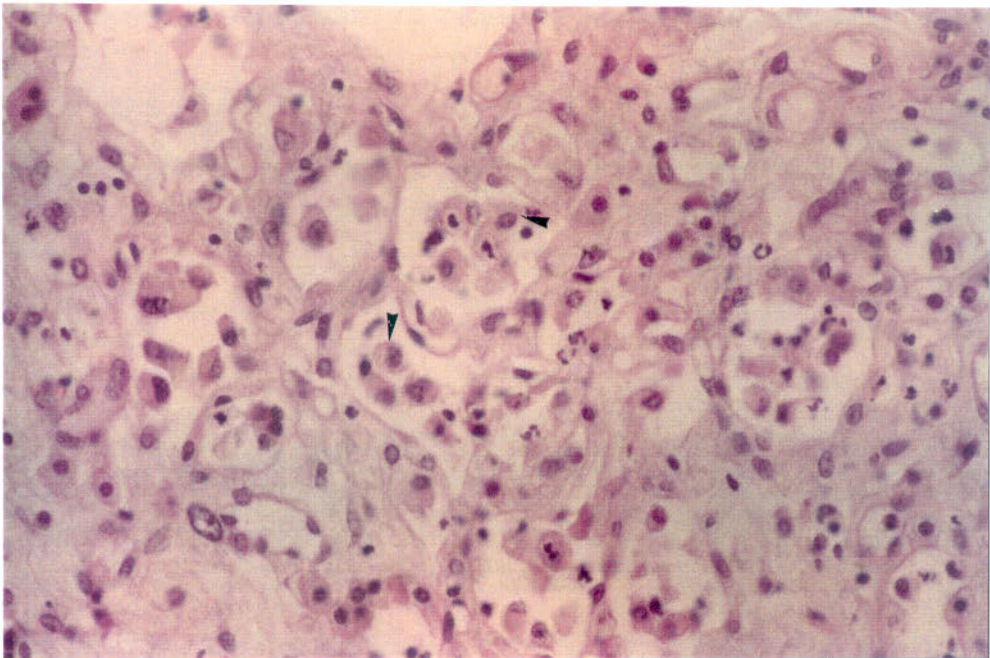


Fig. 8.- Neumonía intersticial descamativa (N.I.D.). Macrófagos activados (▲) en las luces alveolares y áreas de angiogénesis. H&E x 300.

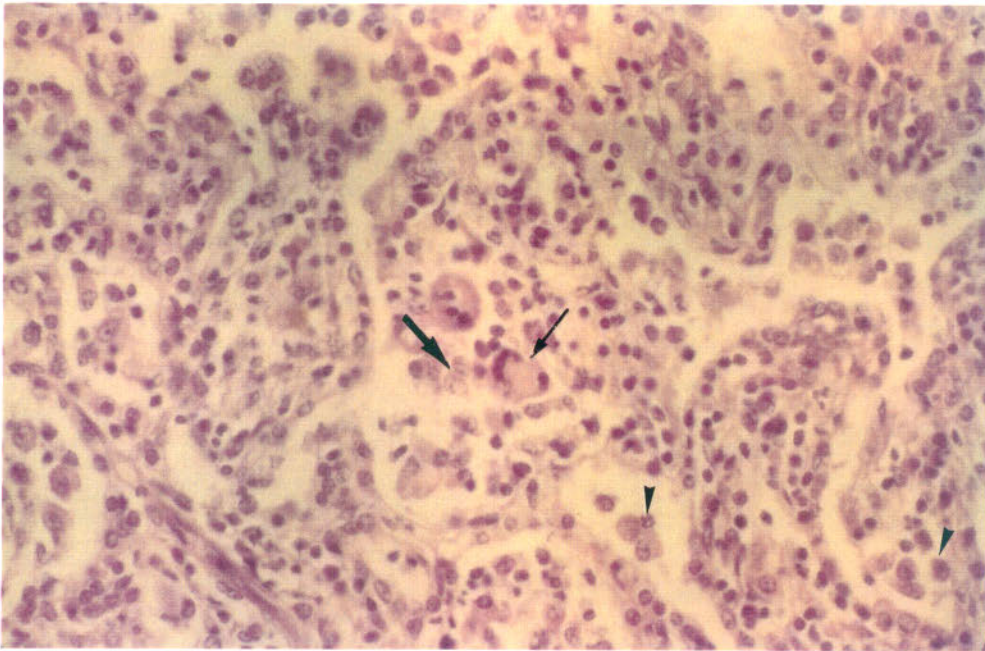


Fig. 9.- Neumonía intersticial de células gigantes (N.I.C.G.). Abundantes células descamadas en la luz alveolar: macrófagos (▲), neumocitos (♣) y células gigantes multinucleadas (♠). H&E x 180.

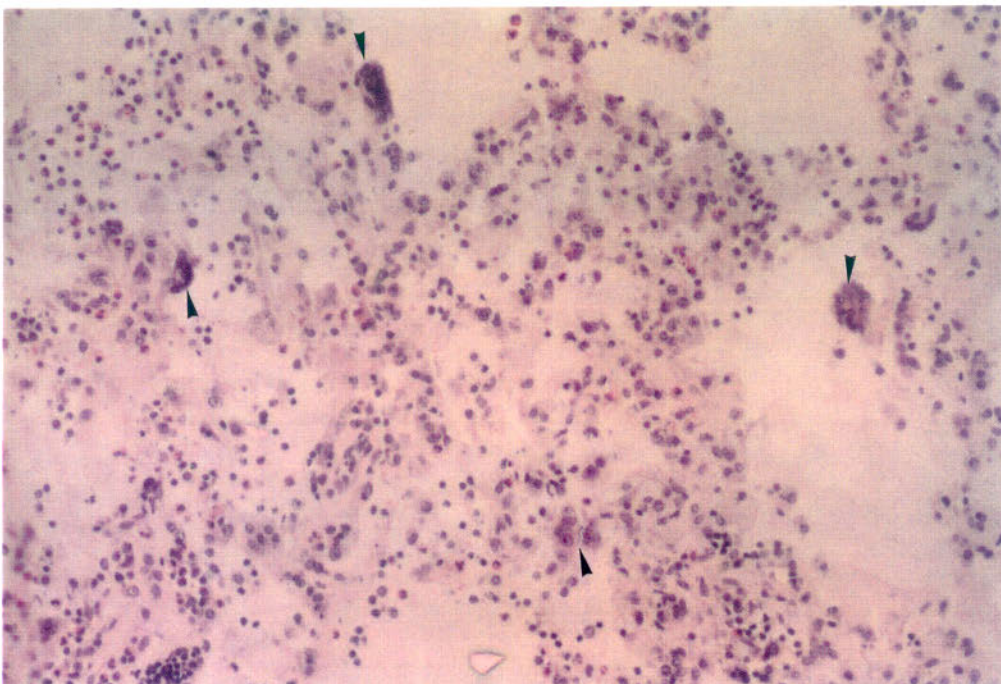
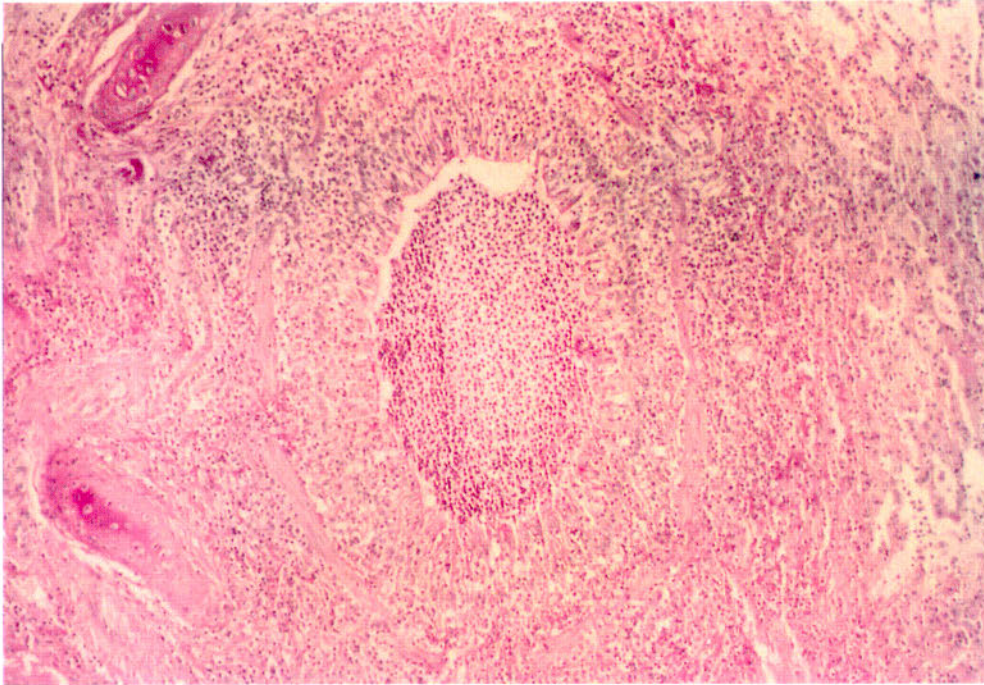
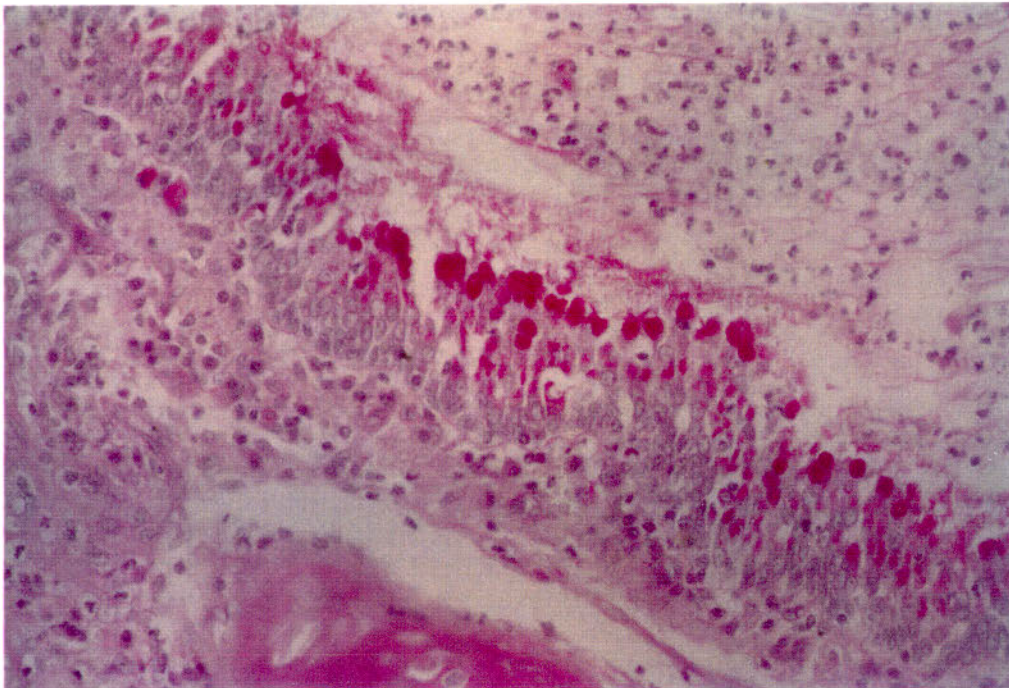


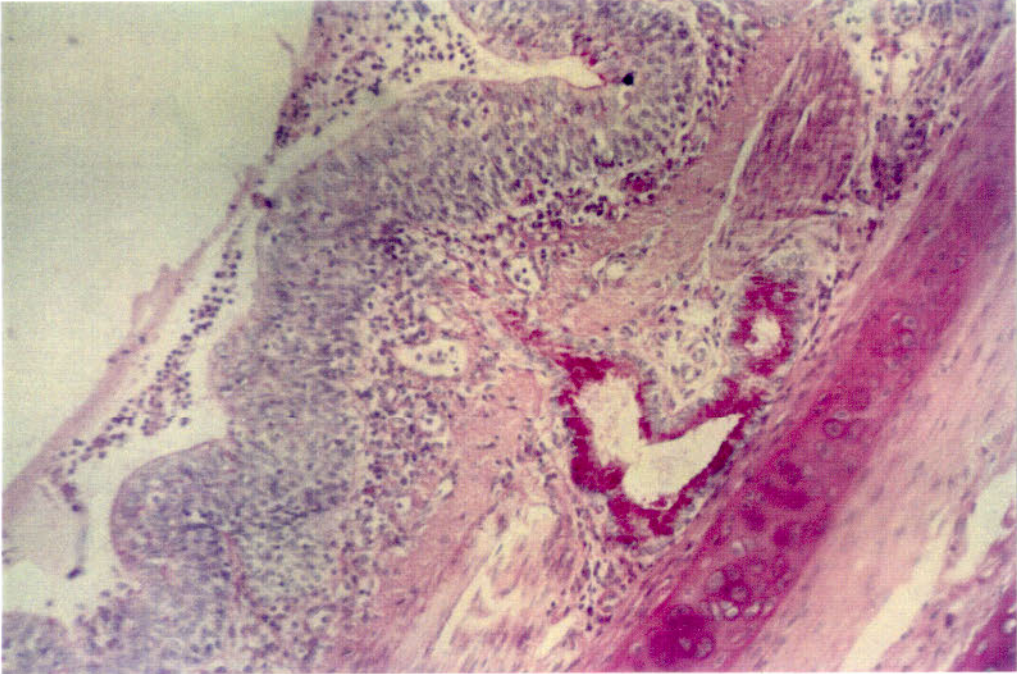
Fig. 10.- Neumonía intersticial de células gigantes (N.I.C.G.). Descamación celular muy marcada en la luz alveolar con abundantes células gigantes multinucleadas (♠). H&E x 210.



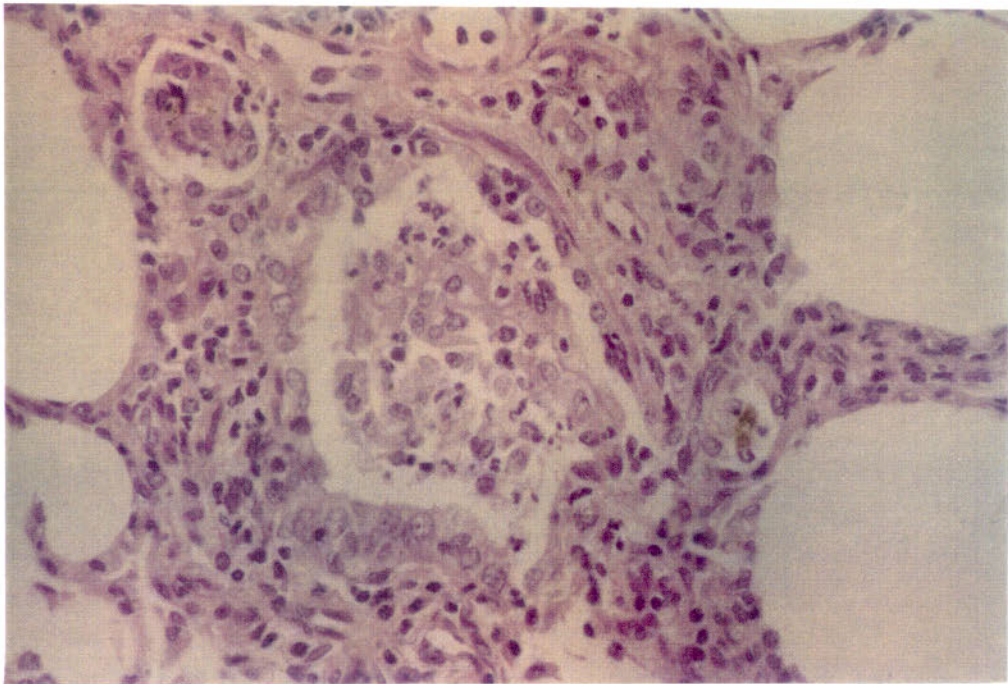
**Fig. 11.-** Neumonía bronquiolointersticial (N.B.I.). Luz bronquial repleta de neutrófilos. Numerosos polimorfonucleares en la luz de las alveolos adyacentes. H&E x 210.



**Fig. 12.-** Neumonía bronquiolointersticial (N.B.I.). Hiperplasia de células caliciformes. PAS x 240.



**Fig. 13.- Neumonía bronquiolointersticial (N.B.I.). Metaplasia del epitelio bronquial. PAS x 198.**



**Fig. 14.- Neumonía intersticial bronquiolititis obliterante (N.I.B.O.). Bronquiolo con masa intraluminal en fase de organización conjuntiva. H&E x 240.**

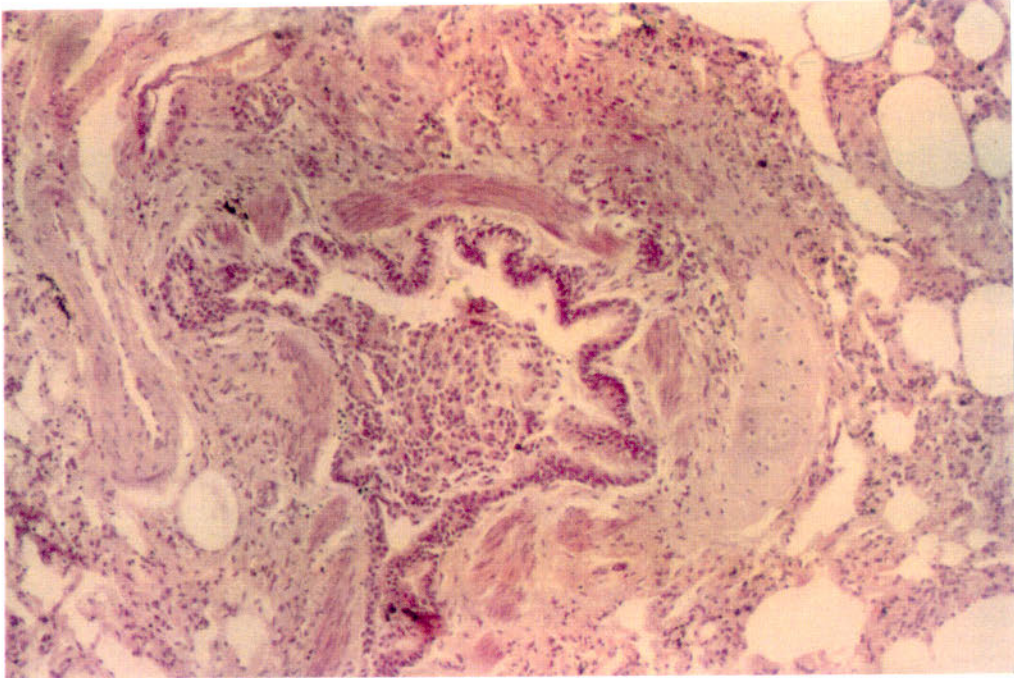


Fig. 15.- Neumonía intersticial bronquiolitis obliterante (N.I.B.O.). Masa conjuntiva que obstruye parcialmente la luz bronquiolar. H&E x 150.

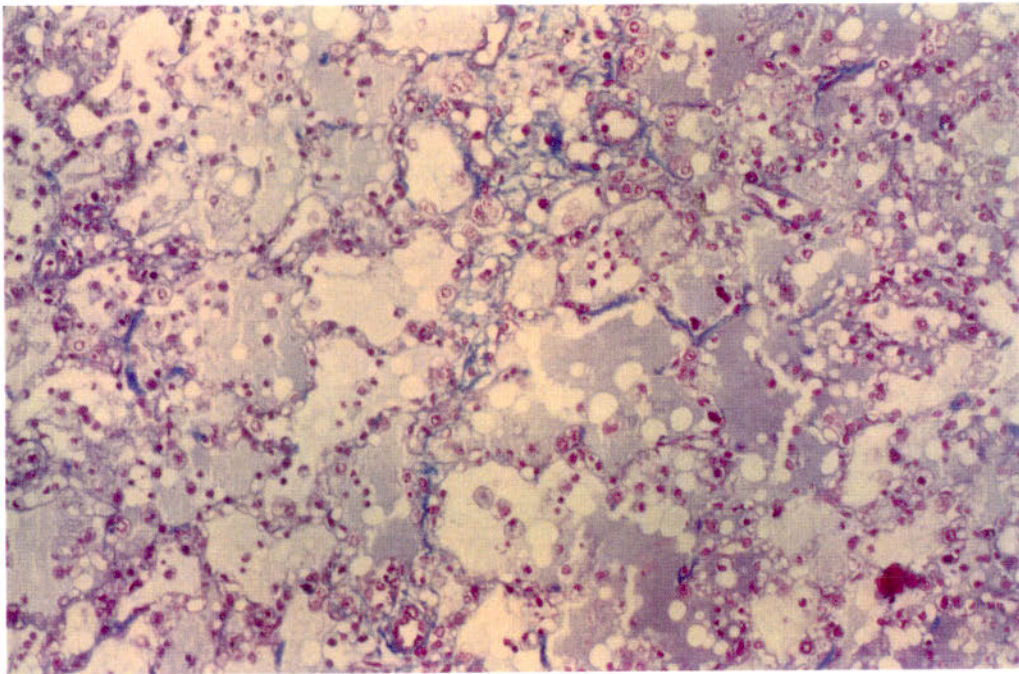


Fig. 16.- Neumonía intersticial usual (N.I.U.). Fase inicial. Fenómenos infiltrativo-exudativos. Tricrómico de Masson x 150.

