

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**PATOLOGÍA COMPARADA DE LAS LESIONES NEUMÓNICAS
CRÓNICAS ENTRE BOVINOS Y HUMANOS**

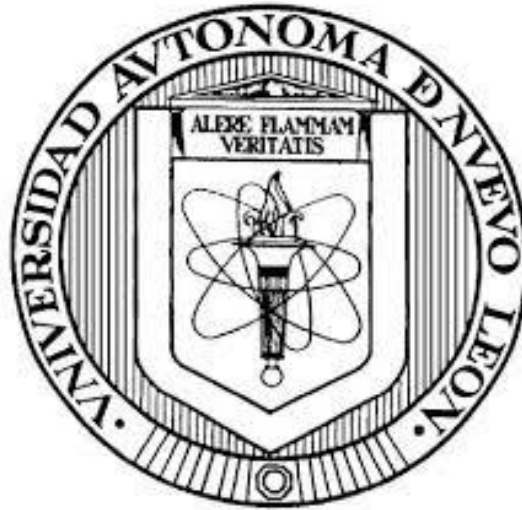
POR

CECILIA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL**

MAYO, 2019

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**PATOLOGÍA COMPARADA DE LAS LESIONES NEUMÓNICAS
CRÓNICAS ENTRE BOVINOS Y HUMANOS**

POR

CECILIA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL**

GENERAL, ESCOBEDO, NUEVO LEÓN

MAYO, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA

PATOLOGÍA COMPARADA DE LAS LESIONES NEUMÓNICAS
CRÓNICAS ENTRE BOVINOS Y HUMANOS

Aprobación de tesis por el comité particular de
M. C. Cecilia Ramírez Hernández



Ph.D. Rafael Ramírez Romero
Director de tesis



Dr. Luis Jorge García Márquez
Co-Director



Ph.D. Emilio Olivares Sáenz
Co-Director



Ph.D. Gustavo Hernández Vidal
Co-Director

AGRADECIMIENTOS

A la SEP, México; PRODEP, Red de estudios sobre enfermedades de fauna silvestre. Proyecto: 2013; 16. Extensión 2015-2016 para la realización de este Proyecto de investigación.

A la Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia, a la Facultad de Agronomía de la UANL.

Al Establecimiento TIF No. 356, por permitirme realizar mi estudio en sus instalaciones.

A mis asesores el PhD. Rafael Ramírez Romero, mi asesor principal. A los Dres. Luis Jorge García Márquez, Emilio Olivares Sáenz y Gustavo Hernández Vidal, mis co-asesores.

Al Dr. Horacio Decanini Arcaute, quien me apoyó en durante los procesos histopatológicos y de inmunohistoquímica.

Al MC Eliud Obregón, quien me apoyó a entender los números.

También agradezco al equipo de histotecnólogos del Laboratorio de Anatomía Patológica Hospital Universitario, de la UANL.

Al Dr. Rogelio Ledezma Coordinador Posgrado Conjunto Agronomía-Veterinaria, UANL y a Reyna Rodríguez.

DEDICATORIA

A mi hijo Pablo y a mis padres María Dolores y Rafael.

ABREVIATURAS

Complejo respiratorio bovino	CRB
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	EPOC. COPD, por sus siglas en inglés.
Neumonía organizada con bronquiolitis obliterante	NOBO. BOOP, por sus siglas en inglés
Neumonía Organizada	NO
Fibrosis pulmonar idiopática	FPI. IPF, por sus siglas en inglés
Idiopathic pulmonary fibrosis	IPF
Usual interstitial pneumonia	UIP
Transición epitelial a mesenquimatosa	TEM. MET, por sus siglas en inglés
Hematoxilina y Eosina	H&E
Kilogramo	kg
Respiraciones/minuto	resp/min
Litros	l
Metros cuadrados	m ²
Hora	hr
Alfa actina de músculo liso	α -SMA
Wilm's Tumor 1	WT1
Virus Respiratorio Sincitial	VRS
Parainfluenza 3	PI-3
Neumonía organizada criptogénica	COP, por sus siglas en inglés

Médicos Veterinarios Responsables Autorizados en Establecimientos TIF	MVRATIF
Inmunohistoquímica	IHQ
Microscopía electrónica	ME. EM, por sus siglas en inglés
Análisis de varianza	ANOVA por sus siglas en inglés
Micras	μ
Bronconeumonía	BNM
Fibrosis pleural	FP
Controles	CL
Histoquímica	HC