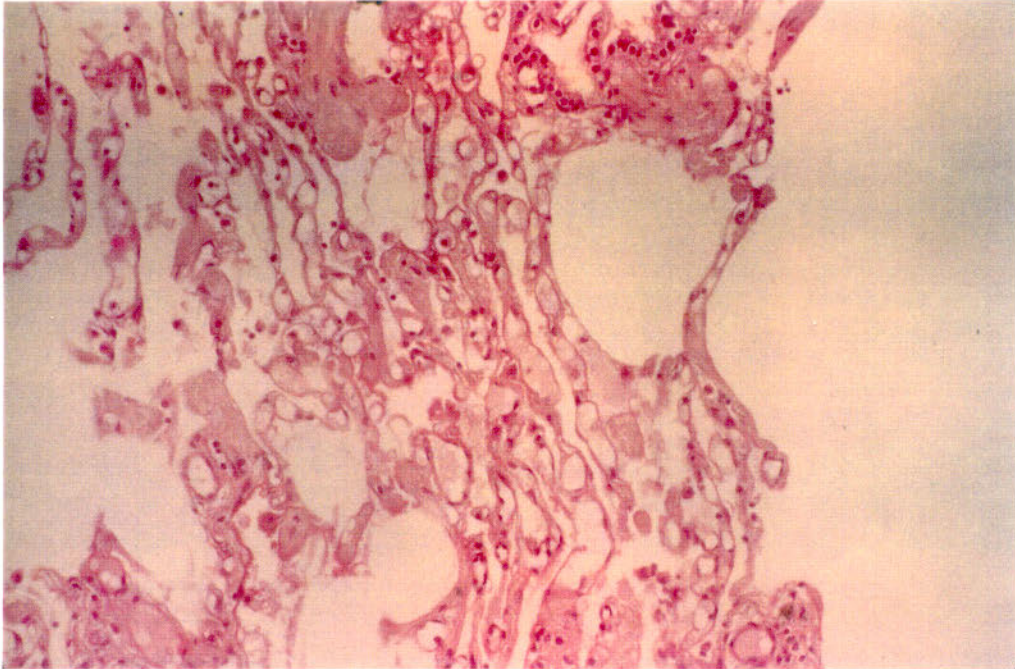


Fig. 17.- Neumonía intersticial usual (N.I.U.). Fase inicial. Areas de dilatación y proliferación vascular. H&E x 150.

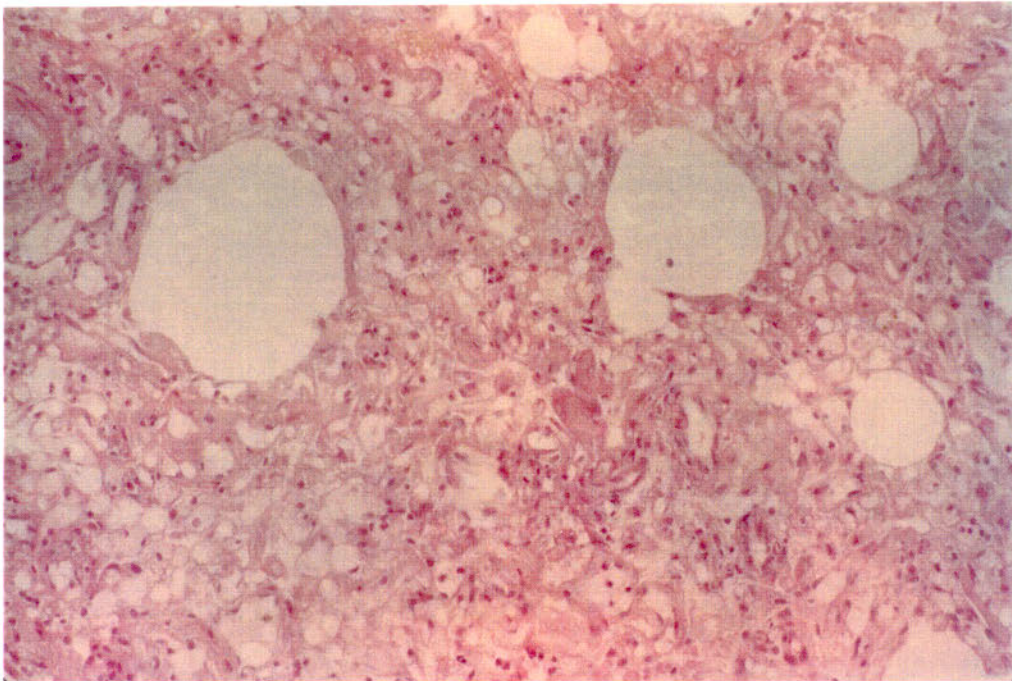


Fig. 18.- Neumonía intersticial usual (N.I.U.). Fase intermedia. Areas de angiogénesis. H&E x 150.

## **DISCUSSION**

---

## **DISCUSION**

Durante la primera parte de nuestra revisión hemos podido comprobar el conocimiento que existe desde la Antigüedad hasta nuestros días, acerca de algunos problemas respiratorios en el hombre y en los équidos, relacionados con las neumonías crónicas.

Sin embargo, los estudios realizados eran muy aislados, perdiéndose la visión de conjunto, y dando lugar a la creación de múltiples términos para describir procesos semejantes.

Así encontramos el primer término que conocemos de la Edad Moderna, "broken-wind", descrito por Floyer (1698) y que se utilizó durante dos siglos. Este autor emplea el término "broken-wind" para describir la presencia de enfisema pulmonar, hecho que fue corroborado por Cook y Rossdale (1963).

Posteriormente otros autores, entre los que destacamos a Malkmus (1912), definieron el proceso como "heaves", que desde un punto de vista anatomopatológico agrupa un gran número de enfermedades crónicas de los pulmones equinos. Si consideramos la definición y aplicación de "heaves" por Malkmus a caballos con "respiración laboriosa y dificultada", hemos de establecer este término como un síntoma más que como una enfermedad, tal y como señaló Gerber (1969).

A principios del siglo XX, gracias a los trabajos desarrollados por algunos

investigadores veterinarios como Bezançon y col. (1922) y Kountz y Alexander (1934), aumento aún más la confusión al utilizar el concepto de enfisema humano para describir algunos problemas respiratorios en los équidos. Este término adquirió gran difusión, sobre todo a partir de 1945 como consecuencia del aumento de la incidencia del enfisema en la población mundial y el hallazgo de fuertes semejanzas entre el pulmón humano y equino. Este hecho confundió aun más al veterinario de équidos al designar el enfisema del caballo, desde el punto de vista de la medicina humana, como producto de un estado asmático crónico.

La causa principal de este problema fué el empleo inapropiado del término "enfisema", ya que los estados asmáticos equinos no pueden ser diagnosticados ni clínica ni funcionalmente, sólo a través del examen postmortem tal y como señala Thurlbeck y col. (1970), y además tuvo como resultado la confusión entre asma y enfisema.

Como podemos comprobar, muchos de los problemas terminológicos encontrados en veterinaria, y más en concreto en la patología pulmonar del caballo son herencia de la trasposición conceptual desde la patología humana. Este fenómeno se agudizó aún más en los años 70 a raíz de la aplicación en patología pulmonar equina del acrónimo médico inglés COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease).

En el pasado este síndrome clínico fue conocido como "broken-wind", "heaves" o "enfisema". Estos términos se utilizaban indistintamente, y parecía que había menos confusión entonces que ahora.

Este problema terminológico ha aumentado en los últimos diez años, en nuestra opinión y coincidiendo con Kaup y col. (1990), es consecuencia de los numerosos estudios etiológicos y fisiológicos, así como de múltiples asociaciones patológicas del pulmón equino.

Ello obliga a que estamentos médicos estatales, como la Sociedad Americana Torácica (1987), estandarizaran y definieran precisamente, todos estos problemas respiratorios y fundamentalmente este síndrome. De igual manera en 1985 se celebró un Simposio Internacional sobre patología respiratoria, para debatir estos problemas y asentar bases metodológicas y terminológicas sobre las enfermedades respiratorias de los équidos.

Creemos al igual que Viel (1983) que COPD describe un síndrome clínico respiratorio, y no revela la patología subyacente.

Por este motivo, el término que mayor aceptación ha tenido en los últimos años, tal y como señalan Gerber (1973) y Hungergord (1992), es el de neumonías crónicas equinas, las cuales incluyen lesiones del parénquima y vías respiratorias.

Aunque este término incluye el parénquima pulmonar y lleva inherente cambios en el intersticio alveolar, consideramos más idóneo el uso de neumonía intersticial crónica; así, no sólo definimos el problema respiratorio en cuanto a su localización sino que evidenciamos la evolución de las lesiones en el tiempo.

Sin embargo, encontramos que numerosos autores han señalado, que las enfermedades pulmonares más importantes de los caballos como infecciones de las

vías respiratorias superiores (Dixon y col., 1992), COPD (Nicholls, 1978), hemorragia pulmonar inducida por el esfuerzo (O'Callaghan y col., 1987) entre otras, afectan primariamente a la porción conductora, en particular a los bronquiolos.

En contraste, la escasez de referencias bibliográficas acerca de cambios patológicos en la región alveolar del pulmón equino, con la excepción del enfisema alveolar, tal y como señalan algunos autores (Kaup y col., 1985; Nicholls, 1978; Schoon y Deegen, 1983; Sasse, 1971), ha puesto de manifiesto la necesidad de realizar estudios más profundos sobre este tema.

Según la opinión de Robison (1991), los caballos sufren poco de neumonías crónicas, pero normalmente tienen obstrucción difusa de la porción conductora del pulmón.

Quizás la falta de conocimientos en relación a neumonías intersticiales se deba, de acuerdo con Kaup y col. (1985) a la ausencia de manifestaciones clínicas, las cuales sólo aparecen cuando las lesiones a nivel alveolar son muy severas.

Hemos de considerar que el principal problema que nos encontramos a la hora de abordar el tema de las neumonías intersticiales espontáneas de los animales, y sobre todo de los équidos, es el hallazgo de resultados demasiado fragmentarios sobre todo si consideramos la relación clínico-patológica.

Así lo demuestran estudios aislados sobre neumonías intersticiales en los équidos como los realizados por Schwartz y col. (1981) en caballos que inhalaban silicato; O'Sullivan (1979), Jones y Hunt (1983) y Breeze y col. (1984) en équidos

alimentados con vegetales con altas concentraciones de alcaloides u otro tipo de sustancias tóxicas para estos animales (crotón, senecio sp., menta púrpura).

Queremos destacar, al igual que al principio de nuestra discusión, que los pocos artículos que encontramos al respecto de las neumonía intersticiales equinas no presentan una uniformidad terminológica ni descriptiva desde un punto de vista histopatológico.

Sin embargo, en la actualidad algunos investigadores veterinarios especialistas en la patología pulmonar equina (Dixon y col., 1992) al igual que hicieran Cotran y col. (1991) en el hombre, han agrupado las enfermedades respiratorias del caballo en dos grupos: obstructivas (afectan principalmente a los bronquiolos) y restrictivas (enfermedades del alveolo e intersticio), haciendo especial hincapie en la infrecuente presentación de estas últimas.

En este sentido, hemos de señalar que como consecuencia de una mayor preocupación y estudio de la región alveolar (septo y luz alveolar o parénquima) en medicina humana, la controversia sobre la designación de enfermedades clínicas desde un punto de vista histológico han desbordado el mundo de la Neumología.

Así podemos encontrar numerosos términos en medicina humana como "alveolitis fibrosante" (Spencer, 1975), "neumonía intersticial usual" (Liebow, 1975), "neumonitis criptogénica organizada" (Davison, 1983), "neumonía organizada bronquiolitis obliterante" (Eppler y col., 1985); todos ellos tienen ciertos rasgos histológicos comunes, aunque clínicamente puedan existir diferencias (duración del

proceso, signos clínicos, incidencia, etc).

La designación de las diversas denominaciones en patología pulmonar humana se realizaba de acuerdo a la alteración patológica que predominaba, tal y como señala Geddes (1991).

En nuestra opinión, un fenómeno muy semejante al de medicina humana, sucedió en patología equina como consecuencia de la fragmentación de los hallazgos en las neumonía intersticiales, dando lugar a un gran número de denominaciones como "neumonía crónica" (Gerber, 69 0 73), "neumonía crónica supurativa intersticial" (Buergelt y col, 1986), "neumonía granulomatosoa crónica fibrosante" (Schwartz y col., 1981), "neumonía intersticial" (Dungworth, 1982), "neumonía broncointersticial granulomatosa" (Winder y col., 1988), "neumonía crónica difusa broncointersticial" (Winder y van der Fellenberg, 1987) entre otros.

Finalmente, consideramos que los numerosos términos utilizados por los distintos autores, sólo definen fases evolutivas de la neumonía intersticial crónica, coincidiendo en este sentido, con los trabajos de Davison (1983), Geddes (1991) y Costabel y Guzmán (1991) en medicina humana.

Con el estudio bacteriológico y virológico queremos desvelar alguna luz sobre la incierta etiología de las enfermedades pulmonares crónicas, tal y como señalan numerosos autores (Cook y Rossdale, 1963; Eyre y col., 1972; Cook, 1976; McPherson y col., 1979; Dungworth, 1982; Buergelt y col., 1986; Winder y von Fellenberg, 1987; Mair y Lane, 1989; Grüning y col., 1989; Kaup y col., 1990).

El estudio de la **flora microbiana** realizado en los équidos de matadero, mediante la impregnación de un hisopo en las vías respiratorias, puso de manifiesto el aislamiento de gran número de géneros, tanto gram positivos como negativos, los cuales coinciden básicamente con los encontrados por Adamson y col. (1985) en tejido pulmonar y otros autores como Nuytten y col. (1983), Whitwell y Greet (1984) y Morris (1984) en lavados traqueobronquiales equinos.

Hemos de considerar que el aislamiento de una bacteria con una frecuencia alta no es indicativo de la etiología del proceso, y así Nuytten y col. (1983) señalan frecuencias de aislamiento semejante entre grupos de équidos normales y enfermos.

Estamos de acuerdo con la mayoría de los autores consultados (Litteljohn, 1979; Whitwell y Greet, 1984; Mair y Lane, 1989) en señalar al *Streptococcus zooepidemicus* como el microorganismo potencialmente patógeno con mayor incidencia.

Ninguno de los artículos revisados han podido comprobar alguna relación entre la presencia de *Streptococcus zooepidemicus* y el desarrollo de lesiones típicas. En nuestro caso, la presencia de este microorganismo estaba asociada a neumonías intersticiales en fase inicial caracterizada por fenómenos infiltrativos-exudativos, hecho que contrasta con las afirmaciones de Nuytten y col. (1983), los cuales señalan el papel limitado de los microorganismos patógenos en el desarrollo de procesos respiratorios equinos.

Por otro lado, la ausencia de microorganismos en el aislamiento, no es

sinónimo de falta de lesión a nivel pulmonar, y de hecho la totalidad de los animales con crecimiento negativo (39%), presentaron lesiones de distintos grados, coincidiendo con lo descrito por Nuytten y col. (1983); sin embargo no estamos de acuerdo con estos autores en señalar la localización bronquiolar como lugar de asiento primario en estas lesiones.

En lo concerniente a la **valoración vírica**, el estudio reveló la detección de anticuerpos frente al virus influenza tipo A en un 21% de los casos estudiados. Sólo en dos caballos detectamos niveles de anticuerpos significativos para los virus A/Equi-1 y 2, diagnosticados histológicamente como neumonía intersticial linfoide y neumonía intersticial usual. Estos resultados nos hacen pensar, al igual que Turk y col. (1981) y Dahme y Weiss (1989), la existencia de una relación directa entre el virus influenza y el desarrollo de neumonías intersticiales espontáneas en los équidos.

Coincidimos con Buergelt y col. (1986) en señalar que la simple medida del título de anticuerpos en sangre es insuficiente para correlacionar el virus, en nuestro caso Influenza tipo A, con la inducción de un daño alveolar difuso, pero si sugiere la exposición al mismo.

Según los resultados microbiológicos es difícil afirmar que el origen de estas neumonías intersticiales sea infeccioso, sin embargo si podemos señalar que en un 47% de los procesos respiratorios estaban implicadas bacterias patógenas y en un 21% el virus influenza. Estos hallazgos ponen de manifiesto, al igual que los estudios de Dungworth (1982) la importancia que las infecciones respiratorias tienen como factor

etiológico en las neumonías intersticiales espontáneas.

Asimismo hemos de tener en cuenta la media de edad de nuestros caballos, estimada en ocho años; ésta concuerda con la edad de máximo riesgo de presentación de estas neumonías intersticiales crónicas señalada por McPherson y col. (1979b) y Cook y Rossdale (1963) y contrasta con la que señala Marcato (1990).

Hasta ahora hemos considerado el estudio etiológico de las neumonías intersticiales desde un punto de vista general, sin embargo hemos de señalar algunas peculiaridades observadas dentro de las distintas categorías establecidas por nosotros desde un punto de vista histológico.

Un 47% de las neumonías intersticiales usuales o clásicas, presentaron un crecimiento bacteriano negativo, y en un 83% no se detectaron anticuerpos frente al virus influenza. Esto deja un 33,8%, sin etiología determinada y que se incluían como neumonías intersticiales de causa desconocida, coincidiendo con el 30-40% que señala Liebow (1975) en el hombre y que denomina enfermedades criptogénicas o idiopáticas.

En cuanto a las neumonías intersticiales eosinofílicas, considerando un amplio estudio histológico que excluye la infestación parasitaria y el aislamiento microbiano negativo, nos hace pensar al igual que a Dixon y col. (1992) en équidos y Barrios y Selman (1991) en el hombre, que estos procesos son consecuencia de una respuesta alérgica.

Esta teoría es avalada por los estudios de Winder y col. (1988) y Mc Pherson

y col. (1979 a o b) que comprueban la participación de antígenos como polen y esporas de mohos (*Micropolispora faeni* y *Aspergillus Fumigatus*) mediante un test de piel y los consideran causantes de neumonitis sensibilizante en caballos. Sin embargo, los resultados histológicos hallados por estos autores, difieren del fuerte infiltrado eosinofílico encontrado en nuestros animales, no sólo a nivel del septo y luz alveolar, sino también en la luz y mucosa de bronquios y bronquiolos al igual que observaron Dixon y col. (1992) en un caso de neumonía eosinofílica aguda en un poni.

Las neumonías intersticiales linfoides mostraron un curioso resultado microbiológico, ya que fue negativo el cultivo bacteriano (60%) y presentaron títulos de anticuerpos víricos significativos frente a la variedad A/Equi-1 del virus influenza. Estos hallazgos concuerdan con las aportaciones realizadas por Barkersville y col. (1992) en monos rhesus, y Liebow (1975) y Barrios y Selman (1991) en medicina humana, al señalar el papel que desempeñan los virus en el desarrollo de este proceso pseudoneoplásico.

A diferencia de lo observado hasta ahora, quizás sean las NID y NICG las que presentan una etiología bacteriana más clara, hecho que no coincide con lo expuesto por Liebow (1975) en medicina humana.

Las neumonías intersticiales bronquitis obliterante son objeto de estudio controvertido en medicina humana y más recientemente en veterinaria. Nuestros hallazgos implican una infección vírica y complicaciones bacterianas secundarias, teoría que es apoyada por los estudios de Geddes (1991) y Costabel y Guzmán (1991)

en el hombre.

El principal problema estriba en dilucidar si la bronquitis obliterante se producen por contigüidad de lesiones intersticiales o por el contrario, es inicialmente un proceso neumónico intersticial que como consecuencia de una reinfección aerógena, desencadena las lesiones a nivel de los bronquiolos.

Por último, las NBI son un tema muy polémico y debatido últimamente no sólo desde el punto de vista etiológico sino también histopatológico. Algunos autores como Dungworth (1992) señalan como agente causante de esto proceso a virus, en concreto a Mixovirus; sin embargo nosotros sólo hemos podido apreciar cierta exposición al virus A/Equi-1 en tres ocasiones, y si ha existido siempre aislamiento bacteriano, fundamentalmente frente a *Streptococcus* sp.

Estamos de acuerdo con la mayoría de los autores consultados (McPherson y col., 1979b; Gerger, 1973; Robinson, 1991; Buergelt y col., 1986; Marti y col., 1991; Dungworth, 1982) en señalar que la etiología de las neumonías intersticiales equinas obedece a un fenómeno multifactorial, donde intervienen agentes infecciosos, tóxicos, alérgicos, así como factores fisiológicos del propio animal que influyen en la patogenía de la enfermedad.

Desde un punto de vista anatomopatológico, hemos realizado una **clasificación morfológica** de los pulmones equinos, considerando la distribución lesional al igual que otros autores han realizado en veterinaria (Dahme y Weiss, 1989; Thomson, 1988; Dungworth, 1983) coincidiendo parcialmente con ellas, ya que en nuestro caso, hemos

particularizado al pulmón del caballo con anatomía y fisiología distinta al del resto de las especies animales estudiada por esos autores.

Dentro de los pulmones **tipo A** hemos encuadrado aquellos animales que presentaban lesiones recientes de inflamación en el parénquima pulmonar, afectando tanto a la porción conductora como al parénquima pulmonar y localizándose en las regiones craneoventrales del pulmón, hallazgos que coinciden con las bronconeumonías de Jubb y Kennedy (1990), Dungworth (1992) y Thomson (1989) en otras especies domésticas. Esta división contrasta con la realizada por Dahme y Weiss (1989), al incluir las neumonías equinas recientes dentro de las neumonías alveolares focales, hecho insólito ya que en los équidos normalmente son lobulillares o lobares. Sin embargo, todos estos autores coinciden con nosotros en señalar que la vía de entrada de los agentes etiológicos en estos pulmones es aerógena.

La incidencia del 17% que presentaba este grupo es pequeña como consecuencia de la elevada edad media (8 años) de los animales estudiados, así como por la patología individual de los équidos; hecho que contrasta con las grandes concentraciones de animales y edades más bajas que originan una incidencia cercana al 80% en otras especies animales (ovinos, suinos, bovinos) y que causan graves pérdidas económicas (Thomson, 1988; Dahme y Weiss, 1989; Viel, 1983; Dungworth, 1982, 1992; Jubb y Kennedy, 1990).

Continuando con el estudio macroscópico comentaremos que los animales con **patrón B** presentaban pulmones pálidos y voluminosos, que no se retraían a la

apertura de la cavidad torácica, formando un bloque compacto. Esta descripción coincide con la realizada por numerosos investigadores (Dungworth, 1982, 1993; Buergelt y col., 1986; Winder y Fellenberg, 1987; Windr y col., 1988; Marcato, 1990) y se relaciona con neumonías intersticiales, hecho que compartimos con todos ellos.

Anatómicamente las lesiones de estos órganos se asentaban en el tercio inferior, en regiones dorsocaudales, coincidiendo con la mayoría de los autores consultados (Cagny y Gobert, 1880; Dungworth, 1982, 1992; Buergelt y col., 1986; Winder y Fellenberg, 1987; Winder y col., 1988; Marcato, 1990), asimismo coincidimos en que la vía original de entrada es normalmente hematógena y a veces aerógena.

Asimismo, estamos de acuerdo con Gerber (1973), Winder y Fellenberg (1987) y Grüning y col. (1989) en señalar una alta incidencia en estas imágenes macroscópicas y así en nuestros resultados representaba un 49%. Los autores consultados opinan que no hay generalmente relación clínico/patológica en estos procesos.

El último grupo de estudio macroscópico, pulmones **tipo C**, se caracterizaban por presentar algunas cicatrices conjuntivas en los lóbulos craneales y principalmente grandes masas de color blanquecino de tejido fibroso en el borde fundamental del lóbulo caudal. Descripciones semejantes han sido realizadas por distintos autores con denominaciones diferentes así Cagny y Gobert (1880) las denomina neumonías crónicas, Fröhner y Zwick (1932) se refieren a estos como esclerosis pulmonares,

Nieberle y Cohrs (1967) como neumonías lardáceas con peribronquitis nodosa y en la actualidad, Dungworth (1992) entre otros, las denomina neumonías intersticiales granulomatosas.

Diversos autores como Cagny y Gobert (1880), Thomson (1988), Winder y col. (1988), Winder y Fellenberg (1987), Dungworth (1982,1992) concuerdan con nosotros en señalar que las neumonías intersticiales crónicas se sitúan en el tercio inferior de los pulmones equinos. Estas lesiones pulmonares situadas primariamente en zonas superiores condicionan una deficiente oxigenación de los lóbulos caudales, los cuales de por sí están sometidos a fenómenos de hipoperfusión e hipoxia tal y como señalan Pascoe (1985), Winder y Fellenberg (1987) en équidos y Dungworth (1982) en otras especies animales.

Opinamos al igual que Kaup y col. (1985) que el origen de las neumonías intersticiales crónicas en los équidos está relacionado con fenómenos hipóxicos consecutivos a otros procesos respiratorios más frecuentes como bronconeumonías o COPD.

Por todo ello, considerando nuestros resultados macroscópicos creemos que los pulmones tipo C son el resultado final de los tipos A y B. Creemos que el patrón B obedece a lesiones primarias directas tal y como enuncian Cagny y Gobert (1880) y Fröhner y Zwick (1932) y el tipo A, es el resultado de reiteradas lesiones y contacto constante con el antígeno que origina la enfermedad.

Uno de los principales objetivos de nuestro estudio, centraba su atención en la

realización de una clasificación histopatológica sobre las neumonías intersticiales crónicas equinas, y evitar con los problemas terminológicos existentes.

Por esta razón pensamos que existen clasificaciones actuales sobre neumonías intersticiales en veterinaria, como la realizada por Dungworth en 1982 y actualizada en 1993. Sin embargo, creemos que la división establecida por este autor obedece más al curso clínico que a una sólida realidad patológica.

La falta de criterios comunes histopatológicos y terminológicos sobre las neumonías intersticiales, tanto en otras especies animales como en los escasos trabajos de medicina equina, nos obligaron a considerar otras clasificaciones realizadas en medicina humana por Liebow (1975) y Barrios y Selman (1991) de vigencia actual.

Estamos de acuerdo con esta clasificación, la cual señala diversas categorías (N.I.U, N.I.D, N.I.C.G, N.I.L y N.I.B.O) que incluyen características lesionales diferentes, pero que clínicamente se manifiestan como enfermedades intersticiales difusas de etiología incierta. Esta premisa está avalada por los estudios de Cotran y col. (1991) que consideran esta enfermedad como restrictiva al afectar al alveolo e intersticio, hecho que coincide en veterinaria con numerosos artículos Buergelt y col. (1986), Turck y col. (1981), Winder y Fellenberg (1987) entre otros, pero que sólo ha sido recogido bajo este punto de vista por Dixon y col. (1992) en caballos.

Con el fin de crear una clasificación válida y que reúna todos los posibles casos de neumonías intersticiales equinas basados en un fiel diagnóstico histopatológico hemos incluido dos categorías más: neumonía intersticial eosinofílica (N.I.E) y

neumonía bronquiolo-intersticial (N.B.I).

La neumonía intersticial eosinofílica (N.I.E) ha sido recogida por Barrios y Selman (1991) como una de las entidades de las enfermedades restrictivas y ha sido observada por primera vez en équidos por Dixon y col. (1992).

Neumonía bronquiolo-intersticial (N.B.I) ha sido una entidad muy cuestionada y polémica tanto clínica como histológicamente. Liebow y Carrington (1969) fueron los primeros en señalar este proceso en medicina humana, si bien posteriormente es reseñado por Costabel y Guzman (1991) como neumonía organizada criptogénica, mientras que en veterinaria no existen noticias de esta entidad como tal hasta los trabajos de Jubb y Kennedy (1990), Winder y col. (1988) y Dungworth (1992).

Estamos de acuerdo con Liebow (1975) y Davison y col. (1983) en considerar posiblemente a todas estas entidades como manifestaciones de neumonía intersticial, y que las distintas categorías meramente representan distintos estados en la patogénesis o distintas respuestas individuales a diferentes agentes.

En lo referente a los **estudios histopatológico e inmunocitoquímico**, han sido expuestos los distintos casos estudiados de acuerdo con el siguiente esquema:

N.B.I

N.I.E

N.I.U FASE I

FASE INICIAL

N.I.D

N.I.C.G

N.I.L

N.I.B.O

FASE INTERMEDIA

N.I.U FASE II

N.I.U FASE III

FASE FINAL

Así encontramos que los caballos con fase aguda de neumonía intersticial, caracterizada por fenómenos infiltrativos-exudativos, han sido encuadradas en la fase inicial en cuyo grupo se han incluido los animales diagnosticados con neumonía intersticial descamativa (N.I.D), neumonía intersticial de células gigantes (N.I.C.G), neumonía intersticial eosinofílica (N.I.E) y neumonía intersticial usual en fase I (N.I.U). Es importante señalar al igual que Dungworth (1982) en otros animales domésticos y Dixon y col. (1992) en équidos, que las neumonías intersticiales agudas espontáneas son muy infrecuentes, siendo objeto de estudio en contadas ocasiones.

Asimismo la fase intermedia agrupa a los animales con neumonía intersticial linfoide (N.I.L), neumonía intersticial bronquitis obliterante (N.I.B.O.) y neumonía intersticial usual en fase II (N.I.U). Estos procesos presentan fenómenos proliferativos y fibróticos tanto interalveolares como intraalveolares, lo cual contrasta con lo reseñado por Liebow (1975) en medicina humana.

En cuanto a la fase final, incluye la neumonía intersticial usual en fase III (N.I.U), caracterizada por la consolidación de los distintos mecanismos que desembocan en una fibrosis pulmonar con imágenes de "honeycomb" tal y como señalan Liebow (1975) y Barrios y Selman (1991) en el hombre, así como extensas masas que se extienden por el parénquima pulmonar coincidiendo con las descripciones histológicas de numerosos patólogos veterinarios ( Cagny y Gober, 1880; Fröhner y Zwick, 1932; Nieberle y Cohs, 1967; Dungworth, 1992).

Como vemos todas estas categorías presentan una serie de características comunes agrupadas en las tres fases establecidas desde un punto de vista inmunocitoquímico y que coinciden con las tres fases de la neumonía intersticial usual.

Los resultados histopatológicos observados durante la fase inicial demuestran la presencia de fenómenos agudos que contrastan con la definición clásica de las neumonías intersticiales establecida por Liebow (1975) en el hombre y Dungworth (1982) en otros animales domésticos y consideran a las neumonías intersticiales como condiciones inflamatorias crónicas donde predomina la respuesta proliferativa.

La mayoría de los autores consultados (Katzenstein y col., 1976; Liebow (1975), Auberbach y col. (1952), Fukuda y col. (1987), Barrios y Selman (1991), Pratt (1952), Honma y col. (1992) en el hombre y Dungworth, (1982, 1993), Buergelt y col. (1986) y Turck y col. (1981) en veterinaria están de acuerdo con nosotros en señalar el proceso de iniciación de las neumonías intersticiales espontáneas como consecuencia de un severo daño difuso de la pared alveolar, lo que origina una fase

exudativa intraalveolar que se continua con una rápida respuesta proliferativa y fibrótica.

Estamos de acuerdo con los principales investigadores acerca de las neumonías intersticiales como Liebow (1975) en medicina humana y Dungworth (1982) en veterinaria, los cuales enuncian que los fenómenos exudativos se producen por la lesión del endotelio de los capilares alveolares y los neumocitos membranosos.

Además, a diferencia de nuestros hallazgos y los observados en veterinaria por Dungworth, (1982), Turck y col. (1981), Buergelt y col. (1986); Liebow (1975) y Barrios y Selman (1991), señalan en el hombre que lesiones menos severas producen escaso daño, produciendo un discreto edema septal, el cual se cronifica y progresa hacia una fibrosis intersticial, dando lugar a la típicas imágenes pulmonares de "panal de abeja" ("honeycomb"), sin producirse la organización intraluminal.

Según la clasificación de Honma y col. (1992) sobre las neumonías intersticiales humanas, las considera como neumonías crónicas, agrupandolas dentro del epígrafe de neumonías intersticiales atípicas. Esta última forma coincide con nuestras observaciones de las neumonías equinas, las cuales encuadramos dentro de neumonías intersticiales crónicas, en contraposición a lo establecido por numerosos autores como Tuck y col. (1981) y Buergelt y col. (1986), los cuales recogen estas manifestaciones dentro de las neumonías intersticiales espontáneas agudas de los équidos.

Durante la fase inicial observamos fenómenos exudativo-infiltrativos, caracterizados por la presencia de un exudado eosinofílico en el lumen alveolar, así

como por un discreto edema del septo interalveolar, y el tejido conjuntivo que rodea bronquios y bronquiolos, hallazgos que han sido observado tambien por Auberbach y col. (1952), Liebow (1965,1975), Barrios y Selman (1991), Honma y col. (1992), Nishimura y col. (1992) y Usui y col. (1992) en medicina humana. En veterinaria, fenómenos semejantes han sido apreciados en neumonías intersticiales agudas espontáneas por numerosos autores (Dungworth, 1982, 1993; Buergelt y col., 1986; Turck y col., 1981; Dixon y col., 1992; Jones y Hunt, 1983; Lindley, 1978) como consecuencia de la acción de tóxicos vegetales, reacciones alérgicas o infecciones sobre todo víricas, y apoyados por numerosos estudios experimentales como los realizados por Adamson y col. (1988) utilizando a ratones que exponía a altas concentraciones de oxígeno; Breeze y col. (1984) en équidos utilizando menta púrpura o intoxicación con paraquat en simios y hombre (Fukuda y col., 1985; 1987).

Asimismo consideramos también la dilatación y proliferación capilar como uno de los primeros cambios que se aprecian en esta fase inicial aguda, hecho que ha sido constatado por Pratt (1958) y Hara y col. (1989) en medicina humana, apreciando la membrana de dichos capilares continua y positiva frente a las proteínas de membrana colágeno tipo IV y laminina.

Durante esta fase hemos podido comprobar al igual que otros autores en el hombre (Cam y col., 1984; Gusterson y col., 1984; Sakr y col., 1987) que la membrana basal del tracto respiratorio de los équidos contienen tanto laminina como colágeno tipo IV.

Bostman y col. (1991) utilizan al igual que nosotros material en solución tamponada para preservar la antigenicidad, realizando una digestión débil con pepsina para aumentar la reactividad frente a ambas proteínas de membrana basal, y en nuestro caso también frente a fibronectina.

En el caso de la fibronectina y colágeno tipo IV, conseguimos una buena inmunorreacción del material fijado en estas soluciones y embebidas en parafina; sin embargo la antigenicidad no se preserva de igual forma para la laminina, produciéndose una sobrefijación y ocultación de los epítomos tras la fijación e inclusión en parafina. Por lo que recomendamos para la laminina, al igual que Bostman y col. (1991), realizar cortes en congelación de material fresco utilizando el criostato.

En las tres etapas estudiadas hemos encontrado positividad a laminina y colágeno tipo IV en la superficie celular de fibroblastos y fibras musculares lisas, al igual que Wartiovaara y col. (1974), Hynes y col. (1976), Chen y col. (1977) y Davidson (1990).

En pulmones normales el septo alveolar aparece recorrido por unas líneas fuertemente positivas a estas proteínas de membrana, las cuales corresponden con la membrana basal de los alveolos y capilares, sin embargo en la fase inicial de las neumonías intersticiales equinas esta positividad aparece discretamente fragmentada y discontinua en algunos lugares, coincidiendo con los resultados de Hara y col. (1989) y Yousem y col. (1992) establecidos en individuos con fibrosis pulmonar.

En los lugares del pulmón donde los fenómenos infiltrativos-exudativos habían

provocado una disgregación de los elementos septales, podemos apreciar densos nidos de membranas basales positivas frente a laminina y colágeno tipo IV. Este fenómeno ha sido observado por Bostman y col. (1991) en procesos tumorales, como mecanismo de defensa para frenar el avance de células malignas. En nuestra opinión, corresponderían a los restos de membranas basales de las células epiteliales alveolares así como a acúmulos de estas proteínas de membrana, fundamentalmente colágeno tipo IV, en la membrana plasmática de células fibroblásticas (posiblemente miofibroblastos), como resultado de una proliferación celular en estas áreas, coincidiendo con lo observado por Bostman y col. (1991) en pulmón humano.

Un hecho de gran significación, observado al igual que nosotros por Liebow (1975), Barrios y Selman (1991) y Dungworth (1982, 1992) es la integridad de las membranas actuando como pilar para la reepitelización en fases intermedias y finales, aun cuando la lesión en la pared sea grave. Este fenómeno ha sido corroborado por nosotros, observando alveolos donde identificamos a ambas proteínas formando pequeños trazos continuos en el perfil del septo, los cuales aparecen tapizados por células grandes con citoplasma basófilo y núcleo central hipercromático (posibles neumocitos tipo II). Estos hallazgos coinciden con los de Kissler (1980), Kaup y col. (1985) y Buergelt y col. (1986) en la especie equina; Liebow (1975) y Barrios y Selman (1991) en el hombre y Dungworth (1992) en el perro.

Sin embargo contrasta con lo expuesto por Hara y col. (1989), cuyos estudios revelan que las membranas basales intactas sólo son necesarias en los primeros

estadios, observándose posteriormente reepitelizaciones sobre el tejido fibroso.

Tal y como hemos visto, la positividad de la membrana basal del septo alveolar, que en condiciones normales aparece como el eje principal se presenta desdibujada, siendo sustituida por una banda de fibronectina que recorre todo el esqueleto pulmonar y la membrana basal de los capilares alveolares; imágenes semejantes han sido observadas por Bostman y col. (1991) al describir la fibronectina como una glicoproteína asociada a la membrana basal del pulmón humano.

Las membranas hialinas han sido un rasgo constante en las distintas categorías establecidas, coincidiendo con los distintos autores no sólo en su presencia sino también en su composición tanto en medicina humana (Liebow, 1975; Cederberg y col., 1952; Fukuda y col., 1987) como en veterinaria (Buergelt y col., 1986; Dungworth, 1982, 1992).

Para Barrios y Selman (1991) en contraste con nuestros resultados, establecen que no existe siempre presencia de membranas hialinas en las neumonías intersticiales, solamente en el caso que el daño producido a la pared alveolar sea grave.

Con técnicas inmunocitoquímicas, observamos en esta etapa dos tipos de masas con una fuerte inmunorreacción frente a fibronectina. Unas que rodean los capilares alveolares con positividad difusa, y otras intraalveolares, que coinciden con las membranas hialinas, que se organizan de forma fibrilar. Un comportamiento similar ha sido observado por Chen y col. (1978) en cultivos celulares, coincidiendo en señalar a esta proteína de matriz como la columna inicial para la fibrinogénesis del

colágeno.

Asimismo hemos apreciado positividad intracelular a fibronectina en los macrófagos activados a nivel luminal, hecho que ha sido observado por numerosos autores (Crystal y col., 1984; Sugarman y col., 1985; Diergelmann y col., 1986; Mornex y col., 1986; Martinet y col., 1987). Algunos investigadores de enfermedades pulmonares intersticiales fibróticas como Sinkin y col. (1992) y Driscoll y col. (1992) han señalado mediante lavados broncoalveolares y estudios "in vitro" un considerable aumento de la liberación de fibronectina por macrófagos activados durante el desarrollo de la fibrosis pulmonar, utilizando este dato como indicador del proceso, sin embargo no es extrapolable en el caso de los équidos, ya que este fenómeno sólo es observado en las primeras dos fases, mientras que en la fase final donde existe la fibrosis más severa, se aprecia incluso una disminución de esta glicoproteína intracelularmente.

La inmunorreacción al colágeno en esta etapa de las neumonías esta muy disminuida, como consecuencia de la acción lítica (colagenasas) de las células inflamatorias durante la fase aguda, coincidiendo con los trabajos "in vitro" realizados por Huybrechts y col. (1979), Hauser y Vaes (1979), Werb y col. (1980), Reynolds (1985) y Chin y col. (1985).

Durante esta fase, el colágeno tipo I y III presentan una escasa inmunotinción en el parénquima pulmonar equino, la cual se reduce al tejido conjuntivo que rodea bronquios, bronquiolos y grandes vasos; esta distribución coincide con la observada

por nosotros en pulmón equino normal y Davidson y col. (1990) en pulmón normal humano.

El colágeno tipo III, presentó además cierta positividad, más evidente en las áreas de proliferación y dilatación vascular cercanas al peribronquio y peribronquiolo, lo que justifica el desarrollo inicial de la fibrosis intersticial. Este hallazgo es importante, ya que numerosos procesos respiratorios que asientan en las vías conductoras, terminan por lesionar el tejido conjuntivo que las rodea, hecho observado por Kaup y col. (1990) durante el COPD equino.

Además, según nuestro criterio justificaría la inclusión de las neumonías bronquiolo-intersticiales dentro del grupo de enfermedades restrictivas equinas, señalado por Dixon y col. (1992), contrastando con lo señalado por Dungworth (1992) al considerarlas como un tipo especial de bronconeumonía.

Por otro lado, el estudio y descubrimiento de los factores de crecimiento es reciente, por lo que el conocimiento que existe de ellos es superficial y en nuestra opinión se encuentra en una fase preliminar.

Esta teoría está justificada por la práctica inexistencia de trabajos "in vivo" y en contraste con muchos trabajos bioquímicos e "in vitro" para determinar algunas de sus actividades (Assoian y col., 1983, 1987; Roberts y col., 1983, 1985; Tucker y col., 1984; Shimokado y col., 1985; Pantazis y col., 1986; Mornex y col., 1986; Martinet y col., 1986; Osornio-Vargas y col., 1991).

Por este motivo, consideramos de gran relevancia el estudio de estos factores

de crecimiento por distintas razones: porque es un estudio "in vivo"; considerando la revisión realizada es el primer trabajo en pulmones equinos sobre factores de crecimiento (FC); por las similitudes del pulmón del equino y humano, por lo que el estudio del proceso fibrótico pulmonar en los équidos, puede tener cierta importancia en el hombre.