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	10
I. INTRODUCCIÓN	11
1. OBJETIVO	13
2. OBJETIVOS PARTICULARES	13
II. REVISIÓN	13
1. MORFOLOGÍA DEL SISTEMA RESPIRATORIO	13
Humanos	14
Bovinos	16
2. MORFOLOGÍA COMPARADA DE BOVINOS Y HUMANOS	17
3. DESARROLLO Y CRECIMIENTO DEL MESOTELIO DEL SISTEMA RESPIRATORIO	19
4. LESIÓN PULMONAR CRÓNICA	22
Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)	22
Neumonía organizada	23
Complejo Respiratorio Bovino (CRB)	24
Neumonía Intersticial Habitual/ Fibrosis Pulmonar Idiopática	25
Lesión Pulmonar Crónica en Bovinos y su Analogía en el Humano	27
5. WT1	29
6. CÉLULAS CEBADAS	29
III. HIPÓTESIS	30
IV. JUSTIFICACIÓN	31
V. MATERIAL Y MÉTODOS	31
1. NUMERO DE MUESTRAS	31
2. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS ...32	
3. CLASIFICACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS PULMONES DECOMISADOS . 34	

4.	ÍNDICE REID.....	34
5.	PROCEDIMIENTO HISTOPATOLÓGICO Y CORTE SEMIFINO.....	35
6.	PROCEDIMIENTO PARA EL CÁLCULO DE ESPACIOS ALVEOLARES Y SEPTOS ALVEOLARES.....	36
7.	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	37
VI.	RESULTADOS.	38
1.	DECOMISOS Y CLASIFICACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS LESIONES.....	38
2.	LESIONES MICROSCÓPICAS.	41
3.	ÍNDICE REID.....	41
4.	CORTES SEMIFINOS	42
5.	HALLAZGOS MICROSCÓPICOS DE LESIONES CON FIBROSIS PLEURAL.	44
VII.	DISCUSIÓN.	61
VIII.	CONCLUSIÓN.....	63
IX.	BIBLIOGRAFÍA.	64
	ANEXO I	71

RESUMEN

Las neumonías son el principal problema en los corrales de engorda debido a que los animales enfermos generan gastos extras (medicamentos). Además, en el rastro, estos mismos animales siguen generando pérdidas por decomisos. En este estudio realizamos una clasificación de pulmones (solo derechos) decomisados por los Médicos Veterinarios autorizados y encontramos que los pulmones con Fibrosis Pleural fueron las principales causas de decomiso y las bronconeumonías la segunda causa. Los pulmones con lesiones de fibrosis pleural y además intersticial, también se les encontró macroscópicamente depresiones en pleura del lóbulo caudal en el pulmón. Los hallazgos microscópicos en estas lesiones de pleura, fueron fibrosis pleural severa, y en algunos casos metaplasia adiposa, condroide y ósea. Se utilizaron procesos histopatológicos e inmunohistoquímicos para ver que en las lesiones pleurales que estaban con metaplasia adiposa, condroide y ósea las células mesoteliales tuvieron un intervención en estos cambios metaplásicos. Se encontró una fuerte inmunorreactividad nuclear al tumor de Wilms 1 (WT1) en células mesoteliales de superficie con morfología epitelial. Inversamente, las células similares a miofibroblastos debajo de la pleura mostraron inmunorreactividad a la α -actina del músculo liso (α -SMA). Este tipo de evidencias nos da los argumentos para considerar que los hallazgos histopatológicos que encontramos en lesiones pleurales son compatibles con UIP.

I. INTRODUCCIÓN.

El ganado de corrales de engorda puede ofrecer puntos de vista en la aparición de lesiones neumónicas crónicas en grandes poblaciones. Los sistemas de engorda, están diseñados para obtener en el menor tiempo posible, en el ganado bovino, un peso que exige el mercado y marmoleo en la carne de animales jóvenes. Las condiciones de hacinamiento, manejo intensivo (vacunas, cambio de dieta, transportación), y otros factores estresantes contribuyen a desencadenar problemas respiratorios, los cuales son el principal problema de salud en los sistemas de engorda

El complejo respiratorio bovino (CRB), es un término que se refiere a los casos en los que se comprometen los mecanismos de defensa respiratorios de los bovinos, facilitando la colonización de agentes infecciosos. Por lo general, hay participación de infecciones virales primarias del tracto respiratorio superior, seguidas por infecciones bacterianas oportunistas. Las bacterias oportunistas tienden a colonizar en tracto respiratorio de manera inocua, sin embargo, se vuelven patógenas a partir de los factores mencionados anteriormente señalados y su colonización en tracto respiratorio inferior.

La consecuencia patológica del CRB es una bronconeumonía que anteriormente se presentaba de manera severa y generalmente fatal. Ahora, por el contrario el CRB se presenta de forma crónica, con cuadros subclínicos que en la etapa final vuelve improductivos a los animales a pesar de los tratamientos con antibióticos de última generación. Es de esperarse que estas patologías crónicas provoquen secuelas identificables en la inspección de pulmones en el rastro, generando decomisos de vísceras y lo más importante, ocasionando pérdidas en el rendimiento y calidad de las canales de los animales afectados.