La principal acción de los FC es la de promover el crecimiento, actividad que comparte con otras sustancias como hormonas, neuropéptidos y nutrientes (Pardee, 1989; Wall, 1991).

La determinación de los factores de crecimiento presentes en las neumonías intersticiales equinas constituye un aspecto novedoso, y desconocido. Sólo existen muy escasas referencias en la bibliografía consultada acerca de la participación de los factores de crecimiento en la fibrosis pulmonar idiopática en el hombre (Antoniades y col., 1991; Fabisiak y col., 1992; Thornton y col., 1992).

Aún se reduce más el número de trabajos, si consideramos aquellos autores que realizan estudios inmunocitoquímicos sobre la fibrosis pulmonar, como los de Antoniades y col. (1991) en el hombre y no existe artículo alguno que investigue sobre estos factores de crecimiento en el curso de la fibrosis pulmonar en las neumonías intersticiales crónicas equinas.

De acuerdo con Puszteiy col. (1993) la reactividad de las células epiteliales y mesenquimatosas del pulmón equino frente a los anticuerpos PDGF y TGF  $\beta$  de hombre, demuestra la hipótesis de que cada familia de factores de crecimiento surge

de distintos genes ancestrales por duplicación y evolución divergente.

En nuestro caso, el anticuerpo PDGF humano, detecta las tres cadenas AA, AB y BB determinadas por Antoniades y Hunkapillen (1983).

Los macrófagos alveolares presentaron inmunorreacción frente al PDGF, coincidiendo con diferentes autores que realizan estudios "in vitro" (Shimokado y col., 1985; Martinet y col., 1986; Pantazis y col., 1986; Assoianm y col., 1987; Osornio-Vargas y col., 1991) y los realizados "in vivo" (Mornex y col., 1986; Antoniades y col., 1991). Sin embargo, la expresión de PDGF mostrada por los macrófagos era muy desigual, por lo que creemos al igual que Antonidades y col. (1991), que la máxima positividad se observa en macrófagos activados, pero contrasta con lo expuesto por Mornex y col. (1986) y Martinet y col. (1987) el cual señala que los macrófagos no activados también liberan cantidades significativas de PDGF.

La observación de una clara fluorescencia en las células epiteliales tanto a nivel bronquial como bronquiolar, coincide con las investigaciones realizadas por Mornex y col. (1986), Martinet y col. (1987) y Antoniades y col. (1991) en pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Esta positividad es manifiesta en las tres etapas establecidas, sin embargo existe un espectacular aumento a medida que se incrementa la fibrosis pulmonar. Este hecho confirma lo expuesto por Antoniades y col. (1991), los cuales señalan por primera vez la presencia de PDGF en células epiteliales no tumorales del hombre.

El anticuerpo TGF  $\beta$  utilizado es procedente de plaquetas porcinas, por lo que

se trata de un "pool" de las tres formas. Así identificamos las dos formas homodiméricas TGF  $\beta$  1 y 2 y el heterodímero TGF  $\beta$  1-2

Durante las etapas inicial y media la única positividad que observamos frente al TGF  $\beta$  corresponde al citoplasma de un escaso número de células epiteliales superficiales en bronquiolos con una marcada hiperplasia celular. Al igual que en el caso del PDGF, existía un incremento en el número de células epiteliales discretamente positivas a TGF  $\beta$  en la fase final; sin embargo no era tan espectacular como en el caso del PDGF. Este hallazgo no ha sido observado por ninguno de los trabajos consultados, y puede estar provocado por la disminución del pH "in vivo" tal y como señala Richardson y Campion (1988) en fetos de cerdo o por la pérdida de relación epitelio/matriz como consecuencia del efecto mitogénico producido por el PDGF sobre los fibroblastos coincidiendo con los trabajos de Mornex y col. (1986) y Assoian y col. (1987). Este fenómeno provocaría la expresión del TGF  $\beta$  en las células epiteliales, las cuales estimulan la proliferación y el aumento de colágeno; estas apreciaciones han sido realizadas por algunos autores como Berbard y col. (1990) y Antoniades y col. (1991) en procesos patológicos del hombre.

Todos los autores, tanto en patología humana como en veterinaria, coinciden con nosotros en señalar la instauración de los fenómenos proliferativos secundariamente a los exudativo-infiltrativos, los cuales junto con la organización intraluminal que se origina a partir de las membranas hialinas del lumen, determinan el inicio de la fase intermedia.

No coincidimos con algunos investigadores como Scadding y Hison (1967), Liebow (1975), Carrington y Gaenster (1978), Dixon y col. (1992) los cuales señalan que la inflamación progresiva crónica no es frecuente en los animales aunque si es el tipo más frecuente en el hombre.

Quizás coincidimos con ellos en que no se presenten en la mayoría de las especies domésticas, aunque consideramos que en los équidos existe una alta incidencia del proceso patológico objeto de nuestro estudio.

La imágen histológica que presenta la fase intermedia de las neumonías intersticiales equinas coincide con la neumonítis criptogénica organizada establecida por Davidson y col. (1983) y la neumonía organizada bronquiolitis obliterante de Eppler y col. (1985) en medicina humana, caracterizándose por el acúmulo de células inflamatorias y tejido fibroso en el intersticio, y fibrosis intraalveolar. A estos rasgos histológicos le añadimos la proliferación y persistencia de las células tipo II alveolares, hecho que coincide con Dungworth (1982).

La fibrosis pulmonar, es un tema de gran trascendencia en patología pulmonar humana. En los últimos años, este fenómeno ha experimentado un aumento considerable en la población mundial tal y como señalan Auberbach y col. (1952) y Spencer (1975). Este hecho ha desencadenado un estudio profundo del problema, aplicando los últimos avances tecnológicos, para descubrir las causas y desarrollo de la misma.

Ya hemos observado en la exposición de nuestros resultados las distintos tipos

de neumonías intersticiales que se aprecian en los caballos, con gran repercusión de algunas de ellas en la vida útil del animal, ya que pasan desapercibidas, pero merman su capacidad física (Viel, 1983; Kaup y col., 1990).

En la revisión de este apartado hemos podido comprobar desde el punto de vista experimental el desarrollo progresivo de esta lesión a nivel del pulmón del hombre y animales de experimentación (Adamson y col., 1988; Spencer, 1975; Liebow, 1965, 1975; Fukuda y col., 1985, 1987; Basset y col., 1986).

Una característica común en las distintas categorías elaboradas es el desarrollo de fibrosis pulmonar (Spencer, 1975; Harrixon y Laurent, 1991; Barrios y Selman, 1991).

Así, las neumonías intersticiales consideradas como infiltrativas-exudativas (neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial de células gigantes, neumonía intersticial eosinofílica, neumonía bronquiolo intersticial y neumonía intersticial usual en fase I) progresan tal y como señala Liebow y col. (1965) en medicina humana, hacia una fibrosis pulmonar total. Este mismo hecho sucede en las neumonías intersticiales equinas. Otros autores (Liebow, 1975; Spencer, 1975) han observado grados variables de fibrosis en el resto de las neumonías intersticiales (linfoide y con bronquiolitis obliterante) de la clasificación establecida por Liebow.

Liebow (1975), Barrios y Selman (1991) y Spencer (1975) establecen en el hombre, primariamente la fibrosis a nivel del septo interalveolar, desarrollando como proceso final el pulmón en panal de abeja. Esta idea contrasta con las investigaciones

realizadas por Fukuda y col. (1987), Katzenstein y col. (1976), Auerbach y col. (1952), Cederberg y col. (1965), quienes destacan la importancia que tiene la fibrosis intraalveolar a partir de los exudados que salen del septo como consecuencia de la lesión a nivel de la unidad alveolo-capilar (edema).

Coincidimos con estos investigadores y con las observaciones realizadas en veterinaria, por Dungworth (1982) en las que establece que el desarrollo de la fibrosis en las neumonías intersticiales equinas es consecuencia de lesiones severas, no sólo localizadas a nivel del septo interalveolar sino también del lumen alveolar.

Básicamente nuestros hallazgos histológicos del desarrollo de la fibrosis en el pulmón equino coinciden con los expuestos por Basset y col. (1986) y Fukuda y col. (1987) en medicina human y Dungworth (1982) en veterinaria. Incluso nos atreveríamos a asegurar que el fenómeno de fibrosis intraalveolar en el pulmón de caballo, juega un papel fundamental en el desarrollo de la fase final de la fibrosis pulmonar.

Así encontramos en la etapa intermedia, numerosas masas fibróticas incorporadas a la pared alveolar, como consecuencia de la organización de las membranas hialinas por parte de células fibroblásticas del septo, que son atraídas por factores quimiotácticos (tales como fibronectina) y de crecimiento (PDGF y fibronectina) liberados en la luz, las cuales constituyen la fibrosis intraalveolar. Estas observaciones coinciden con las expuestas por Postlethwaite y col. (1980, 1984) y Basset y col. (1986) en el curso de enfermedades intersticiales humanas y las

realizadas por Fukuda y col. (1985, 1987) en simios y hombre como consecuencia de la intoxicación con paraquant.

La organización de estas formaciones avanza, adhiriéndose al septo y provocando numerosas irregularidades en la luz alveolar, hecho que ha sido observado por Basset y col. (1986) y Fukuda y col. (1987) en el hombre; estas masas pueden progresar hacia las porciones conductoras bajas, originando bronquiolitis obliterante tal y como señalan Eppler y col. (1985) y Barrios y Selman (1991) en medicina humana.

Esta última imagen con septos engrosados, unido a la presencia de áreas enfisematosas concuerda con la imagen descrita por numerosos médicos como "pulmon en panal de abeja" ("honeycomb") (Basset y col., 19896; Fukuda y col., 1987; Harrison y Laurent, 1991; Barrios y Selman, 1991; Usui y col., 1992; Honma y col., 1992).

Al inicio de esta etapa, observamos que la proliferación y dilatación de los capilares alveolares reemplaza al parénquima alveolar. Las membranas de estos capilares aparecen continuas e inmunorreactivas frente a laminina y colágeno tipo IV, confirmando los hallazgos de Hara y col. (1989) en individuos con fibrosis pulmonar.

El considerable aumento de expresión de la fibronectina en esta etapa coincide con la manifestado por Limper y Roman (1992) en distintos procesos respiratorios del hombre. Esta fuerte positividad difusa frente a la fibronectina no sólo se localiza a nivel del tejido conjuntivo que rodea bronquios y bronquiolos sino también en el septo

alveolar, siendo más marcada en zonas pericapilares.

Asimismo, considerando los acúmulos de fibronectina en zonas de regeneración epitelial (por parte de neumocitos tipo II) y las masas intraluminales fuertemente positivas, con gran número de células fibroblásticas jóvenes asentadas sobre zonas ricas de fibronectina, podemos indicar al igual que Limper y Roman (1992) que esta glicoproteína extracelular tiene una función promotora de la proliferación y diferenciación celular.

Estos hallazgos justifican los resultados de Hara y col. (1989) que indican una reepitelización independiente de las membranas basales intactas, ricas en colágeno tipo IV y laminina, produciéndose la regeneración epitelial sobre tejido fibroso. Imágenes semejantes han sido halladas por nosotros durante la fase final de las neumonías intersticiales crónicas equinas, donde no encontramos positividad frente al colágeno tipo IV y laminina, a excepción de las membranas de los capilares dispersos entre las masas conjuntivas, sin embargo sí encontramos áreas de reepitelización.

Las placas intraluminares observadas en fases de fibrosis aparecen ligeramente teñidas frente a colágeno tipo III, más marcado si existía proliferación de células fibroblásticas, hecho que coincide con las observaciones de Bateman y col. (1981) y Raghu y col. (1985) en tejido fibroso humano, ya que considera que este aumento en fases tempranas está relacionado con la presencia de miofibroblastos.

En la fase intermedia observábamos el máximo aumento de colágeno tipo III como consecuencia de la fibrosis septal y la organización conjuntiva de las masas

intraalveolares por parte de las células que migran del septo.

A diferencia de esto, la positividad apreciada frente al colágeno tipo I en esta fase intermedia fué focal a nivel del septo, permaneciendo estática alrededor de bronquios y bronquiolos, aunque en estadios finales de fibrosis adquiriría nuevamente un aumento, con patrón semejante al colágeno tipo III. Estos resultados coinciden, con lo observado por la mayoría de los autores (Bateman y col., 1981; Raghu y col., 1985; Shahzeidi y col., 1991) en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, los cuales señalan el aumento de colágeno tipo III durante fases inicial e intermedia, existiendo posteriormente una vuelta a la producción del colágeno tipo I.

Posiblemente la fibronectina y PDGF es liberado por los macrófagos en los primeros momentos de las neumonías intersticiales equinas, al igual que Sugarman y col. (1985) y Diergelmann y col. (1986) comprobaron "in vitro" con macrófagos alveolares procedentes de individuos con fibrosis pulmonar idiopática.

Quizá esta liberación de fibronectina y PDGF en la fase inicial, produzcan una proliferación fibroblástica que originaría un aumento en el depósito de proteínas de matriz extracelular, tal y como señala Davidson (1990) en medicina humana, observando un aumento especialmente de fibronectina y colágeno tipo III. Este hecho es característico de una fibrosis pulmonar activa y crónica, según expone Wick y col. (1992) en individuos con la enfermedad del "pulmón de granjero".

A medida que avanza el proceso de fibrosis en la fase intermedia se observa una fuerte positividad al colágeno tipo I en las paredes alveolares, que se hace más

intensa en fases finales de fibrosis, tanto en el septo como en las masas intraluminales adheridas a este. Por tanto, estamos de acuerdo con la mayoría de los autores de medicina humana (Wick y col., 1992; Shahzeidi y col., 1991; Bateman y col., 1981; Raghy y col., 1985; Mc Donald y col., 1986) en señalar al colágeno tipo I como el colágeno predominante en las áreas establecidas de fibrosis pulmonar y al colágeno tipo III como típico de lesiones fibróticas iniciales.

La fase intermedia se caracterizó por una gran actividad proliferativa después de la lesión aguda. Así coincidiendo con Bitterman (1983, 1986) en cultivos celulares de fibroblastos y Martinet y col. (1987) en tejido pulmonar fibrótico, hemos observado la presencia de células fibroblásticas positivas, a nivel citoplasmático, frente a PDGF en las masas intraalveolares adosadas al septo alveolar. Esta fuerte positividad de los fibroblastos en las masas intraalveolares es un hecho confirmado según Chen y col. (1992) por la actividad fibroproliferativa, consecutiva a la acción del PDGF macrofágico de forma paracrina y de forma autocrina fibroblástica.

La bibliografía consultada no ha desvelado ninguna nueva aportación sobre las extensas masas de tejido conjuntivo que sustituyen amplias zonas de parénquima pulmonar durante la fase final de estos procesos crónicos en los équidos, y por ello siguen vigentes los estudios realizados por Cagny y Gobert (1880), Fröhner y Zwick (1932) y Nieberle y Cohrs (1967), denominando a estas lesiones dentro de la neumonía lardácea. Estas imágenes se producen como consecuencia de un daño difuso extenso que produce, tal y como antes señalamos, la progresión fibrótica tanto a nivel

intersticial como intraluminal.

Histológicamente observamos en esta etapa algunas oquedades entre las masas fibróticas, cuyo contorno aparece recubierto por una células epiteliales cúbicas con nucleo central. Resultados semejantes han sido apreciados por Spencer (1975), Hara y col. (1989) y Dungworth (1982, 1992). El origen de la reepitelización propuesto por nosotros coincide con dichos trabajos señalando que proceden de células bronquiolares de reserva, y que en ocasiones sufren una metaplasia hacia células tipo II de forma ciliada o células tipo fetal. En etapas iniciales de fibrosis se observan imágenes parecidas, confundiéndose con procesos tumorales coincidiendo con Spencer (1975) y Liebow (1975) en medicina humana y Dungworth (1982, 1992) en veterinaria; sin embargo, en las fases finales apreciamos una imagen más o menos glandular, como consecuencia de la reepitelización directamente sobre el tejido conjuntivo, con pérdida de membranas basales, todo ello conlleva además fenómenos de inflamación y fibrosis septal. Esta descripción histológica puede coincidir con una lesión preneoplásica, y de hecho algunos autores como Zatuchni y col. (1953), Beaver y Shappiro (1956), Meyer y Liebow (1965) y Liebow (1975) en el hombre y Dungworth (1982, 1992) en animales domesticos y de experimentación, señalan la posibilidad de desarrollar tumores bronquioalveolares consecutivos a procesos fibróticos crónicos, hechos que hasta la fecha no se han podido confirmar.

En esta última fase, la positividad a la fibronectina es puntual en el septo, sin embargo en las áreas de colágeno extensas, presentan una positividad fibrilar formado

una trama que coincide con la distribución de colágeno I, fenómeno que también ha sido observado por Bornstein y Ash (1977) y Vaheri y col. (1978).

Sin embargo, zonas que habían sufrido lesiones severas del parénquima, presentan extensas masas de tejido conjuntivo donde podemos observar diferentes imágenes, en las cuales podemos observar inmunorreacción tanto extra como intracelular, tanto más fuerte y amplia frente al procolágeno tipo I y en menor extensión al III, lo que demuestra en este sentido y de acuerdo con Raghu (1985) el papel fisiológico del colágeno tipo III en etapas iniciales del proceso de fibrosis pulmonar.

Algunas de las áreas anteriormente señaladas presentaron una máxima proliferación celular con una discreta positividad citoplasmática frente a ambos tipos de procolágeno (I y III) y escasa matriz totalmente negativa, hecho que no ha sido observado por ninguno de los autores consultados.

Por ello, consideramos que la matriz que liberan al medio exterior, pueda corresponder a alguna de las proteínas de matriz extracelular no estudiada por nosotros como glicosaminoglicanos o proteoglicanos, las cuales según Hedman y col. (1982) y Roberts (1991) están muy interrelacionadas con la compleja malla de fibronectina en estas áreas; e incluso algún tipo de colágeno como el tipo VI o VII, tal y como señala Minor (1980), Davidson (1990) y Harrison y Laurent en fibrosis pulmonar humana.

En la fase final caracterizada por una fibrosis pulmonar total observamos áreas fibroproliferativas con gran número de fibroblastos con fluorescencia a PDGF en el

citoplasma, frente a otras zonas donde aumenta el colágeno y disminuye el número de células positivas. Este hallazgo coincide con las observaciones "in vitro" realizadas por Fabisiak y col. (1992) con fibroblastos pulmonares humanos, y ponen de manifiesto el papel que juegan los fibroblastos no sólo como productores de colágeno sino también de PDGF.

Las fibras musculares lisas del músculo de Reissensen de los bronquiolos también manifestó una discreta positividad a PDGF, confirmando los estudios de Mendoza y col, (1990) acerca de la expresión de las fibras musculares lisas a este factor de crecimiento durante la gestación.

En ninguna de las etapas anteriores, los fibroblastos presentaron positividad frente al TGF  $\beta$ . Es en esta etapa final donde se aprecia una discreta fluorescencia citoplasmática en los fibroblastos de las masas conjuntivas, posiblemente como consecuencia de un aumento en la sensibilidad al estímulo de numerosas citoquinas, hecho que concuerda con los trabajos de Davidson (1990).

Hasta ahora las únicas fuentes de TGF  $\beta$  observadas correspondían a plaquetas, macrófagos y linfocitos (Assoian y col., 1987), hechos que no han sido observados por nosotros.

Según Roberts y col. (1985) el TGF  $\beta$  es un factor de crecimiento negativo, cuyo fallo en la expresión determina un crecimiento incontrolado de los fibroblastos. Este fenómeno es observado en las dos primeras fases de las neumonías intersticiales equinas; por el contrario durante la fase final observamos una ligera fluorescencia en

las áreas de proliferación fibroblástica, pensando que podrían en este período estimular la producción de colágeno tal y como muestran estudios "in vitro" (Fine y Goldstein, 1987; Igotz y Massagué, 1986; Igotz y col., 1987; Yoshida y col., 1991; Williams y col., 1991). De hecho la positividad se conserva relativamente incluso en aquellas áreas con abundancia de matriz extracelular, y desaparece en aquellas zonas de fibrosis madura.

Estas observaciones contrastan con las realizadas por numerosos autores (Sporn y Todaro, 1980; Roberts y col., 1985; Kaplan y col., 1982; Doolittle y col., 1983; Waterfield y col., 1983; Downward y col., 1984), quienes establecen la hipótesis autocrina, según la cual la transformación maligna debía resultar de la expresión positiva inapropiada a factores de crecimiento, que eran producidos por células autotransformadas.

Hoy en día, el estudio de la fibrosis en medicina humana y animales de experimentación se dirigen tal y como señalan numerosos autores (Spencer, 1975; Liebow, 1975; Barrios y Selman, 1991; Harrison y Laurent, 1991; Dungworth) a desvelar los elementos que provocan dos de los fenómenos fundamentales que acontecen en dicho proceso: la proliferación fibroblástica y el depósito de colágeno.