En particular, el ganado de corrales de engorda puede ofrecer puntos de vista en la aparición de lesiones neumónicas crónicas en grandes poblaciones.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC y COPD por sus siglas en inglés), es una patología pulmonar crónica en el humano y se ha sugerido su presentación en bovinos. Las características clínico-patológicas en humanos son la dificultad para respirar, tos

crónica, y baja tolerancia al esfuerzo físico. Histopatológicamente la característica principal en este síndrome es la formación de tapones de material fibrinoide mezclado con neutrófilos y macrófagos que ocluyen los alveolos y bronquiolos. En bovinos hay semejanza histopatológica con bronconeumonías de evolución crónica, cuyas lesiones guardan semejanza con EPOC y Neumonía organizada con bronquiolitis obliterante (BOOP, por sus siglas en inglés) en humanos. Más recientemente se ha reconocido un patrón neumónico diferente en donde las lesiones no implican inflamación de vías aéreas sino lesiones pleurales con fibroplasia subpleural. Estos hallazgos recientes permiten incluir a la fibrosis pulmonar idiopática del humano (FPI o IPF en inglés) como una enfermedad con proximidad histopatológica en algunas lesiones pulmonares crónicas de los bovinos. En bovinos las patogenias de estas enfermedades crónicas están en investigación y su mejor entendimiento podría arrojar un conocimiento mayor de las patogenias en humanos que aún no se comprenden por completo.

En el presente trabajo se realizarán estudios histopatológicos y morfológicos de las lesiones neumónicas crónicas que causen decomiso en pulmones de bovinos engordados en corral. A partir de las semejanzas histopatológicas se realizarán comparaciones con los patrones de neumonía crónica en humanos representativos de neumonías con daño inicial en vías aéreas (COPD), vías aéreas con extensión en parénquima (BOOP) y daño intersticial directo, como sucede en las neumonías intersticiales puras y finalmente un daño periférico desde pleura con extensión hacia el parénquima subyacente. Esta nueva concepción es representativa de la UIP. En las lesiones que ameriten investigación por su paralelismo con las descritas en humanos se evaluará el índice Reid en vías aéreas mayores, las medidas de sus espacios alveolares, las características de las células asociadas con el daño dependiendo de tinciones especiales, cortes semifinos de las lesiones e inmunohistoquímica para averiguar la expresión del gen WT1 en las lesiones pleurales, así como la diferenciación de células mesoteliales en células miofibroblásticas participantes en la fibroplasia intersticial del parénquima pulmonar.

A priori, se supone que las lesiones neumónicas crónicas en bovinos tendrán semejanza en su morfolopatología e inmunoreactividad con lesiones pulmonares crónicas en humanos.

Se espera, luego de éstos resultados, aportar conocimiento en la patogenia de las enfermedades pulmonares en humanos.

1. OBJETIVO.

Identificar los cambios macroscópicos y microscópicos inflamatorios, de fibroplasia, hiperplasia y metaplasia, establecer determinaciones comparativas morfométricas de las lesiones, así como la búsqueda de inmunorreactividad a *WTI* en lesiones pleurales crónicas, lesiones de bronconeumonía crónica y lesiones intersticiales crónicas en pulmones de bovinos decomisados durante una inspección rutinaria en rastro TIF.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Clasificación macroscópica de las lesiones pulmonares decomisadas.
- Morfometría de glándulas en bronquios. Índice Reid.
- Morfometría en corte semifino de alveolos y septo alveolar.
- Inmunohistoquímica con marcadores *WTI*, tanto en las lesiones pleurales y en el parénquima de la bronconeumonía crónica, como de la neumonía intersticial.

II. REVISIÓN.

1. MORFOLOGÍA DEL SISTEMA RESPIRATORIO.

Humanos

El tracto respiratorio anatómicamente inicia con cavidad nasal, la cual su función principal es la de humedecer y calentar el aire inspirado y es donde comienza la conducción del aire. Su continuación es la faringe que se combina en funciones con tracto digestivo y respiratorio debido a que posee la nasofaringe que se conecta con fosa nasal y la orofaringe que conecta con cavidad oral. Se continúa con la laringe la cual se protege con la epiglotis mediante la deglución y evita la entrada de alimento al tracto respiratorio. La tráquea y los bronquios, son estructuras compuestas por cartílago, y tienen la función de conducción y así como de protección para expeler partículas introducidas por el aire, por medio del aparato mucociliar de la mucosa (García-Araque, 2015; Martínez-Burnes, 2014). La tráquea avanza hacia la carina y se bifurca en bronquios, se observa que el bronquio derecho es más paralelo a la tráquea y el izquierdo es más perpendicular a la tráquea, estas estructuras (bronquios), tiene 23 ramificaciones y en la número 11 deja de haber cartílago en ellas, mientras que el intercambio gaseoso comienza hasta la número 16 (García-Araque, 2015).