En el caso de la fibrosis pulmonar en los équidos parece estar más ligado a la proliferación fibroblástica producida principalmente por PDGF y fibronectina, que al hecho de estimular la producción de colágeno; sin embargo, el depósito se va incrementado de forma indirecta como consecuencia del aumento en el número de

células que lo producen, hecho que ha sido comprobado por Antoniades y col. (1991) y Fabisiak y col., (1992) en el hombre y de forma más directa en las últimas fases por el estímulo que produce el TGF  $\beta$  procedente en este caso de células epiteliales en las primeras etapas y fibroblastos en la fase final.

Estos resultados nos alientan para seguir desvelando algunos de los mecanismos más íntimos del proceso de fibrosis pulmonar en los équidos implicados en la hemorragia pulmonar inducida por el esfuerzo, así como para determinar en que grado participan estos procesos crónicos en el desarrollo de neoplasias y que rasgos histológicos e inmunocitoquímicos marcan la diferencia.

## **CONCLUSIONES**

---

## CONCLUSIONES

- 1°.- En los pulmones de 100 animales estudiados (8 muestras diferentes de cada animal) hemos observado los siguientes tipos de neumonías: neumonía intersticial usual (68%), neumonía bronquiolointersticial (10%), neumonía intersticial descamativa (8%), neumonía intersticial linfoide (5%), neumonía intersticial bronquitis obliterante (5%), neumonía intersticial eosinofílica (2%) y neumonía intersticial de células gigantes (2%).
- 2°.- Los siete tipos histológicos enunciados se corresponden con tres fases de neumonía intersticial: Fase inicial: Caracterizada por la presencia de fenómenos exudativos-infiltrativos; Fase intermedia: Donde se observa una marcada proliferación vascular y celular, y Fase final, con presencia de fibrosis pulmonar total. Estas tres fases podrían encuadrarse en los tipos A, B y C, descritos macroscópicamente.
- 3°.- En un 47% de las neumonías intersticiales estudiadas apareció etiología infecciosa; bacterias principalmente de los géneros Streptococcus, Stafilococcus y Pseudomonas y en un 21% presencia de anticuerpos víricos de Influenza; siendo especialmente significativa la relación de las neumonías intersticiales linfoides, con la presencia de anticuerpos frente al virus Influenza A/Equi-1.
- 4°.- El aislamiento microbiológico negativo, no implica ausencia de lesiones, y así un 33,8% de las neumonías intersticiales usuales no presentaron ni crecimiento bacteriano

ni detección de anticuerpos víricos en sangre.

5°.- Las membranas basales inmunorreactivas a colágeno tipo IV y laminina, son muy evidentes en la fase inicial y parecen ser el punto de partida de la reepitelización; sin embargo durante la fase final de fibrosis, no observamos positividad subepitelial frente a ambas proteínas de matriz extracelular.

6°.- La fibronectina es la primera proteína de matriz extracelular detectada en la fase inicial de neumonías intersticiales crónicas equinas, y se mantiene en etapas posteriores; actuando como patrón para la colagenización en la fase final de fibrosis.

7°.- La presencia de colágeno tipo III durante la fase inicial y su aumento en la fase intermedia es característica de una fibrosis pulmonar activa y crónica, siendo sustituido en etapas posteriores por el colágeno tipo I, típico de una fibrosis madura, que se encuadra en el denominado "pulmón de panal de abeja".

8°.- La participación de los factores de crecimiento en las neumonías intersticiales crónicas equinas es muy desigual. El PDGF se observa en todas las fases tanto en fibroblastos como en macrófagos y células epiteliales, comprobando en la fase de fibrosis que actúa como un potente activador de proliferación fibroblástica.

Por otro lado el TGF  $\beta$  parece estimular discretamente en la fase final la producción de colágeno, actuando como fuentes de este factor fibroblastos y células epiteliales, pero en pequeña cuantía.

## **RESUMEN**

---

## RESUMEN

En este trabajo hemos realizado un estudio sobre las neumonías intersticiales crónicas equinas, estableciendo una clasificación histopatológica basada en los trabajos de Liebow (1975) y Barrios y Selman (1991) en el hombre: neumonía intersticial usual (N.I.U.=68%), neumonía bronquiolo intersticial (N.B.I.=10%), neumonía intersticial descamativa (N.I.D.=8%), neumonía intersticial linfoide (N.I.L.=5%), neumonía intersticial bronquiolititis obliterante (N.I.B.O.=5%), neumonía intersticial eosinofílica (N.I.E.=2%) y neumonía intersticial de células gigantes (N.I.C.G.=2%), clasificándolas en función de las características lesionales y el grado de fibrosis común que presentan. Estos tipos los hemos agrupado en tres fases, las mismas que utilizamos en el estudio inmunocitoquímico.

Todas estas categorías obedecen a distintas respuestas frente a diferentes agentes infecciosos, sobre todo virus (A/Equi-1) y bacterias (*Streptococcus* sp., *Stafilococos* sp., *Pseudomonas* sp.) y presentan tres patrones macroscópicos diferentes.

La fase inicial se caracteriza por fenómenos exudativos-infiltrativos; la fase intermedia muestra una marcada proliferación no sólo vascular sino también celular (células fibroblásticas), y por último la fase final presenta una proliferación y acúmulo de proteínas de matriz, sobre todo tipo colágeno. Durante estas tres fases podemos observar como progresa la fibrosis pulmonar en los équidos como consecuencia del avance de la fibrosis tanto inter como intraalveolar, dando como resultado final la imagen histológica de pulmón en panal de abeja.

El estudio inmunocitoquímico reveló en la fase inicial una positividad lineal y discontinua en el septo y lumen alveolar frente a laminina y colágeno IV, reaccionando frente a estos anticuerpos las membranas basales de los capilares y la superficie de células fibroblásticas. Esta inmunorreacción se mantiene e incluso aumenta en la fase intermedia como consecuencia del proceso de angiogénesis, quedando reducida a la membrana basal de un escaso número de vasos entre las masas fibróticas durante la fase final.

La fibronectina tiene su máxima positividad en la fase inicial e intermedia presentándose no sólo como una proteína de matriz extracelular asociada a la membrana del epitelio y capilares, sino también en el citoplasma de los macrófagos activados. Ambas fases presentan una fuerte reacción inmune frente a la fibronectina especialmente en las masas perivasculares e intraalveolares con una positividad más o menos fibrilar que es la base para la fibrinogénesis del colágeno. Sin embargo en la fibrosis total de las neumonías intersticiales equinas se aprecia una disminución con una reacción más difusa a manera de red.

Tanto el colágeno tipo I como el III presentaron una disminución marcada durante la primera fase, para producirse un espectacular aumento del colágeno tipo III en el intersticio y en las masas intraalveolares en la fase intermedia. El colágeno tipo I presentó escasa positividad en estas primeras etapas, aunque su reacción fue muy intensa. En la fase final existe un cambio significativo en la producción de colágeno tipo III a tipo I, pudiendo observar una positividad heterogénea en las distintas áreas de fibrosis frente a ambos tipos de colágeno.

La participación de los factores de crecimiento fue muy diferente en las neumonías crónicas equinas. Así, macrófagos, células epiteliales y fibroblastos fueron identificados como fuentes del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) durante el proceso de fibrosis pulmonar equina. El papel que juega parece estar relacionado con un efecto mitógeno para las células epiteliales y sobre todo fibroblastos. En el caso del factor de crecimiento transformante (TGF  $\beta$ , su participación en el proceso de la fibrosis pulmonar equina, no está clara, ya que sólo actúa en las últimas fases, estimulando debilmente a los fibroblastos para incrementar la producción de colágeno.

Por tanto, consideramos que el proceso de fibrosis pulmonar en las neumonías intersticiales crónicas equinas es consecuencia del estímulo mitógeno sobre los fibroblastos de la fibronectina en las primeras etapas y el PDGF en fases finales.

## **SUMMARY**

---

## SUMMARY

In this work we have realized a study about equine chronic interstitial pneumonia establishing a histopathological classification based in the Liebow (1975) and Barrios and Selman (1991)'s papers on human medicine: usual interstitial pneumonia (UIP=68%), bronchiolointerstitial pneumonia (BIP=10%), desquamative interstitial pneumonia (DIP=8%), linfoide interstitial pneumonia (LIP=5%), bronchiolitis obliterans interstitial pneumonia (BOIP=5%), gigant cells interstitial pneumonia (GCIP=2%) and eosinophilic interstitial pneumonia (EIP=2%). We consider for classification the common characteristic histopathological and the grade of fibrosis that the pneumonias presented. We have grouped together the different types of pneumonias in three phases, the same that we used in the immunocytochemical study. All these categories are different answers against several infectious agents, overall virus (A/Equi-1) and bacterias (*Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp.) presented three different macroscopic pattern.

Initial phase was characterized by exudative and infiltrative fenomenas; intermediate phase show a vascular and cellular strong proliferation, and the final phase presented celular proliferation and extracellular protein acumulation, mainly collagen. In all the phases, pulmonary fibrosis in the horses was caused by an advance of the inter and intraalveolar fibrosis which originated the histological image of the honeycomb lung as final result.

We observed a lineal and discontinous positivity in the septa and lumen alveolar against laminin and type IV collagen localized in the basement membranes of the capillaries and the surface of fibroblastic cells during initial period. This immunorreaction was maintained and even increased in the intermediate phase because of the angiogenesis process and were reduced at the basement membranes of a few number of vessels between fibrotic masses during the last phase.

Fibronectin has it is strongest positivity in the intial and intermediate phase, it is presented not only as a extracellular matrix glycoprotein associated to the epithellum and capillaries basal membranes, but also in the cytoplasm od active macrophages. Both phases presented the gratest immunostaining againts fibronectin specially in the perivascular and intraalveolar mases with more or less fibrillar positivity which is the pattern for the fibrinogenesis of collagen. However in the total fibrosis of the equine interstitial pneumonia we appreciated a decrease with a more diffuse reaction similar to network.

Type I and type III collagen presented a severe decrease in the first phase, producing a espectacular increase of the type III collagen in the interstitium and the intraalveolar masses in the intermediate phase. Type I collagen presented scarce positivity in these first period, nevertheless it is immunorreaction was very intense. In the final phase there is a mean change in the production of type III collagen for type I collagen, we could observe a heterogenous positivity in the different areas of fibrosis againts both types of collagen.

The contribution of growth factors were very different in the equine chronic pneumonia. So, macrophages, epithelial cells and fibroblasts were identificados as a source of PDGF during the equine pulmonary fibrosis.

The main role could be relationated with mitogen effect for the epithelial cells and overall fibroblasts. On the other hand, the function of the TGF  $\beta$  is not clear yet in the equine pulmonary fibrosis, since it that only participate in the last phase, stimulating weakly the fibroblasts to increase the production of collagen.

Finally, we consider that the pulmonary fibrosis process in the equine chronic interstitial pneumonia is consequence of mitogen stimulation on the fibroblasts by fibronectin in the first period and PDGF in the last phase.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**BIBLIOGRAFIA**

- \* Adamson, I.Y.R. y Bowden, D.H. (1979). Bleomycin-induced injury and metaplasia of alveolar type 2 cells: Relationship of cellular responses to drug presence in the lung. Am.J.Pathol., **96**, 531-542.
- \* Adamson, P.J.W.; Wilson, W.D.; Hirsh, C.; Baggot, J.D. y Martin, L.D. (1985). Susceptibility of equine bacterial isolates to antimicrobial agents. A.I.V.R., **46**, 447-450.
- \* Adamson, I.Y.R. (1985). Cellular kinetics of the lung. En Handbook of Experimental Pharmacology. Editado por H.P. Witschi, J.D. Brain. Springer, Verlag. Berlin. 289-317
- \* Adamson, I.Y.R.; Young, L. y Bowden, D.H. (1988). Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis. Am.J.Pathol., **130**, 377-383.
- \* Alder, K.B.; Callahan, L.M. y Evans, J.N. (1986). Cellular alterations in the alveolar wall in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Am.Rev.Resp.Dis., **133**, 1043.
- \* Alitalo, K.; Kurkinen, M.; Vaheri, A.; Krieg, T. y Timpl, R. (1980). Extracellular matrix components synthesized by human amniotic epithelial cells in culture. Cell., **19**, 1053-1062.
- \* Almström, J. y Lauritzson, I. (1953). Provoking symptoms of pulmonary emphysema in horses aerogenically and alimentarily. Proc.World Vet. Congr. Stockholm., 669-674.

- \* Alexander, A.F. (1959). Chronic Alveolar Emphysema in the horse. Am.Rev.Respir.Dis., **80**, 141-146.
- \* American Association of Equine Practitioners (1988). 5th eds. Official Guide for Determining the Age of the Horse.
- \* American Thoracic Society (1987). Chronic Bronchitis, Asthma and Pulmonary Emphysema. A Statement by the Committee on Diagnostic Standards for Non-Tuberculous Respiratory Diseases. Am.Rev.Respir.Dis., **85**, 762-768.
- \* Amis, T.C.; J.R. Pascoe y W. Hornof (1984). Topographic distribution of pulmonary ventilation an perfusion in the horse. Am.J.Vet.Res., **45**, 1597-1601.
- \* Antoniades, H.N. y Owen, A.E. (1982). Platelet-derived growth factor. En *Hormonal Proteins and Peptides*. Vol. 12. C.H.L. editor. Academic Press. New York.
- \* Antoniades, H.N. y Hunkapiller, M.W. (1983). Human platelet derived growth factor (PDGF): aminoterminal amino acid sequence. Science., **220**, 963.
- \* Antoniades, H.N.; Pantazis, P. y Owen, A.J. (1987). Human platelet derived growth factor and the sis/PDGF-2 gene. En *Oncogenes, genes and growth factors*. Guroff, G.; Wiley, J. y Sans. New York.
- \* Anzano, M.A.; Roberts, A.; Meyers, C.; Komoriya, A.; Lamb, L.; Smith, J. y Sporn (1982). Synergistic interaction of two clases of transforming growth factors from murine sarcoma cells. Cancer Res., **42**, 4776-4778.
- \* Assoian, R.K.; Komoriya, A.; Meyers, C.A.; Miller, D.M. y Sporn, M.B. (1983). Transforming growth factor beta in human platelet. Identification of a major storage

- site, purification and characterization. J Biol Chem, **258**, 7155-7160.
- \* Assoian, R.K. y Sporn, M.B. (1986). Type  $\beta$  transforming growth factor in human platelets. Release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. J Cell Biol, **102**, 1217-1223.
- \* Assoian, R.K.; Fleurdelys, B.E.; Stevenson, H.C.; Miller, P.J.; Madtes, D.K.; Raines, E.W.; Ross, R. y Sporn, M.B. (1987). Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. Proc Natl Acad Sci USA, **84**, 6020-6024.
- \* Auerbach, S.H.; Mims, O.M. y Goodpasture, E.W. (1952). Pulmonary fibrosis secondary to pneumonia. Am J Pathol, **28**, 69-88.
- \* Avila, R.E.; Selman, M.; Bravo, M. y Antoniades, H.N. (1987). Detection of platelet-derived growth factor in situ in human pulmonary fibrosis by indirect immunofluorescence. J Cell Biol, **105**, 275a (abst.)
- \* Baker, A.H. (1990). Theory and practice of veterinary medicine and surgery. Alex Eger. Chicago.
- \* Barkerville, A.; A.D. Ramsay; B.J. Addis; M.J. Dennis; R.W. Cook; M.P. Cranage y P.J. Greenaway (1992). Interstitial Pneumonia in Simial Immunodeficiency virus infection. J Pathol, **167**, 241-247.
- \* Barnes, P.J. (1992). Asthma. British Medical Bulletin, Vol. **48**. Published for the British Council. Edinburgh.
- \* Barrett, T.B.; Gajdusek, C.M.; Schwart, S.M.; Schwartz, J.K. y Bendit, E.P. (1984).

Expression of the  $\alpha 1$  gene by endothelial cells in culture and in vivo. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., **81**, 6772.

\* Basset, F.; Ferrans, V.J.; Soler, P.; Taemura, T.; Fukuda, Y. y Crystal, R.G. (1986). Intraluminal fibrosis interstitial lung disorders. Am.J.Pathol., **122**, 443-461.

\* Basset, F.; Lacronique, J.; Ferrans, V.J.; Fukuda, Y. y Crystal, R.G. (1984). Intraalveolar fibrosis: A second form of fibrosis of the interstitial lung disorders (Abstr.) Am.Rev.Respir.Dis., **129**, A-72.

\* Basset, F. y Soler, P. (1987). Connective tissue in pulmonary alveolar damage and repair. Bull.Fijnul.Longafw., **12**, 68.

\* Barrios, R. y Selman, M. (1991). Morphological aspects of chronic interstitial lung diseases. Cap. 9. En *Interstitial Pulmonary Diseases: Selected Topics*. Selman, M. y Barrios, R. (eds). CRC Press. Boca Ratón (Florida). 197-228.

\* Bateman, E.D.; Turner-Warwick, M. y Adelman-Grill, B.C. (1981). Immunohistochemical study of collagen types in human foetal lung and fibrotic lung disease. Thorax., **36**, 645.

\* Beaver, D.L. y Shapiro, J.L. (1956). A consideration of chronic pulmonary parenchymal inflammation and alveolar cell carcinoma with regard to a possible etiologic relationship. Am.J.Med., **21**, 879-887.

\* Beech, J. (1991). *Equine Respiratory Disorders*. Lea & Febiger. Philadelphia.

\* Bernard, J.A.; Lyons, R.M. y Moses, H.L. (1990). The cell biology of transforming growth factor  $\beta$ . Biochem.Biophys.Acta., **1032**, 79-87.

- \* Betsholtz, C.; Johnson, A.; Heldin, C.H.; Westermark, B.; Lind, P.; Urdea, M.S.; Eddy, R.; Shows, T.B.; Philpott, K.; Mellor, A.L.; Knott, T.J. y Scott, J. (1986). cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines. Nature, **320**, 695-699.
- \* Bezançon, F.; Jong, S.I. y Wilbert, M. (1922). L'Emphysème pulmonaire chez l'homme et chez les animaux. Collection de Travaux de Pathologie Comparée. Launay y Fils. Paris.
- \* Bitterman, P.B.; Adelberg, S. y Crystal, R.G. (1983). Mechanisms of pulmonary fibrosis. Spontaneous release of the alveolar macrophage-derived growth factor in the interstitial lung disorders. J.Clin.Invest., **72**, 1801-1813. \* Bitterman, P.B.; Wewers, M.D.; Rennard, S.I.; Adelberg, S. y Crystal, R.G. (1986). Modulation of alveolar macrophages driven fibroblast proliferation by alternative macrophage mediators. J.Clin.Invest., **77**, 700-708.
- \* Bornstein, P. y Ash, J.F. (1977). Cell surface associated structural proteins in connective tissue cells. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, **74**, 2480-2484.
- \* Bosman, F.T.; Havenith, M.G.; Visser, R.; Cleutjens, J.P.M. (1991). Basement membranes in neoplasia. Vol. 24. En Progress in Histochemistry and Cytochemistry. Toronto.
- \* Boucault, J.C.; Darribere, T.; Boulekbache, H. y Thiery, J.P. (1984a). Antibodies to fibronectin prevent gastrulation but do no perturb neurulation in gastrulated amphibian embryos. Nature, **307**, 364-367.

- \* Boucault, J.C.; Darribere, T.; Poole, T.J.; Aoyama, H.; Yamada, K.M. y Thiery, J.P. (1984). Biological active synthetic peptides as probes of embryonic development: a competitive peptive inhibitor of fibronectine function inhibits gastrulation in amphibian embryos and neural crest cell migration in avian embryo. J.Cell Biol., **99**, 1822-1838.
- \* Breeze, R.G.; Nicholls, J.M.; Veitch, J.; Selman, I.E.; McPherson, E.A. y Lawson, G.H.K. (1977). Serum antitrypsin activity in horses with chronic pulmonary disease. Vet.Rec., **20**, 146-149.
- \* Breeze, R.G. (1979). The problem of disease recognition. Vet.Clin.North.Am., **1**, 219.
- \* Breeze, R.G.; Brown, C.M. y Turk, M.A.M. (1984). 3 methylindol as model of equine obstructive lung disease. Equine vet. J., **16**, 108-112.
- \* Buergelt, C.D.; Hines, S.A.; Cantor, G.; Stirk, A. and Wilson, J.H. (1986). A retrospective study of proliferative interstitial lung disease of horses in Florida. Vet.Pathol., **23**, 750-756.
- \* Burgeson, R.E. (1988). New collagens, new concepts. Ann.Rev.Cell Biol., **4**, 551-557.
- \* Burrige, K. y Fath, K. (1989). Focal contacts, transmembrane links between the extracelular matrix and the cytoskeleton. Bioessays, **10**, 104.
- \* Burrows, R.; Denyer, M.; Goodridge, D. and Hamilton, F. (1981). Field and laboratory studies of equine influenza viruses isolated in 1979. Vet.Rec., **109**, 353-356.
- \* Callis, A.H. y Lucas, D.O. (1986). Modulation by T-cells of pulmonary inflammation

and fibrosis in a experimental model of silicosis. Chest., **89**, 169.

\* Cam, Y.; Bellon, G.; Poulin, G.; Caron, Y. y Birembaut, P. (1984). Distribution of type IV collagen in bening and malignant epithelial proliferations. An indirect immunofluorescence study on the breast, the lungs and the skin. Inves.Metastas., **4**, 61-72.

\* Campbell, E.J.; Senior, R.M. y Welgus, H.G. (1987). Extracellular matrix injury during lung inflammation. Chest., **92**, 161-167.

\* Cagny, P. and Gobert, H-J. (1880). Diccionario de Veterinaria. III. I-P. Madrid.

\* Carrington, C.B.; W.W. Addington; A.M. Goff; I.M. Madoff; A. Marks; J.R. Schwaber y E.A. Gaenster (1969). Chronic eosinophilic pneumonia. N.Engl.J.Med., **280**, 787-792.

\* Carrington, C.B. y E.A. Gaenster (1978). Clinical-pathological approach to diffuse infiltrative lung disease. En *The lung Structure, Function and Disease*, Thurlbeck, W.M. and M.R. Abell. Eds, Williams & Wilkins. Baltimore.

\* Castor, C.W.; Heiss, P.R.; Gray, R.H. y Seidman, J.C. (1979). Connective tissue formation by lung fibroblasts "in vivo". Am.Rev.Resp.Dis., **120**, 107.

\* Cathcart, M.K. y Krakauer, R.S. (1981). Immunologic enhancement of collagen acumulation in progressive systemic sclerosis. Clin.Immunol.Immunopathol., **21**, 128.

\* Cederberg, A.; Hellsten, S. y Miörner, G. (1965). Oxygen treatment and hyaline pulmonary membranes in adults. Acta Pathol Microbiol Scand., **64**, 450-458.

\* Cheifetz, S.; Weatherbee, J.A.; Tsang, L-S.; Anderson, J.K.; Mole, J.E.; Lucas, R.

- y Massagué, J. (1987). The transforming growth factor beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. Cell., **48**, 409-415.
- \* Chen, L.B. (1977). Alteration in cell surface LETS protein during myogenesis. Cell., **10**, 393-400.
- \* Chen, L.B.; Maitland, N.; Gallimore, P.H. y McDougall, J.K. (1977). Detection of the large external transformation sensitive protein on some epithelial cells. Exp.Cell Res., **106**, 39-46.
- \* Chen, L.B.; Murray, A.; Segal, R.A.; Bushnell, A. y Walsh, M.L. (1978). Studies on intercellular LETS glycoprotein matrices. Cell., **14**, 377-391.
- \* Chen, L.B.; Polunovsky, V.; White, J.; Blazar, B.; Nakhleh, R.; Jessuron, J.; Peterson, M. y Bitterman, P. (1992). Mesenchymal cells isolated after lung injury manifest an enhanced proliferative phenotype. J.Clin.Invest., **90**, 1778-1785.
- \* Chin, J.R.; Murphy, G. y Werb, Z. (1985). Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. J.Biol.Chem., **260**, 12367.
- \* Christner, P.; Fein, A.; Goldberg, S.; Lippman, M.; Abrams, W. y Winbaum, G. (1985). Collagenase activity against type I and III collagens measured in the bronchoalveolar lavage from patients with adult respiratory distress syndrome. Am.Rev.Resp.Dis., **131**, 690.
- \* Chua, C.G.; Geiman, D.E.; Keller, G.H. y Ladda, R.L. (1985). Induction of collagenase secretion in human fibroblast cultures by growth promoting factors.

- J.Biol.Chem., **260**, 5213-5216.
- \* Clark, J.G.; Dedon, T.F.; Wayner, E.A. y Carter, W.G. (1989). Effects of interferon-gamma on expression of cell surface receptors for collagen and deposition of newly synthesized collagen by cultured human lung fibroblasts. J.Clin.Invest., **85**, 1505-1511.
- \* Conrad, G.W.; Hamilton, C. y Haynes, E. (1977). Differences in glycosaminoglycans synthesized by fibroblast-like cells from chick cornea, heart and skin. J.Biol.Chem., **252**, 6861-6870.
- \* Cook, W.R. and Rossdale, P.D. (1963). The syndrome of Broken Wind in the horse. Prod.R.Soc.Med., **56**, 972-977.
- \* Cook, W.R. (1976). Chronic bronchitis and alveolar emphysema in the horse. Vet.Rec., **4**, 448-451.
- \* Cordier, J.F.; R. Loire y J. Brune (1989). Idiopathic bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. Definition of characteristic clinical profiles in a series of 16 patients. Chest., **96**, 999-1004.
- \* Costabel, U. and Guzman, J. (1991). BOOP: What is old, what is new? Eur.Respir.J., **4**, 771-773.
- \* Cotran, R.; Kuman, V. y Robbins, S. (1991). Patología Estructural y Funcional. 4th. Interamericana McGraw-Hill. Toronto. 797-854.
- \* Crystal, R.G.; Bitterman, P.B.; Rennard, S.I.; Hance, A.J. y Keogh, B.A. (1984). Interstitial lung disease of unknown cause: Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract. N.Engl.J.Med., **310**, 235-244.

- \* Crystal, R.G. (1987). Interstitial lung disorders. En Harrison's Principles of Internal Medicine. 11th. Braunwold and McGraw-Hill (eds). New York.
- \* Cullen, K.J.; Yee, D. y Rosen, N. (1991). Insulin-like growth factors in human malignancy. Cancer Invest. **9**, 443-454.
- \* Dahme, E. y Weiss, E. (1988). Anatomia Patologica Especial Veterinaria. 1ª edición. Ed. Acribia. Zaragoza.
- \* Davidson, J.M. (1990). Biochemistry and turnover of lung interstitium. Eur.Respir.J. **3**, 1048-1068.
- \* Davison, A.G.; Heard, B.E.; Mc Allister, W.A.C. and Turner-Warwick, M.E.H. (1983). Cryptogenic organizing pneumonitis. Quarterly J. Med. **207**, 382-394.
- \* Demeure, M.J.; Damsky, C.H.; Elfman, F.; Goretzki, P.E.; Wong, M.G. y Clark, O.H. (1992). Invasion by cultured human follicular thyroid cancer correlates with increased beta 1 integrins and production of proteases. World J.Surg. **16**, 770-776.
- \* Derksen, F.J. (1991). Chronic Obstructive Pulmonary Disease. En Equine Respiratory Disorders. Cap. 15. J. Beech. Lea & Febiger. Philadelphia.
- \* Dessau, W.; Sasse, J.; Timpl, R.; Jilek, F. y von der Mark, K. (1978). Synthesis and extracellular deposition of fibronectin in chondrocyte cultures. Response to the removal of extracellular cartilage matrix. J.Cell Biol. **79**, 342-355.
- \* Di Corleto, P.E. y Bowen-Pope, D.F. (1983). Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor- like protein. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. **80**, 1919-1923.
- \* Diegelmann, R.F.; Schüller-Levis, G.; Cohen, I.K. y Kaplan, A.M. (1986).

- Identification of a low molecular weight macrophage-derived chemotactic factor for fibroblasts. Clin.Immunol.Immunopathol., **41**, 331.
- \* Dixon, P.M.; B.C. McGorum; K.J. Long y R.W. Else (1992). Acute eosinophilic interstitial pulmonary disease in a pony. Vet.Rec., **130**, 367-372.
- \* Dobson, A.; R.D. Gleed; R.E. Meyer y B.J. Stewart (1985). Changes in blood flow distribution in equine lungs induced by anaesthesia. Quart.Lexp.Physiol., **70**, 283-297.
- \* Doolittle, R.F.; Hunkapiller, M.W.; Hood, L.E.; Devare, S.G.; Robbins, K.C.; Aaranson, S.A. y Antoniades, H.N. (1983). Simian sarcoma virus onc gene, v-sis is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. Science, **221**, 275-277.
- \* Driscoll, K.E.; Maurer, J.K.; Poynter, J.; Higgins, J.; Asquith, T. y Miller, N.S. (1992). Stimulation of rat alveolar macrophage fibronectin release in a cadmium chloride model of lung injury and fibrosis. Toxicol.Appl.Pharmacol., **116**, 30-37.
- \* Duband, J-L.; Rocher, S.; Chen, W.T.; Yamada, K.M. y Thiery, J.P. (1986). Cell adhesion and migration in the early vertebrate embryo: location and possible role of the putative fibronectin receptor complex. J.Cell Biol., **102**, 160-178.
- \* Du Bois, R.M. and Geddes, D.M. (1991). Obliterative bronchiolitis, cryptogenic organising pneumonitis and bronchiolitis obliterans organizing pneumonia: three names for two different conditions. Eur.Respir.J., **4**, 774-775.
- \* Dungworth, D.L. (1982). Interstitial pulmonary disease. En Advances in veterinary science and comparative medicine. Vol. **56**. Ed. Cornerlius, C.E. and Simpson, C.T.

Academic Press, London.

- \* Dungworth, D.L. (1985). The Respiratory System. En Pathology of Domestic Animals. 3ª ed. Volume 2. K.V.J. Jubb. P.C. Kennedy and N. Palmer (eds). Academic Press. Orlando. 413-557.
- \* Dungworth, D.L. (1992). The Respiratory System. Cap. 6. En Pathology of Domestic Animals. 4ª ed. Vol 2. Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C. y Palmer, N. (eds). Academic Press. San Diego. 539-699.
- \* Editorial. (1989). Fibronectina y vitronectina. Lancet, **8636**, 474-476.
- \* Eldale, T. y Bard, J. (1974). Cellular interactions in morphogenesis of epithelial mesenchymal systems. J.Cell Biol., **63**, 343.
- \* Elias, J.A.; Jimenez, S.A. y Freundlich, B. (1987). Recombinant gamma, alpha y beta interferon regulation of human lung fibroblast proliferation. Am.J.Resp.Dis., **135**, 62.
- \* Eppler, C.R.; Colby, T.V.; Mc Loud, T.C.; Larrington, C.B. and Gaensler, E.A. (1985). Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. NEnglJMed., **312**, 152-158.
- \* Erdel, M.; Spiess, E.; Tretz, G.; Boxberger, H.J. y Ebert, W. (1992). Cell interactions and motility in human lung tumor cell lines res-24 and SB-3 under the influence of extracellular matrix components and proteinase inhibitors. Anticancer Res., **12**, 349-354.
- \* Eyre, P. (1972). Equine pulmonary emphysema: a bronchopulmonary mould allergy. Vet.Rec., **5**, 134-140.
- \* Fabisiak, J.P.; Absher, M.; Evans, J.N. y Kelley, J. (1992). Spontaneous production

- of PDGF A chain homodimer by rat lung fibroblasts in vitro. Am.J.Physiol., **263**, 185-193.
- \* Fine, A. y Goldstein, R.H. (1987). The effect of transforming growth factor  $\beta$  on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. J.Cell Biol.Chem., **262**, 3897-3902.
- \* Floyer, J. (1698). A treatise of the asthma. Richard Wilken editor. London.
- \* Fröhner, E. and Zwick, G. (1932). Patologia y Terapeutica Veterinarias. I. Ed. Gustavo Gili. 2ª Ed. Barcelona.
- \* Frolik, C.A.; Dart, L.L.; Meyers, C.A.; Smith, D.M. y Sporn, M.B. (1983). Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., **80**, 3676-3680.
- \* Frolik, C.A.; Wakefield, L.M.; Smith, D.M. y Sporn, M.B. (1984). Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor  $\beta$  in normal rat kidney fibroblast. J.Biol.Chem., **295**, 10995-11000.
- \* Fukuda, Y.; Ferrans, V.J.; Shoenberger, Cl.; Rennard, S.I. y Crystal, R.G. (1985). Patterns of pulmonary structural remodeling after experimental paraquat toxicity: The morphogenesis of intraalveolar fibrosis. Am.J.Pathol., **118**, 452-475.
- \* Fukuda, Y.; Ishizai, M.; Masuda, Y.; Kimura, G.; Kawanami, O. y Masugi, Y. (1987). The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. Am.J.Pathol., **126**, 171-182.
- \* Fulmer, J.D. (1982). The interstitial lung diseases. Chest., **82**, 172- .

- \* Gahmberg, C.G. y Hakamori, I. (1973). Altered growth behavior of malignant cells associated with changes in externally labeled glycoprotein and glycolipid. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., **70**, 3329-3333.
- \* Gibson, W. (1751). A new treatise on the diseases of horses. Millar. London.
- \* Geddes, D.M. (1991). BOOP and COP. Thorax. **46**, 545-547.
- \* Gerber, H. (1969). Das rote Blutbild bei chronischen Lungenkrankheiten des Pferdes. Schweiz.Arch.Tierheilk., **111**, 142-148.
- \* Gerber, H. (1973). Chronic pulmonary disease in the horse. Equine vet.J., **5**, 26-31.
- \* Gerber, H. (1990). Respiratory Diseases. En Equine Diseases. A textbook for students and practitioners. Hanns-Jürgen Wintzer. Verlag Paul Parey. Berlin.
- \* Gillespie, J.R. and Tyler, W.S. (1969). Chronic alveolar emphysema in the horse. Adv.Vet.Sci., **13**, 59-99.
- \* González-Avila, G.; Vadillo-Ortega, F. y Pérez-Tamayo, R. (1988). Experimental diffuse interstitial renal fibrosis. A biochemical approach. Lab.Invest. , **59**, 245.
- \* Goodwin, R.A.; Nicell, J.A. y Dez Prez, R.M. (1972). Mediastinal fibrosis complicating healed primary histoplasmosis and tuberculosis. Medicine., **51**, 227.
- \* Grant, D.S. y Leblond, C.P. (1988). Immunogold quantitation of laminin, type IV collagen and heparan sulfate in a variety of basement membranes. J.Histochem.Cytochem., **36**, 271-283.
- \* Graves, D.T.; Owen, A.J.; Barth, R.L.; Tempst, P.; Winoto, A.; Fors, L.; Hood, L.E. y Antoniades, H.N. (1984). Detection of c-sis transcripts and synthesis of platelet-

- derived growth factor (PDGF) like proteins by human osteosarcoma cell. Science, **226**, 972.
- \* Gross, J. (1974). Collagen biology: structure, degradation and disease. Harvey Lect., **68**, 351-432.
- \* Grouch, E.O.; Moxley, M.A. y Longman, W. (1987). Synthesis of collagenous proteins by pulmonary type II epithelial cells. Am.Rev.Resp.Dis., **135**, 1118.
- \* Grüning, G.M.; Hermann, M.; Howald, B.; Winder, C. and van der Fellenberg, R. (1989). Partial divergence between airway inflammation and clinical signs in equine chronic pulmonary disease. Equine Vet.J., **21**, 145-148.
- \* Gusterson, B.A.; Warburton, M.J.; Mitchell, D.; Kraft, N. y Hanock, W.W. (1984). Invading squamous cell carcinoma can retain a basal lamina. An immunohistochemical study using a monoclonal antibody to tupe IV collagen. Lab.Invest., **51**, 82-87.
- \* Halliwell, R.E.W.; J.B.Fleischman; M. Mackay-Smith; J. Beech and D.E. Gunson (1979). The role of allergy in Chronic Pulmonary Disease of horses. J.A.V.M.A., **174**, 277-281.
- \* Hamman, L. y Rich, A.R. (1944). Acute diffuse interstitial fibrosis of the lungs. Bull.Johns Hopsk Hosp., **74**, 177-212.
- \* Hance, A.J.; Bradley, K. y Crystal, R.G. (1976). Lung collagen heterogeneity. Synthesis of type I and type III collagen by rabbit and human lungs cells in culture. J.Clin.Invest., **57**, 102.
- \* Hara, H.; Manabe, T. y Hayashi, T. (1989). An immunohistochemical study of the

- fibrosing process in paraquat lung injury. Virchows Archiv. A Pathol. Anat., **415**, 357-366.
- \* Harrison, N.K. y Laurent, G.J. (1991). Lung collagen metabolism: The link between inflammation and pulmonary fibrosis. Cap. 3. En *Interstitial Pulmonary Diseases: Selected Topics*. Selman, M. y Barrios, R. (eds). CRC Press. Boca Ratón (Florida). 47-74.
- \* Hauser, P. y Vaes, G. (1979). Antigen or mitogen- provoked spleen cells produce factors that stimulate the secretion by macrophages of a neutral proteinase degrading cartilage proteoglycans. Biochem.J., **180**, 249-
- \* Hayman, E.G.; Oldberg, A.; Martin, R.G. y Ruoslahti, E. (1982). Codistribution of heparan sulfate proteoglycan, laminin and fibronectin in the extracellular matrix of normal rat kidney cells and their coordinate absence in transformed cells. J.Cell Biol., **94**, 28-35.
- \* Hedman, K.; Johansson, S.; Vartio, T.; Kjllen, L.; Vaheri, A. y Höök, M. (1982). Structure of the pericellular matrix: association of heparan and chondroitin sulfates with fibronectin-procollagen fibers. Cell., **28**, 663-671.
- \* Heppleston, A.G. y J.A. Styles (1967). Activity of a macrophage factor in collagen formation by silica. Nature., **214**, 521- 525.
- \* Holley, R.W.; Böhlen, P.; Fava, R.; Baldwin, J.H.; Kleeman, G. y Armour, R. (1980). Purification of kidney epithelial cell growth inhibitors. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., **77**, 5989-5992.

- \* Honma, Y.; S. Saiki; O. Doi; R. Yoneda; R. Mikami and M. Tamura (1992). Clinical criteria for definition of idiopathic interstitial pneumonia (IIP). Nippon-Kyobu-Shikkan-Gakkai-Zasshi, **30**, 1371-1377.
- \* Hsieh, P. y Chen, L.B. (1983). Behavior of cells seeded in isolated fibronectin matrices. J.Cell Biol., **96**, 1208-1217.
- \* Hungerford, T.G. (1992). Diseases of livestock. McGraw-Hill Book Company Sydney. 9ª ed. New York. 1108-1110
- \* Hunninghake, G.W.; Hemken, C.; Brady, M. y Monick, M. (1986). Immune interferon is a growth factor for human lung fibroblasts. Am.Rev.Resp.Dis., **134**, 1025.
- \* Huyberchts, G.; Hausser, P. y Vaes, G. (1979). Macrophage-fibroblast interactions in collagenase production and cartilage degradation. Biochem.J., **184**, 643.
- \* Hynes, R.O.; Martin, G.S.; Shearer, M.; Critchly, D.R. y Epstein, C.J. (1976). Viral transformation of rat myoblast: effects on fusion and surface properties. Dev.Biol., **48**, 35-46.
- \* Hynes, R.O. y Yamada, K.M. (1982). Fibronectin, multifunctional modular glycoproteins. J.Cell Biol., **95**, 369-377.
- \* Hynes, R.O. (1985). Fibronectins, a family of complex and versatile adhesive glycoprotein derived from a single gene. Harvey Lect., **81**, 133-152.
- \* Hynes, R.O. (1987). Integrins, a family of cell surface receptors. Cell., **48**, 549-554.
- \* Ignotz, R.A. y Massagué, J. (1986). Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular

- matrix. J.Biol.Chem., **261**, 4337-4345.
- \* Ignotz, R.A.; Endo, T. y Massagué, J. (1987). Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor  $\beta$ . J.Biol.Chem., **262**, 6443-6446.
- \* Ingh, T.S.G.A.M.v.d. (1985). Morphological aspects of bronchitis and bronchiolitis in the horse. En Lung Function and Respiratory Diseases in the horse. Eds: E. Deegen and R.E. Beadle, Hippitrika-Verlagsgesellschaft. West Germany. 13-15.
- \* Inoue, S.; Leblond, C.P.; Rico, P. y Grant, D. (1989). Association of fibronectin with the microfibrils of connective tissue. Am.J.Anat., **186**, 43-54.
- \* Simposio Internacional (1985). Understanding equine pulmonary disease. Vet.Rec., **17**, 141-142.
- \* Jaffe, E.A. y Mosher, D.F. (1978). Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. J.Exp.Med., **147**, 1779-1791.
- \* Jafee, B.D. y Claman, H.N. (1983). Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma. I. Description of model systems. Cell Immunol., **77**, 1.
- \* Jilek, F. y Hörmann, H. (1979). Fibronectin (cold-insoluble globulin). IV. Influence of heparin and hyaluronic acid on the binding of native collagen. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., **360**, 597-603.
- \* Johansson, S. y Höök, M. (1980). Heparin enhances the rate of binding of fibronectin to collagen. Biochem.J., **187**, 521-524.
- \* Jordana, M.; Schulman, J.; Masharry, C.; Irving, L.B.; Newhose, M.T.; Jordana, G. y Gualdie, J. (1988a). Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung

- fibroblast lines and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue. Am.Rev.Resp.Dis. **137**, 579-584.
- \* Jordana, M.; Befus, A.D.; Newhouse, M.T.; Bienenstock, J. y Gauldie, J. (1988b). Effects of histamine on proliferation of human adult lung fibroblasts. Thorax, **43**, 552.
- \* Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C. y Palmer, N. (1990). Patología de los animales domésticos. Tomo 2. 3ª ed. Ed. Hemisferio-Sur. Barcelona.471-630.
- \* Kaplan, D.R.; Chao, F.C.; Stiles, C.D.; Antoniades, H.N. y Scher, C.D. (1979a). Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. Blood, **53**, 1043-1052.
- \* Kaplan, K.L.; Brockman, M.J.; Chernoff, A.; Lesznik, G.R. y Drillings, M. (1979). Platelet alpha granule proteins: studies on release and subcelular localization. Blood, **53**, 604-618.
- \* Katzenstein, A.A.; Bloor, C.M. y Liebow, A.A.: Diffuse alveolar damage - the role of oxygen, shock and related factors (1976). Am.J.Pathol. **85**, 210-228.
- \* Katzenstein, A.A. y Askin, F.B. (1982). Chronic interstitial pneumonia, interstitial fibrosis and honeycomb lung. Major problems in pathology. Vol. 13. En Surgical Pathology of Non-neoplastic Lung Disease. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 43-72.
- \* Kaup, F.J.; Drommer, W.; Iregui, C. and Deegen, E. (1985). Morphological alterations of the alveolar region in horses with chronic obstructive pulmonary disease. In: Lung Function and Respiratory Diseases in the horse. Eds: E. Deegen and R.E. Beadle, Hippitrika-Verlagsgesellschaft, Calw, pp 20-22. West Germany.