Los pulmones son par y se encuentran ubicados en cavidad torácica. El ápice de ambos pulmones llega 2 cm por arriba de la primera costilla y hasta arriba de la séptima vértebra cervical. La función de este órgano es la parte final del flujo del aire y es donde ocurre el intercambio gaseoso (función más importante del pulmón). Los pulmones poseen pleura, que es una capa serosa que recubre externamente a cada uno de los pulmones y que posee dos membranas, una de ellas adherida al pulmón, la pleura visceral, y la otra adherida al interior de la cavidad torácica, pleura parietal, y finalmente entre ambas pleuras hay un espacio nombrado espacio pleural, el cual posee una pequeña cantidad de líquido (líquido pleural) cuya función es evitar que ambas pleuras tengan fricción. La pleura visceral se adentra en las fisuras de los pulmones y divide a cada pulmón en lóbulos; el pulmón derecho posee dos fisuras y por lo tanto, posee tres lóbulos (superior, medio e inferior); mientras que el lóbulo izquierdo solo posee una fisura, lo que forma dos lóbulos (lóbulo superior e inferior). La irrigación sanguínea de la pleura se debe al suministro y drenaje que recibe de los vasos bronquiales, muy similar al parénquima pulmonar al que está adherida

(García-Araque, 2015; Mukhopadhyay, 2016; Yalcin, 2013). Los pulmones son órganos de mucha elasticidad y fácil distensión, por lo que tampoco es difícil su retorno al tamaño habitual. Los dos principales movimientos de los pulmones son la inspiración y la espiración, o sea el intercambio gaseoso (entrada de oxígeno y salida de dióxido de carbono). Histológicamente la pleura visceral se observa rosácea (Hematoxilina y Eosina), debido a la presencia de fibras colágenas y elásticas; esta porción de fibras son delimitadas por células planas (mesotelio). Finalmente, la circulación pulmonar se lleva a cabo desde la arteria pulmonar y se va ramificando al igual que los bronquios y las arterias pasan por en medio de los lóbulos y las venas entre los lóbulos. A partir de la ramificación 17 de los bronquios, es cuando empieza a haber contacto de los capilares pulmonares con las áreas de intercambio gaseoso. Esta circulación sanguínea tiene por lo tanto dos funciones, la irrigación de la parte conductora y el intercambio gaseoso (García-Araque, 2015).

Mencionando más sobre el mesotelio, se sabe que es una capa que cubre las cavidades (torácica y abdominal) y sus órganos (en este caso los pulmones) como lo son el corazón, mesenterio y peritoneo, así como aparatos reproductores de machos y hembras. Anteriormente; se mencionó que el mesotelio tiene la función de cubrir y proteger al pulmón, da lubricación (por la producción de fosfolípidos, glucosaminoglucanos y proteoglucanos) para que no exista fricción entre el mesotelio de la cavidad (pleura parietal) y el mesotelio que cubre el órgano (pleura visceral) (Koopmans & Rikenvich, 2018; Samuelson, 2007). La procedencia de esta capa viene desde el mesodermo embrionario (Koopmans & Rikenvich, 2018; Mukhopadhyay, 2016). El mesotelio histológicamente es una capa de tipo epitelial y su desarrollo comienza en la cavidad celómica (cavidad embrionaria presente en todos los vertebrados), que divide externamente e internamente los componentes del cuerpo. Esta cavidad celómica se forma de la división binaria del mesodermo en su placa lateral. Cuando comienza el desarrollo del órgano (pulmón), la población celular comienza a poseer polaridad celular (apical-basal) y lámina basal, las cuales son características propias del tejido epitelial (Koopmans & Rikenvich, 2018; Samuelson, 2007). Durante adquisición de estas características celulares, se les denomina epitelio celómico, el cual es el precursor embrionario del mesotelio en los adultos. Este epitelio celómico tiene un papel fundamental en el desarrollo de los órganos de las cavidades mediante la transición epitelial a mesenquimatosa (EMT, por sus siglas en

inglés). Es a través de esta transición (EMT) que el epitelio celómico ayuda al desarrollo de varios tipos de células que participan en el desarrollo y crecimiento de los órganos, son células tales como los **fibroblastos** y células de **músculo liso**. Son estas células las que se utilizan como marcadores para hacer un rastreo de los precursores y su linaje embrionario en el mesotelio del individuo adulto. Esta transición (EMT) también está involucrada en el crecimiento y desarrollo de los órganos en la reparación de algún tipo de daño como isquemias, infartos, fibrosis, adherencias y cáncer (Batra & Antony, 2014; Koopmans & Rikenvich, 2018).

Bovinos

El tracto respiratorio en bovinos, posee dos pulmones, así como otras especies, situados en cavidad torácica (pulmón derecho y pulmón izquierdo). Los pulmones están cubiertos por pleura (visceral) y en cuanto a dimensiones, el pulmón derecho es de mayor tamaño que el izquierdo debido a la presencia de un lóbulo accesorio y a que el lóbulo apical es de mayor tamaño que el lóbulo apical izquierdo. El pulmón derecho, es donde más marcado se encuentra la impresión cardiaca y caudodorsalmente a esta impresión se halla una zona (el hilio), que carece de pleura debido a que es una zona que posee los vasos sanguíneos, linfáticos y bronquios, todas estas estructuras que entran y salen del pulmón se les denomina raíz pulmonar. Con respecto al árbol bronquial, la tráquea proporciona un bronquio traqueal solamente en el lado derecho, justo unos 10 cm aproximadamente antes de la bifurcación de la tráquea. Este bronquio pasa lateralmente para ventilar el lóbulo apical derecho del pulmón derecho y de ahí avanza a ser bronquio craneal y caudal del lóbulo apical con la separación correspondiente. A los pulmones le llegan ramas de la arteria pulmonar para su irrigación, pero lleva sangre venosa y estas ramas acompañan el árbol bronquial (Hare, 1982; Samuelson, 2007). La pleura que recubre los pulmones, histológicamente está compuesta por tejido conectivo denso irregular y por epitelio simple escamoso o mesotelio (Samuelson, 2007). Se han descrito tres clasificaciones de la pleura de acuerdo a su grosor; el primero al que pertenecen los bovinos (también los cerdos y ovinos) es el grueso, el segundo al que pertenecen los equinos (también los humanos), es de

grosor intermedio, y finalmente los perros, gatos, ratones conejos y ratas pertenecen a la clasificación de pleura delgada (Lai-Fook, 2004).

Los bovinos son susceptibles a enfermedades respiratorias debido a que tienen pulmones pequeños comparados con su tamaño corporal (Cuadro No.1). Además, poseen más vías aéreas de conducción en comparación con otras especies, lo cual compromete al pulmón directamente por exposición (bronquio traqueal) y esto se agrava porque el espacio alveolar que existe no es suficiente en proporción con la parte de conducción del tracto respiratorio. Por lo tanto, los bovinos tienen una pequeña capacidad de intercambio gaseoso, que requiere una mayor actividad de ventilación basal. Sin embargo, a pesar de que esta especie no tiene una proporción equilibrada entre superficie alveolar y conducción; la superficie alveolar si es lo suficientemente grande para que sea una especie muy susceptible de adquirir enfermedades respiratorias. Otro factor que hace susceptible a los bovinos, es que no hay flujo colateral de ventilación porque carecen de los poros de Khon (Prohl, 2014).

2. MORFOLOGÍA COMPARADA DE BOVINOS Y HUMANOS.

Aparentemente, el uso de animales como modelo humano se viene inclinando hacia la investigación con animales de laboratorio, muy probablemente debido al bajo costo, facilidad de manejo y técnicas de tipo inmunológico. Sin embargo, la utilidad de grandes especies, en especial los bovinos, se ha estado demostrando a partir de investigaciones que han arrojado resultados de que el genoma bovino es más parecido al humano en comparación con los roedores; y en los últimos años, ha venido aumentando la literatura que compara los bovinos y los humanos sobre todo en enfermedades de tipo respiratorio (Prohl, 2014; Ramírez-Romero, 2012). Se ha comprobado que tanto el hombre como los bovinos poseen pulmones amplios con una gran superficie alveolar en su cavidad torácica (cuadro No. 1). Además, anatómicamente poseen unos lóbulos pulmonares muy bien definidos y su pleura se encuentra dentro de la clasificación de pleura gruesa (bovinos) y la de los humanos de media a gruesa. La irrigación sanguínea de la pleura visceral es por vía sistémica bronquial en ambas especies y no por vía de arterias pulmonares (como en

animales clasificados con pleura delgada) (Lai-Fook, 2004; Sevin, 2011). Es por eso que se comparan, en ambas especies, la fuerza de tracción que ejerce la pleura sobre el parénquima del pulmón tanto en condiciones fisiológicas como en patologías; además el sistema vascular de los bovinos es muy sensible a los estados de hipoxia e hipertensión así como en el hombre, por esta razón los bovinos fueron el primer (y único modelo animal espontáneo) para el estudio de la enfermedad de mal de altura. Esto quiere decir que solo bovinos y el hombre son susceptibles a mal de altura cuando son expuestos a alturas mayores a los 2,220 m s. n. m. lo que desencadena hipertensión pulmonar con cambios patológicos comparables (Neary et al., 2015 Rhodes, 2005). Además, en condiciones atmosféricas normales pero en animales que han sido engordados y se encuentran en la etapa final de este proceso, la hipertensión pulmonar y la hipoxia se agravan tal cual sucede en humanos obesos (Krafsur, 2019). Por otra parte se ha informado que los bovinos tratados en varias ocasiones para CRB (en dos o tres veces), también son más susceptibles a morir de insuficiencia cardiaca derecha (Neary et al., 2016).