- \* Kaup, F.J.; Drommer, W. and Deegen, E. (1990a). Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) I: alterations of the larger conducting airways. Equine Vet.J. **22**, 343-348.
- \* Kaup, F.J.; Drommer, W.; Damsch, S. and Deegen, E. (1990b). Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) II: pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region. Equine Vet.J. **22**, 349-355.
- \* Kawanami, O.; Ferrans, V.J.; Fulmer, J.D. y Crystal, R.G. (1979). Ultrastructure of pulmonary mast cells in patients with fibrotic lung disorders. Lab.Invest. **40**, 717.
- \* Kawanami, O.; Ferrans, V.J. y Crystal, R.G. (1982). Structure of alveolar epithelial cells in patients with fibrotic lung disorders. Lab.Invest. **46**, 39-53.
- \* Kehrl, J.H.; Wakefield, L.M.; Roberts, A.B., Jakowlew, S.B.; Alvarez-Mon, M.; Denynck, R.; Sporn, M.B. y Fauci, A.S. (1986). Production of transforming growth factor  $\beta$  by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J.Exp.Med. **163**, 1037-1050.
- \* Kerrebijnm, K.F. (1991). Similarities and discrepancies between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Am.Rev.Respir.Dis. **143 Suppl.**, 1151.
- \* Keski-Oja, J. y Moses, H.L. (1987). Growth inhibitory polypeptides in the regulation of cell proliferation. Med.Biol. **63**, 13-20.
- \* Kissler, W. (1980). Surfactantüberproduktion- Eine Ursache von Makrophagenkumulation in unbelüfteten Lungenbezirken.

Verh.Dtsch.Pathol.Ges., **64**, 215-218.

\* Kitaichi, M. (1992). Differential diagnosis of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. Chest. **102** Suppl., 44S-49S.

\* Kountz, W.B. y H.L. Alexander (1934). Emphysema. Medicine, **13**, 251-316. \*

Kulyk, W.M.; Rodgers, B.J.; Greek, Y. y Kosher, R.A. (1989). Promotion of embryonic chick cartilage differentiation by transforming growth factor  $\beta$ . Dev.Biol. **135**, 424-430.

\* King, R.J.; Jones, M.B. y Minoo, P. (1989). Regulation of lung cell proliferation by polipeptide growth factors. Am.J.Physiol. **257**, L23.

\* Laiho, M.; Sakesela, O.; Andreasen, P.A. y Keski-Oja, J (1986). Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor beta. JCell Biol. **103**, 2403-2410.

\* Laiho, M.; De Caprio, J.A.; Ludlow, J.W.; Livingston, D.M. y Massagué, J. (1990). Growth inhibition linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. Cell. **62**, 175-185.

\* Lange, W. (1901). Ueber eine eigenthümliche Erkrankung der Kleinen Bronchien und Bronchiolen (Bronchitis et bronchiolitis obliterans). Dtsch Arch Klin Med. **70**, 342-364.

\* Laurent, G.J. y McAnulty, R.J. (1983). Protein metabolism during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rabbits. Am.Rev.Resp.Dis. **128**,

82-88.

- \* Laurent, G.J. (1986). Lung collagen: More than scaffolding. Thorax, **41**, 418-428.
- \* Law, J. (1896). Textbook of veterinary medicine. Volume 1, J. Law, Ithaca, New York.
- \* Lawrence, D.A.; Pircher, R.; Krycève-Martinerie, C. y Jullien, P. (1984). Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. J Cell Physiol, **121**, 184-188.
- \* Lemaire, I.; Beaudoin, H. y Dubois, C. (1986). Cytokine regulation of lung fibroblasts proliferation. Pulmonary and systemic changes in asbestos-induced pulmonary fibrosis. Am.Rev.Resp.Dis., **134**, 653.
- \* Leonard, C.M.; Fuld, H.M.; Frenz, D.A.; Downie, S.A.; Massagué, J. y Newman, S.A. (1991). Role of transforming growth factor  $\beta$  in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: Stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF  $\beta$  and evidence for endogenous TGF  $\beta$  like activity. Dev.Biol., **145**, 99-109.
- \* Liebow, A.A.; Steer, A. y Billingsley, J.G. (1965). Desquamative interstitial pneumonia. Am.J.Med., **39**, 369.
- \* Liebow, A. y C.B. Carrington (1969). The interstitial pneumonias. En *Frontiers of pulmonary radiology*. Eds Simon, M.; E.J. Potchen y M. LeMay. New York. 102-141.
- \* Liebow, A.A. (1975). Definition and classification of interstitial pneumonia in Human Pathology. Progr Respir. Res., **8**, 1-33.

- \* Limper, A.H. y Roman, J. (1992). Fibronectin. A versatile matrix protein with roles in thoracic development, repair and infection. Chest., **101**, 1663-1673.
- \* Littlejohn, A. (1979). Chronic obstructive pulmonary disease in horses. Vet.Bull., **49**, 907-917.
- \* Llorente Lázaro, R. (1859). Compendio de Patología Especial Veterinaria. 2ª Ed. Madrid.
- \* Llorente Lázaro, R. (1873). Compendio de Patología Especial Veterinaria. 3ª Ed. Madrid.
- \* Madelin, T.M.; Clarke, A.F. y Mair, T.S. (1991). Prevalence of serum precipitating antibodies in horses to fungal and thermophilic actinomycete antigens: effects of environmental challenge. Equine vet.J., **23**, 247-252.
- \* Mair, T.S. y Lane, J.G. (1989). Pneumonia, lung abscesses and pleuritis in adult horses: a review of 51 cases. Equine vet.J., **21**, 175-180.
- \* Malkmus, B. (1912). Clinical diagnostics of the internal diseases of domestic animals. Alex Eger, Chicago (Illinois).
- \* Marcato, P.S. (1991). Patologia Respiratoria Animale. Edagricoloe. Bologna.
- \* Marti, E; H. Gerber; G. Essich; J. Oulehla y S. Lazary (1991). The genetic basis of equine allergic disease. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. Equine vet. J., **23**, 457-460.
- \* Marti, E.; H. Gerber y S. Lazary (1992). On the genetic basis of equine allergic diseases. 2. Insect bite dermal hypersensitivity. Equine vet. J., **24**, 113-116.

- \* Martinet, Y.; Bitterman, P.B.; Mornex, J.; Grotendorst, G.R. y Crystal, R.M. (1986). Activated human monocytes express the c-sis proto-oncogene and release a mediator showing PDGF-like activity. Nature, **319**, 158-160.
- \* Martinet, Y.; Rome, W.N.; Grotendorst, G.R.; Martin, G.R. y Crystal, R.G. (1987). Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. N.Engl.J.Med., **317**, 202-209.
- \* Mason, D.K.; E.A. Collins y K.L. Watkins (1983). Exercise-induced pulmonary haemorrhage in horses. En *Equine Exercise Physiology*. Eds. D.H. Snow, S.G.B. Persson y R.J. Rose. Granta. Cambridge. 57-63.
- \* Massagué, J. y Like, B. (1985). Cellular receptors for type  $\beta$  transforming growth factor. J.Biol.Chem., **260**, 2636-2645.
- \* Massagué, J.; Kelly, B. y Mottoly, C. (1985). Stimulation by insulin-like growth factors is required for cellular transformation by type  $\beta$  transforming growth factor. J.Biol.Chem., **260**, 4551-4554.
- \* Massagué, J.; Cheifetz, S.; Endo, T. y Nadal-Ginard, B. (1986). Type  $\beta$  transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, **83**, 8206-8210.
- \* Massagué, J. (1990). The transforming growth factor  $\beta$  family. Annu.Rev.Cell Biol., **6**, 597-641.
- \* Masui, T.; Wakefield, L.M.; Lechner, J.F.; La Veck, M.A. Sporn, M.B. y Harris,

- C.C. (1986). Type  $\beta$  transforming growth factor is the primary differentiation-inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., **83**, 2438-2442.
- \* Matsuba, K. and Thurlbeck, W.M. (1971). The number and dimensions of small airways in nonemphysematous lungs. Am.Rev.Respir.Dis., **104**, 516-524.
- \* Matrisian, L.M.; Gonser, G.L.; Kerr, L.D.; Pelton, R.W. y Woud, L.D. (1992). Negative regulation of gene expression by TGF  $\beta$ . Mol.Reprod.Dev., **32**, 111-120.
- \* Mayne, R. y Burgeson, R.E. (eds) (1987). Structure and function of collagen types. Academic Press. London.
- \* McDonald, J.A.; Broekelman, T.J.; Matheke, M.L.; Crouch, E. y Kulen, C. (1986). A monoclonal antibody to the carboxyterminal domain of procollagen type I visualizes collagen-synthesizing fibroblasts. J.Clin.Invest., **78**, 1237.
- \* McPherson, E.A. and Lawson, G.H.K. (1974). Some aspects of Chronic Pulmonary Diseases of horses and methods used in their investigations. Equine Veterinary Journal., **6**, 1-6.
- \* McPherson, E.A.; Lawson, G.H.K.; Murphy, J.R.; Breeze, R.G. and Pirie, H.M. (1978). Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Identification of affected horses. Equine Veterinary Journal., **10**, 47-53.
- \* McPherson, E.A.; G.H.K. Lawson; J.R. Murphy; J.M. Nicholson; R.G. Breeze and H.M. Pirie (1979a). Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in horses: Aetiological Studies: Response to Intradermal and Inhalation antigenic challenge.

Equine vet. J., **11**, 159-166.

\* McPherson, E.A.; Lawson, G.H.K.; Murphy, J.R.; Nicholson, J.M.; Breeze, R.G. y Pirie, H.M. (1979b). Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in horses: Factors influencing the occurrence. Equine vet.J., **11**, 167-171.

\* Mendoza, A.E.; Young, R.; Orkin, S.H. y Tucker, C. (1990). Increased platelet-derived growth factor A-chain expresión in human uterine smooth muscle cells during the physiologic hypertrophy of pregnancy. Clin.Res., **87**, 2177-2181.

\* Meyer, E.C. y A.A. Liebow (1965). Relationship of interstitial pneumonic honeycombing and atypical epithelial proliferation to cancer of the lung. Cancer, **18**, 322-251.

\* Minor, R.R. (1980). Collagen metabolism. A comparison of diseases of collagen and diseases affecting collagen. Am.J.Pathol., **98**, 227-280.

\* Michell, R.S.; Silves, C.W.; Dart, G.A.; Petty, T.L.; Vicent, T.N.; Ryan, S.F. y Filley, G.F. (1968). Clinical and morphological correlations in chronic airway obstruction. Am.Rev.Resp.Dis., **97**, 54-62.

\* Miyagawa, Y.; N. Nagata y N. Shigematsu (1991). Clinicopathological study of migratory lung infiltrates. Thorax, **46**, 554-558.

\* Montfort, I. y Pérez-Tamayo, R. (1978). Collagenase in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of the liver. Am.J.Pathol., **92**, 411.

\* Montaña, M.; Ramos, C.; González, G.; Vadillo, F.; Pardo, A. y Selman, M. (1989). Lung collagenase inhibitors and spontaneous and latent collagenase activity in

- idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis. Chest, **96**, 1115.
- \* Mornex, J.F.; Martinet, Y. y Yamamuchi, K. (1986). Spontaneous expression of the c-sis gene and release of a platelet-derived growth factor factor-like molecule by human alveolar macrophages. J.Clin Invest, **78**, 61-66.
- \* Morton, L.F. y Barnes, M.J. (1982). Collagen polymorphism in the normal and diseased blood vessel wall. Investigation of collagens type I, III and V. Atherosclerosis, **42**, 41.
- \* Moses, H.L.; Tucker, R.F.; Leot, E.B.; Coffey, R.J.; Halper, J. y Shipley, G.D. (1985). Type beta transforming growth factor is a growth stimulator and a growth inhibitor. Cancer Cel, **3**, 65-71.
- \* Muylle, E. y Oyaert, W. (1973). Lung function test in Obstructive Pulmonary Disease in Horse. Equine vet.J. **5**, 37-44.
- \* Narayanam, A.S.; Engel, L.D. y Page, R.C. (1983). The effect of chronic inflammation on the composition of collagen types in human connective tissue. Collagen Rel.Res. **3**, 323.
- \* Nicholls, J. (1978). A Pathological Study of Chronic Pulmonary Disease in the Horse. Ph.D. Thesis. Universtity of Glasgow.
- \* Nieberle, L. and Cohrs, P. (1967). Respiratory System. En Special pathological anatomy of domestic animals. Pergamon Press. Oxford. 169-288.
- \* Nishimura, K.; M. Kiataichi; T. Izumi; S. Nagai; M. Kanaoka; H. Itoh (1992). Usual interstitial pneumonia: histologic correlation with high-resolution CT. Radiology, **182**,

337-342.

- \* Nister, M.; Hammacher, A.; Mellstrom, K.; Siegbahn, A.; Rönstrand, L.; Westermark, B. y Heldin, C. (1988). A glioma derived PDGF A chain homodimer has different functional activities from a PDGF AB heterodimer purified from human platelets. Cell, **25**, 791.
- \* Nuytten, J.; Muylle, E.; Oyaert, W.; van der Hende, C.; Vlaminck, K. y Keersmaecker, F. (1983). Cytology, bacteriology and phagocytic capacity of tracheobronchial aspirates in healthy horses and horses with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Vet.Med. A., **30**, 114-120.
- \* Obel, N.J. y C.G. Schmitterlow (1948). The action of histamine and other drugs on the bronchial tone in horses suffering from Alveolar Emphysema (Heaves). Acta Pharmacologica, **4**, 71-80.
- \* Ohori, N.P.; Yousen, S.A.; Griffin, J.; Stanisk, S.; Stetler, W.G.; Colby, T.V. y Sonmez Alpan, E. (1992). Comparison of extracellular matrix antigens in subtypes of bronchiolo alveolar carcinoma and conventional pulmonary adenocarcinoma. J.Surg.Pathol., **16**, 675-686.
- \* Oka, Y. y Orth, D.N. (1983). Human plasma epidermal growth factor/beta urogastrone is associated with blood platelets. J.Clin.Invest., **72**, 249-259.
- \* Oosima, A. (1981) Collagen  $\alpha$  B chains increased proportion in human atherosclerosis. Science, **213**, 666.
- \* Osornio-Vargas, A.; Bonner, J.C. y Brody, A.R. (1991). Rat lung fibroblast (RLF)

- chemotaxis to PDGF-AA, AB y BB dimers. Int. Conf. Suppl. Abs., **143**, A524.
- \* O'Sullivan, B.M. (1979). Croton weed (*Eupatorium adenophorum*) toxicity in horses. Australian Veterinary Journal., **55**, 19-21.
- \* Orlidge, A.A.; Saunders, K.B.; Smith, S.R. y Amore, P.A. (1989). An activated form of transforming growth factor  $\beta$  is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **86**, 4544-4548.
- \* Owen, A.J.; Pantazis, P. y Antoniades, H.N. (1984). Simian sarcoma virus transformed cells secrete a mitogen identical to platelet-derived growth factor. Science., **225**, 54.
- \* Pantazis, P.; Pelicci, P.A.; Dalla-Favera, R. y Antoniades, H.N. (1985). Synthesis and secretion of proteins resembling platelet-derived growth factor by human glioblastoma and fibrosarcoma cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **82**, 2404.
- \* Pantazis, P.; Sariban, E.; Kofe, D. y Antoniades, H.N. (1986). Induction of c-sis gene expression and synthesis of platelet-derived growth factor in human myeloid leukemia cells during monocytic differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **83**, 6455.
- \* Pardee, A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. Science., **246**, 603-608.
- \* Pardo, A. y Selman, M. (1991). The collagenase gene family: Relationships between collagenolytic activity and fibrogenesis. Cap. 4. En *Interstitial Pulmonary Diseases: Selected Topics*. Selman, M. y Barrios, R. (eds). CRC Press. Boca Ratón (Florida). 75-98.

- \* Pascoe, J.R. (1985). Pulmonary hemorrhage in exercising horses: A review. En *Lung Function and Respiratory Diseases in the horse*. Eds: E. Deegen and R.E. Beadle. Hippitrika-Verlagsgesellschaft. West Germany. 81-83.
- \* Pepperkok, R.; Zanetti, M.; King, R. (1988). Automatic microinjection system facilitates detection of growth inhibitory mRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **85**, 6748-6752.
- \* Percivall, W. (1853). The diseases of the chest and air passages of the horse. En *Hippo-pathology*. Volume 2, Part 1. London. 155-187.
- \* Pérez-Tamayo, R. (1978). Pathology of collagen degradation. *Am.J.Pathol.*, **92**, 509-566.
- \* Perez-Tamayo, R. (1982). Morphologic and biochemical aspects of collagen degradation. En *Collagen degradation an mammalian collagenase*. Editado por Tsuchiya, M.; Perez-Tamayo, R.; Okasaki, I. y Murayama, K. *International Congress Series. Excerpta Medica.* **601**, 3-19.
- \* Perez-Tamayo, R; Monfort, I.; González, E. y Alvizovri, A. (1982). Collegenolytic activity in cirrhosis of the liver. En *Collagen degradation an mammalian collagenase*. Editado por Tsuchiya, M.; Perez-Tamayo, R.; Okasaki, I. y Murayama, K. *International Congress Series. Excerpta Medica.* **601**, 135.
- \* Pérez-Tamayo, R.; Montfort, I. y González, E. (1987). Collagenolytic activity in experimental cirrhosis of the liver. *Exp.Mol.Pathol.* **47**, 300.
- \* Perkins, M.E.; Ji, T.H. y Hynes, R.O. (1979). Cross-linking of fibronectin to sulfated

- proteoglycans at the cell surface. Cell, **16**, 941-952.
- \* Phan, S.H.; Thrall, R.S. y Williams, C. (1981). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Effects of steroids on lung collagen metabolism. Am.Rev.Resp.Dis. , **124**, 428.
- \* Phipps, R.P.; Penney, D.P.; Keng, P.; Silvera, M.; Harkins, S. y Derdak, S. (1990). Immune functions of subpopulations of lung fibroblasts. Immunol.Res., **9**, 275-286.
- \* Postlethwaite, A.E. y Kang, A.H. (1980). Characterization of a guinea pig lymphocyte-derived chemotatic factor for fibroblasts. J.Immunol., **124**, 1462.
- \* Postlethwaite, A.E.; Smith, G.N.; Mainardi, C.I.; Seyer, J.M. y Kang, A.H. (1984). Lymphocyte modulation of fibroblast function in vitro: Stimulation and inhibition of collagen production by different effector molecules. J.Immunol., **132**, 2470-2477.
- \* Powell, P.P.; Wang, C.C. y Jones, R. (1992). Differential regulation of the genes encoding platelet-derived growth factor receptor and its ligand in rat lung during microvascular and alveolar wall remodeling in hyperoxia. Am.J.Resp.Cell Mol.Biol., **7**, 278-285.
- \* Pratt, P.C. (1958). Pulmonary capillary proliferation induced by oxygen inhalation. Am.J.Pathol., **34**, 1033-1050.
- \* Puzstai, L.; Lewis, C.E.; Lorenzen, J. y McGee, J.O'd. (1993). Growth factors: Regulation of normal and neoplastic growth. J.Pathol., **169**, 191-201.
- \* Ramachandran, G.N. y Reddi, A.H. (1976). Biochemistry of collagen. Plenum Press. New York.
- \* Ramael, M.; Buysse, C.; Bossche, J.V.D.; Segers, K. y Marck, E.V. (1992).

Immunoreactivity for the  $\beta$  chain of the platelet-derived growth factor receptor in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium. *J Pathol.* **167**, 1-4.

\* Ramos, C.; Montaña, M.; Gonzalez, G. y Vadillo, F. (1988). Collagen metabolism in experimental lung silicosis: a trimodal behavior of collagenolysis. *Lung.* **166**, 347.

\* Raghu, G.; Striker, L.J.; Hudson, L.D. y Stricker, G.E. (1985). Extracellular matrix in normal and fibrotic human lung. *Am.Rev.Resp.Dis.* **131**, 281.

\* Raghu, G.; Chen, Y.; Rusch, V. y Rabinovitch, P.S. (1988). Differential proliferation of fibroblasts cultured from normal and fibrotic lungs. *Am.Rev.Resp.Dis.* **138**, 703.