Cuadro No. 1 Comparación de pesos, frecuencias, volúmenes respiratorios y superficie alveolar en algunas especies animales.

Especie	Peso Corporal (kg)	Frecuencia Respiratoria (resp/min)	Volumen Aire en 24 hr. (l)	Superficie Alveolar Total (m ²)
Hombre	70	12	7,776	200
Bovino	514	30	164,160	316
Caprino	40	15	6,696	96
Canino	10	12	3,508	46.5

(Martinez-Burnes, 2018).

3. DESARROLLO Y CRECIMIENTO DEL MESOTELIO DEL SISTEMA RESPIRATORIO.

Se han realizado estudios en ratones (embriones de ratones), y está demostrado que el pulmón primordial emerge ventralmente alrededor del intestino anterior (estómago y pulmones), su aparición es como un tubo simple de epitelio endodérmico rodeado por el mesénquima esplénico del mesodermo, el cual se encuentra revestido de una capa de epitelio celómico (figura No.1). Este tubo tiene ramificaciones que posteriormente serán los sacos aéreos. Antes del desarrollo pulmonar, se encuentran unos pliegues por cada lado que vienen desde el cuerpo y se les conoce como membranas pleuroepicardiales, las cuales crecen hacia una línea media y así cada una encapsula una vena cardinal y nervios. Estas membranas se estiran de acuerdo al desarrollo del corazón con los pulmones y cierran la comunicación que haya entre espacio pericárdico y la pleura. Durante todo este proceso de desarrollo, y por la adyacencia del corazón y la pleura (pulmonar) está evidente la presencia de genes que se comparten entre el corazón y pulmones; entre ellos es el gen *Wt1* que en algún momento de este proceso se logra expresar en las células epiteliales celómicas que rodean los pulmones y los pliegues pleuropericardiales. En investigaciones de seguimientos de linaje celular, se ha confirmado que gracias a *Wt1* y otros genes, estas células epiteliales celómicas que se encuentran cubriendo los pulmones, migran hacia el interior del órgano y dan lugar a fibroblastos, alfa actina de músculo liso (α -SMA por sus siglas en inglés) y células del músculo liso. A su vez, estos componentes (fibroblastos y células de músculo liso) darán origen a arterias y venas de la pared vascular o se colocan alrededor de las vías aéreas. Estos resultados también se obtienen en investigaciones de pulmones postnatales, lo cual indica que el epitelio celómico también contribuye en el linaje de estas células luego del nacimiento (Koopmans & Rikenvich, 2018).

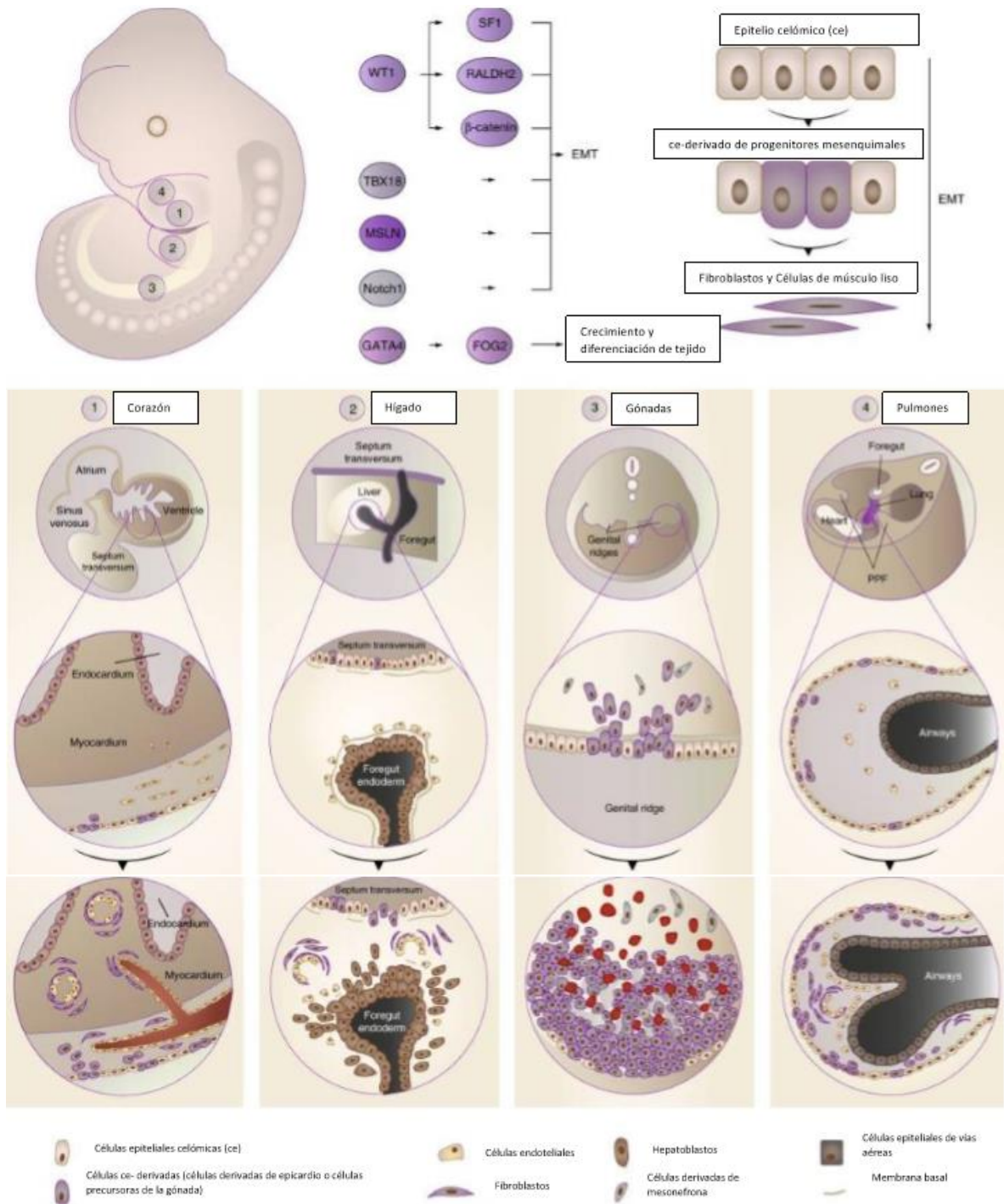


Figura No. 1. *Intervención del mesotelio en el desarrollo embrionario.*

Las células del epitelio celómico proporcionan la mayor parte del linaje fibroblástico y músculo liso del cuerpo y son un apoyo fundamental durante la transición epitelial a mesenquimatosa (EMT) en el desarrollo embrionario de diferentes órganos. Hay un grupo de genes en común, particularmente WT1 (tumor de Wilms), TBX18 (T-box 18), MSLN (Mesotelin), Notch1 y GATA4 (GATA binding protein 4), junto con sus productos que contribuyen en la transición de epitelial a mesenquimatosa (EMT) para regular la diferenciación del mesénquima. Se dan cuatro ejemplos: (1) corazón, (2) hígado, (3) gónadas y (4) los pulmones, que muestran cómo el epitelio celómico se expande e ingresa para formar fibroblastos específicos del tejido y linajes de músculos lisos (que se muestran en púrpura) en función de la EMT (Koopmans & Rikenvich, 2018).

4. LESIÓN PULMONAR CRÓNICA.

Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)

EPOC (COPD, por sus siglas en inglés), se trata de una enfermedad pulmonar común, obstructiva, de tipo crónico que se presenta en el humano (GOLD, 2018). También descrita en equinos, y recientemente propuesta en el bovino (Ramírez-Romero, 2012). Todavía no se conocen las causas específicas que provocan EPOC sin embargo, se considera que el principal factor de riesgo o la probable causa, es por una exposición constante a las partículas o gases nocivos (cigarro), alérgenos o partículas presentes en el medio ambiente y secuela de enfermedades virales como el Virus Respiratorio Sincitial (VRS) o la Parainfluenza 3 (PI-3). EPOC se caracteriza por síntomas respiratorios persistentes y progresivos, como la limitación del flujo u obstrucción de aire debido a la inflamación crónica de las vías respiratorias y destrucción del parénquima pulmonar, que es de tipo centrolobulillar y coalescentes (GOLD, 2018; MacNee, 2006). Esta destrucción de tejido se ha propuesto, en el equino, que es debido a la activación de neutrófilos, proteasas y radicales de oxígeno libres (Rickards, 2000). Dentro de los síntomas más comunes que se encuentran en EPOC en el humano y en el caballo son, la tos, disnea y en ocasiones la producción de esputo; una vez que han aparecido estos síntomas se considera que el curso de la enfermedad va de moderado a avanzado (Rickards, 2000; Petty, 2006). La secreción mucosa en exceso es desencadenado por la bronquitis crónica, además ocurre enfisema debido a la destrucción de tejido y la bronquiolitis es debido a la fibrosis que se produce por los constantes mecanismos de reparación de tejido. Estas lesiones, aunadas a las lesiones microscópicas como la formación de material fibrinoide, y la oclusión de bronquiolos y hasta los alveolos, también son observadas en lesiones bronconeumónicas representativas del CRB (GOLD, 2018; Petty, 2006; Ramírez-Romero, 2012). Una vez que el alveolo se encuentra dañado, esta misma lesión evoluciona en el daño causando incluso la pérdida de la elasticidad en las estructuras de soporte del propio alveolo (figura No. 2) (Petty, 2006).