\* Raghu, G. y Kavanagh, T. (1991). The human lung fibroblast: A multifaceted target and effector cell. Cap. 1. En *Interstitial Pulmonary Diseases: Selected Topics*. Selman, M. y Barrios, R. (eds). CRC Press. Boca Ratón (Florida). 1-34.

\* Rennard, S.I.; Chen, Y.F.; Robbins, R.A.; Gadek, J.E. y Crystal, R.G. (1983). Fibronectin mediates cell attachment to C1q, a mechanism for the localization of fibrosis in inflammatory disease. *Clin.Exp. Immunol.* **54**, 239-247.

\* Reyes, C.N.; Wenzel, F.J.; Lawton, B.R. and Emmanuel, D.A. (1982). The pulmonary pathology of farmer's lung disease. *Chest.* **81**, 142-146.

\* Reynolds, J. (1985) The molecular and cellular interactions involved in connective tissue destruction. *Br.J.Dermatol.* **112**, 715-

\* Richardson, R.L. y Campion, D.R. (1988). Immunohistochemical localization of transforming growth factor type  $\beta$  (TGF-b) in fetal pig subcutaneous adipose tissue. *J.Animal.Sci.* **66** supl., 286-296.

- \* Roberts, A.B.; Anzano, M.A.; Meyer, C.A.; Wideman, J.; Blacher, R.; Pan, Y-C.E.; Stein, S.; Lehrman, R.; Smith, J.M.; Lamb, L.C. y Sporn, M.B. (1983a). Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. Biochemistry, **22**, 5692-5698.
- \* Roberts, A.B.; Frolik, C.A.; Anzano, M.A. y Sporn, M.B. (1983b). Transforming growth factors from neoplastic and non-neoplastic tissues. Fed.Proc. **42**, 2621-2626.
- \* Roberts, A.B.; Anzano, M.A.; Wakefield, L.M.; Roche, N.S.; Stern, D.F. y Sporn, M.B. (1985). Type  $\beta$  transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, **82**, 119-123.
- \* Roberts, A.; Sporn, M.B.; Assoian, R.K.; Smith, J.M.; Roche, N.S.; Wakefield, L.M.; Liotta, L.A.; Falanga, V.; Kehrl, J.H. y Fauci, A.S. (1986). Transforming growth factor  $\beta$ : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, **83**, 4167-4171.
- \* Robbins, K.C.; Antoniades, H.N.; Devare, S.G.; Hunkapiller, M.W. y Aaronson, S.A. (1983). Structural and immunological similarities between simian sarcoma virus gene product(s) and human platelet-derived growth factor. Nature, **305**, 605-608.
- \* Rochemonteix-Galve, J.M. y Junod, A. (1990) Fibroblast-alveolar cell interactions in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis: evidence for stimulatory and inhibitory cytokine production by alveolar cells. Eur.Respir.J., **3**, 653-664.
- \* Rodríguez, A.; Castaño, M.; González, M.; Peña, L.; Flores, J.M. y Pizarro, M. (1992). Chronic interstitial disease of the equine lung: Immunocytochemical aspects.

Med.Vet., **9**, 118-119.

\* Rose, R.J. (1987). Is the horse lung well designed? Equine vet.J., **6**, 492-493.

\* Ross, R.; Glomset, J.; Kariya, B. y Harker, L. (1974). A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., **71**, 1207-1210.

\* Roos, R.; Raines, E.W. y Bowen-Pope, D.F. (1986). The biology of platelet-derived growth factor. Cell., **46**, 155-169.

\* Ross, R.; Bowen-Pope, D.F. y Raines, E.W. (1990). Platelet-derived growth factor and its role in health and disease. Philos.Brens.R.Soc.London.Ser.B., **327**, 155-169.

\* Rouslahti, E. y Yamaguchi, Y. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factor activities. Cell., **64**, 867-869.

\* Rovasio, R.A.; DeLouvèe, A.; Yamada, K.M.; Timpl, R. y Thiery, J.P. (1983). Neural crest cell migration: requirement for exogenous fibronectin and high cell density. J.Cell.Biol., **96**, 462-473.

\* Rudd, R.M.; P.L. Haslam y M. Turner-Warwick (1981). Cryptogenic fibrosing alveolitis. Relationship of pulmonary physiology and bronchoalveolar lavage to response to treatment and prognosis. Am.Rev.Resp.Dis., **124**, 1-9.

\* Ruoslahti, E. y Engvall, E. (1980). Effect of glycosaminoglycans on complexing of fibronectin and collagen. Biochem.Biophys.Acta., **631**, 350-358.

\* Ruoslahti, E. y Pierschebacher, M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion, RGD and integrins. Science., **238**, 491-497.

- \* Ruoslahti, E. (1988). Fibronectin and its receptors. Ann.Rev.Biochem., **57**, 375-413.
- \* Saba, T.M. (1989). Plasma fibronectina y lung vascular injury. Prog.Clin.Biol., **299**, 133-156.
- \* Sakai, L.Y.; Keene, D.R.; Morris, N.R. y Burgeson, R.E. (1986). Type IV collagen is a major structural component of anchoring fibrils. J.Cell Biol., **103**, 1577-1586.
- \* Sakai, L.Y.; Keene, D.R. y Engual, E. (1986). Fibillin, a new 350 KDa glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. J.Cell Biol., **103**, 2499-2509.
- \* Sakr, W.A.; Zarbo, R.J.; Jacobs, J.R. y Crissman, J.D. (1982). Distribution of basement membrane in squamous cell carcinoma of the head and neck. Hum.Pathol., **18**, 669-673.
- \* Sasse, H.H.L. (1971). Some pulmonary functions tests in horses, an aid to the early diagnosis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Heaves) in horses. Doctoral Thesis, Utrech.
- \* Sato, T. y Tuan, R.S. (1992). Effect of systemic calcium deficiency on the expression of transforming growth factor  $\beta$  in chick embryonic calvaria. Dev.Dyn., **193**, 300-313.
- \* Scadding, J.G y K.F.W. Hinson (1967). Diffuse fibrosing alveolitis (diffuse interstitial fibrosis of the lungs). Thorax., **22**, 291-304.
- \* Schmidt. J.A.; Oliver, L.N.; Lope-Zuñiga, J.C.; Green, I. y Gery, I. (1984). Silica-stimulated monocytes release fibroblasts proliferation factors identical to interleukin-1. J.Clin.Invest., **73**, 1462.
- \* Schoon, H.A. y E. Deegen (1983). Histopathologie der chronisch obstruktiven

- bronchitis bei klinisch manifest erkrankten Pferden. Tierärztl.Prax., **11**, 213-221.
- \* Schraufnagel, D.E.; Claypool, W.C.; Fahey, P.J.; Jacobs, E.R.; Rubin, D.B. y Snider, G.L. (1987). Interstitial pulmonary fibrosis. Am.Rev.Resp.Dis., **136**, 1281.
- \* Schulman, E.S.; Liu, M.C.; Proud, D.; Mc Glashan, D.W.; Liechstenstein, L.M. y Plant, M. (1985). Human lung macrophages induce histamin release from basophils and mast cell. Am.Rev.Resp.Dis., **131**, 230.
- \* Schwartz, L.W.; H.D. Knight; L.D. Whitting; R.L. Malloy; J.L. Abraham y N.K. Tyler (1981). Silicate pneumoconiosis and pulmonary fibrosis in horses from the Monterey-Carmel peninsula. Chest., **80 Suppl.**, 82S-85S.
- \* Selman, M.; Montaña, M.; Monfort, I. y Perez-Tamayo R. (1985). A new model of diffuse interstitial pulmonary fibrosis in rat. Exp.Mol.Pathol., **43**, 375.
- \* Selman, M.; Montaña, M.; Ramos, C. y Chapela, R. (1986). Concentracion, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. Thorax., **41**, 355-359.
- \* Selman, M.; Montaña, M.; Ramos, C.; Chapela, R.; Gonzalez, G. y Vadillo, F. (1988). Lung collagen metabolism and the clinical course of hypersensitivity pneumonitis. Chest., **94**, 347.
- \* Selman, M.; Montaña, M.; Ramos, C.; Barrios, R. y Perez-Tamayo, R. (1989). Experimental pulmonary fibrosis induced by paraquat plus oxygen in rats: a morphologic and biochemical sequential study. Exp.Molec.Pathol., **50**, 147.
- \* Selman, M. (1990). Pulmonary fibrosis. Experimental and lung disease in connective

- tissue. En Health and Disease. Cap. 5. Vol. 1, CRS Press. Boca Ratón (Florida).
- \* Selman, M. y Barrios, R. (1991). Interstitial Pulmonary Diseases: Selected Topics. CRS Press. Boca Ratón, Florida.
- \* Senior, R.M.; Griffin, G.L.; Mecham, R.P.; Wrenn, D.W.; Prased, K.V. y Urruy, D.W. (1984). Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly a respecting peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. J.Cell Biol., **99**, 870-874.
- \* Seyer, J.M. (1985). Mediators of increased collagen synthesis in fibrosing organs. Fundam.Appl.Toxicol., **5**, 228.
- \* Shahzeidi, S.; Du Bois, R.M.; Sheppard, M.N. y Laurent, G.J. (1991). Type III collagen gene expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Int.Conf.Suppl.Abs., **143**, A396.
- \* Shipley, G.D.; Tucker, R.F. y Moses, H.L. (1985). Type  $\beta$  transforming growth factor/growth inhibitor stimulates entry of monolayer culture of AKR-2B cells into S phase after a prolonged prereplicathe interval. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., **82**, 4147-4151.
- \* Sinkin, R.A.; Lo Monaco, M.B.; Finkelstein, J.N.; Watkins, R.H.; Cox, C. y Horowitz, S. (1992). Increased fibronectin mARN in alveolar macrophages following in vivo hyperoxia. Am.J.Resp.Cell Mol Biol., **7**, 548-555.
- \* Sitaras, N.M.; Sariban, E.; Pantazis, P.; Zetter, B. y Antoniades, H.N. (1987). Human iliac artery endothelial cells express both genes encoding the chains of platelet-derived growth factor (PDGF) and synthesize PDGF-like mitogen. J.Cell Physiol., **132**, 376.

- \* Smith, F. (1924). The early history of veterinary literature and its British development. **Volume 2**. Bailliere. London.
- \* Sorrentino, V. (1989). Growth factors, growth inhibitors and cell cycle control. Anticancer Res., **9**, 1925-1936.
- \* Spencer, H. (1975). Pathogenesis of interstitial fibrosis of the lung. Progr.Respir.Res., **8**, 34-44.
- \* Sporn, M.B.; Roberts, A.B.; Shull, J.H.; Smith, J.M.; Ward, J.M. y Sodek, J. (1983). Polypeptide transforming growth factor isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. Science., **219**, 1329-1331.
- \* Sporn, M.B.; Roberts, A.B.; Wakefield, L.M. y Assoian, R.K. (1986). Transforming growth factor beta: biological function and chemical structure. Science., **223**, 532-534.
- \* Sporn, M.B.; Roberts, A.B.; Wakefield, L.M. y de Combrughe, B. (1987). Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor  $\beta$ . J.Cell.Biol., **105**, 1039-1045.
- \* Stathakis, N.E. y Mosesson, M.W. (1977). Interactions among heparin, cold-insoluble globulin and fibrinogen in formation of the heparin-precipitable fraction of plasma. J.Clin.Invest., **60**, 855-865.
- \* Stenman, S. y Vaheri, A. (1978). Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin in normal human tissue. J.Exp.Med., **147**, 1054.
- \* Sugarman, B.J.; Asgarwal, B.B.; Hass, P.E.; Figari, I.S.; Palladino, M.A. y Shepard, H.M. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor  $\alpha$ : Effects on proliferation of

- normal and transformed cells in vitro. Science, **230**, 943.
- \* Tisdale, A.S.; Spurr-Michaud, S.J.; Rodrigues, M.; Hackett, J.; Krachmer, J. y Gipson, I.K. (1988). Development of the anchoring structures of the epithelium in rabbits and human fetal corneas. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **29**, 727-736.
- \* Thompson, H (1913). Elementary lectures on Veterinary Science. 4th ed. Bailliere. London.
- \* Thomson, R. (1988). Special Veterinary Pathology. 1ª ed. BC. Decker Inc. Philadelphia. 69-122.
- \* Thornton, S.C.; Robbins, J.M.; Penny, R. y Breit, S.N. (1992). Fibroblast growth factors in connective tissue disease associated interstitial lung disease. Clin. Exp. Immunol., **90**, 447-452.
- \* Thurlbeck, W.M. y F.C. Lowell (1964). Heaves in horses. Am. Rev. Resp. Dis., **89**, 82-88.
- \* Thurlbeck, W.M.; Dunnill, M.S.; Hartung, W.; Heard, B.E.; Heppleston, A.G. and Ryder, R.C. (1970). A comparison of three methods of measuring emphysema. Human Pathology, **1**, 215-226.
- \* Torre-Amione, G.; Geauchamp, R.D.; Koeppen, H. (1990). A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type  $\beta$  1 cDNA escapes immune surveillance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **87**, 1486-1490.
- \* Tucker, R.F.; Volkemant, M.E.; Branum, E.L. y Moses, H.L. (1983). Comparison of intra and extracellular transforming growth factors from non-transformed and

chemically transformed mouse embryo cells. Cancer Res., **43**, 1581-1586.

\* Tucker, R.F.; Shipley, G.D.; Moses, H.L. y Holley, R.W. (1984). Growth inhibitor form BSC-1 cell closely related to platelet-derived type  $\beta$  transforming growth factor. Science., **226**, 705-707.

\* Turk, J.R.; Brown, C.M. and Johnson, G.C. (1985). Diffuse alveolar damage with fibrosing alveolitis in a horse. Vet.Pathol., **18**, 560-562.

\* Usui, T.; S. Takayama; M. Nakayama; H. Miura y Y. Kimura (1992). Case report of desquamative interstitial pneumonia: documentation of preserved pulmonary function after twelve clinical relapses. Respiration., **59**, 112-115.

\* Vadillo-Ortega, F. y González-Avila, G. (1991). Mast cells, inflammation and fibrogenesis. Cap. 6. En *Interstitial Pulmonary Diseases: Selected Topics*. Selman, M. y Barrios, R. (eds). CRC Press. Boca Ratón (Florida). 137-154.

\* Vaheri, A.; Kurkinen, M.; Lehto, V-P.; Linder, E. y Timpl, R. (1978). Codistribution of pericellular matrix proteins in cultured fibroblasts and loss in transformation: fibronectin and procollagen. Proc.Nat.Acad.Sci.USA., **15**, 4944-4948.

\* Varga, J.; Rosebloom, J. y Jimenez, S.A. (1987). Transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNA in normal human dermal fibroblasts. Biochem.J., **247**, 597.

\* Viel, L. (1983). Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease. Doctoral Thesis, Guelph.

- \* Wahl, S.M.; Wahl, L.M. y Mc Carthy, J.B. (1978). Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. J.Immunol., **121**, 942-946.
- \* Wall, P.J. (1991). Neuropeptide growth factors and cancer. Br.J.Cancer., **63**, 469-475.
- \* Wartiovaara, L.; Linder, E.; Ruoslahti, E. y Vaehri, W. (1974). Distribution of fibroblast surface antigen: association with fibrillar structures of normal cells and loss upon viral transformation. J.Exp.Med., **140**, 1522-1555.
- \* Waterfield, M.D.; Scrace, G.T.; Whittle, N.; Stroobant, P.; Johnsson, A.; Wasteson, A.; Westermarck, B.; Heldin, G.H.; Huang, J.S. y Deuel, T.F. (1983). Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p 28<sup>sis</sup> of simian sarcoma virus. Nature., **304**, 35-39.
- \* Werb, Z.; Baitnon, D. y Jones, P. (1980). Degradation of connective tissue matrices by macrophages. J.Exp. Med., **152**, 1537.
- \* Wewers, M.D.; Rennard, S.I.; Hance, A.J.; Bitterman, P.B. y Crystal, R.G. (1984). Normal human alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage have a limited capacity to release interleukin-1. J.Clin.Invest., **74**, 2208.
- \* Williams, W. (1874). Asthma, broken wind. En The principles and practice of Veterinary Medicine. Maclachlam and Steward. Edinburgh. 358-363.
- \* Williams, J.; Fine, A. y Goldstein, R.H. (1991). Soluble collagen incubation causes post-translational modification of type I collagen in TGF  $\beta$  stimulated lung fibroblasts. Int.Conf.Suppl.Abs., **143**, A530.
- \* Winder, N.C. and van Fellenberg, R. (1986). Immunofluorescent evaluation of the

- lower respiratory tract of healthy horses and of horses with chronic bronchiolitis. Am.J.Vet.Res., **47**, 1271-1274.
- \* Winder, N.C. and van Fellenberg, R. (1987). Chronic small airway disease in horses slaughtered in Switzerland. Schweiz Arch. Tierheilk., **129**, 585-593.
- \* Winder, N.C. and van Fellenberg, R. (1987). Enfermedad respiratoria crónica obstructiva del caballo: valoración inmunohistoquímica de pulmones con lesiones leves, moderadas y graves. Vet.Rec., **1**, 174-178.
- \* Winder, N.C.; Ehrensperger, F.; Hermann, M.; Howald, B. and von Fellenberg, R. (1988). Interstitial pneumonia in the horse: two unusual cases. Equine vet.J., **20**, 298-301.
- \* Wick, G.; Rainer, B.; Jamning, H.; Totsch, M. y Krejci, H. (1992). Complete clarification of a case of farmer's lung. Int.Arch.Allergy Appl.Immunol., **98**, 89-92.
- \* Wickus, G.G.; Branton, P.E. y Robbins, P.W. (1974). Rous sarcoma virus transformation of the chick cell surface: in control of proliferation in animal cells. Clarkson, B. y Baserga, R. (eds). Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 541-546.
- \* Whitby, D. y Ferguson M.W.J. (1991). Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. Dev.Biol., **147**, 207-215.
- \* Whitwell, K.E. y Greet, T.R.C. (1984). Collection and evaluation of tracheobronchial washes in the horse. Equine vet.J., **16**, 499-508.
- \* World Health Organization Report (1961). Chronic Cor Pulmonale: Report of an Expert Committee. No 213, pp 15. WHO Technical Respiratory Series.

- \* Yamada, K.M. y Weston, J.A. (1974). Isolation of a major cell surface glycoprotein from fibroblasts. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, **71**, 3492-3496.
- \* Yamada, K.M. y Olden, K. (1978). Fibronectine-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature, **275**, 179-184.
- \* Yamada, K.M.; Kennedy, E.W.; Kimata, K. y Pratt, R.M. (1980). Characterization of fibronectine interactions with glycosaminoglycans and identification of active proteolytic fragments. J.Biol.Chem., **255**, 6055-6063.
- \* Yoshida, M.; Beckmann, J.D.; Romberger, D.J. y Rennard, S.I. (1991). Transforming growth factor  $\beta$  1 regulates proteoglycan core protein transcript levels in human lung fibroblasts. Int.Conf.Suppl.Abs., **143**, A531.
- \* Yousem, S.A.; Suncan, S.R.; Ohori, N.P. y Sonmez-Alpan, E. (1992). Architectural remodeling of lung allografts in acute and chronic rejection. Arch.Pathol.Lab.Med., **116**, 1175-1180.
- \* Zardi, L.; Siri, A.; Larnemolla, B.; Santi, L.; Gardner, W.D. y Hoch, S.O. (1979). Fibronectin: a chromatin-associated protein?. Cell., **18**, 649-657.
- \* Zatuschni, J.; Campbell, W.N. y Zarafonietis, C.J. (1953). Pulmonary fibrosis and terminal bronchiolar ("alveolar-cell") carcinoma in scleroderma. Cancer.Philad., **6**, 1147-1158.

## **FE DE ERRATAS**

- \* Página 211, en la Fig. 4, donde dice x 300 debe decir x 19.
- \* Página 213, en la Fig. 5, donde dice x 300 debe decir x 75 y en la Fig. 6, donde dice x 240 debe decir x 99.
- \* Página 217, en la Fig. 9, donde dice x 180 debe decir x 198 y en la Fig. 10 donde dice x 210 debe decir x 120.
- \* Página 219, en la Fig. 11, donde dice x 210 debe decir x 75.
- \* Página 229, en la Fig. 22, donde dice x 185 debe decir x 198.
- \* Página 231, en la Fig. 24, donde dice x 185 debe decir x 150.
- \* Página 233, en la Fig. 26, donde dice x 150 debe decir x 198.
- \* Página 239, en la Fig. 32, donde dice x 120 debe decir x 240.
- \* Página 241, en la Fig. 34, donde dice x 90 debe decir x 99.
- \* Página 243, en la Fig. 36, donde dice x 300 debe decir x 600.
- \* Página 247, en la Fig. 40, donde dice x 150 debe decir x 198.
- \* Página 249, en la Fig. 41, donde dice x 150 debe decir x 198.
- \* Página 255, en la Fig. 45, A) donde dice x 150 debe decir x 240; C) donde dice x 200 debe decir x 400.
- \* Página 261, en la Fig. 49, a) donde dice x 312 debe decir x 300; B) donde dice x 185 debe decir x 300.
- \* Página 263, en la Fig. 50, donde dice x 185 debe decir x 300.