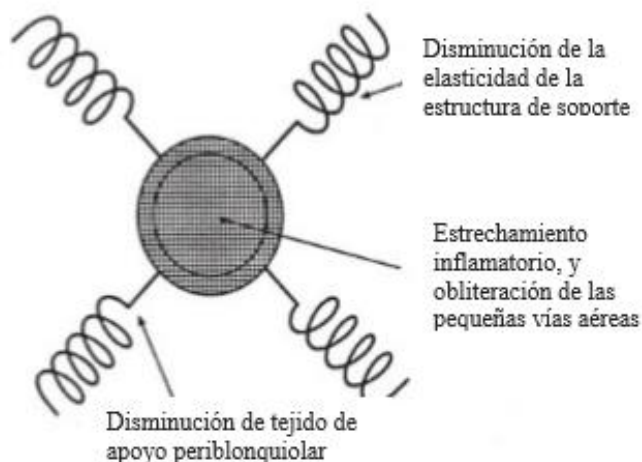


Figura No. 2. El dibujo representa la descripción de los mecanismos que obstruyen el flujo de aire debido a la pérdida de elasticidad y el estrechamiento de la vía aérea. Fuente: Petty, 2006.

Ramírez et al, 2012 ha señalado que en bovinos las bronconeumonías de tipo supurativo que ocurren en casos graves y crónicos de CRB, en su mayoría asociados a *Mycoplasma bovis*, pueden tener características de COPD porque se caracterizan por metaplasia de células caliciformes en bronquiolos terminales y tapones de moco y células exfoliadas y necróticas en bronquios menores y bronquiolos (bronquiectasia).

Neumonía organizada.

La neumonía organizada era conocida anteriormente como bronquiolititis obliterante con neumonía organizada (BOOP, por sus siglas en inglés), o neumonía organizada criptogénica (COP, por sus siglas en inglés), es un padecimiento del hombre de tipo idiopático que clínicamente se caracteriza por tos persistente, falta de aliento y disnea que puede llegar a ser severa. Como ya se mencionó el padecimiento es idiopático sin embargo, se le ha llegado a atribuir a causas como hallazgos contiguos a granulomas (por micobacterias u hongos, abscesos o tumores malignos), hallazgos en otros procesos

patológicos menores, (neumonitis hipersensible, neumonía intersticial no específica, neumonía por *Cryptococcus*); infecciones bronconeumónicas crónicas; inhalación de tóxicos (crack, enfermedad del silo, cocaína); enfermedades de tejido conectivo (como artritis reumatoide y dematomiositis-polimiositis); radiación, obstrucciones bronquiales y trasplantes de pulmón (Mukhopadhyay, 2016; Popper, 2002). Las características histopatológicas de la neumonía organizada son los tapones de granulación (también nombrados como tapones de fibroblastos, pólipos de tejido de granulación o cuerpos de Masson), los cuales se encuentran específicamente en los espacios aéreos inferiores (lúmenes de los bronquiolos respiratorios y los conductos alveolares). La presencia de estas características histopatológicas ha generado controversia debido a que la neumonía organizada no genera fibrosis intersticial (por definición) (Churg, 2018; Mukhopadhyay, 2016). Sin embargo, la neumonía organizada si tiene lesiones microscópicas intersticiales debido a que los tapones de fibroblastos se originan de intersticio y subsecuentemente llenan los espacios aéreos. Conjuntamente, el intersticio adyacente a los cuerpos de Masson se encuentra inflamado y medianamente engrosado, y en estudios recientes se ha reportado que aparecen organizaciones de tejido fibroso o incluso nódulos de tejido fibrótico en parénquima y a lo cual se ha nombrado neumonía organizada cicatrizal (Churg, 2018; Yousem, 2017).

Ramírez et al., 2012 ha comparado este tipo de neumonía con las lesiones bronconeumónicas más severas del CRB cuando la lesión toma un patrón de exudación de fibrina taponando los alveolos. Estas lesiones son más comunes en animales muertos por la enfermedad que no se recuperaron a pesar de los tratamientos y tienen un aspecto de agudo a subagudo en las lesiones.

Complejo Respiratorio Bovino (CRB)

El complejo respiratorio bovino es una enfermedad a la cual se le ha dado importancia en la investigación desde hace 30 años. La razón, es que genera importante pérdidas económicas de tipo directo (medicamentos y tiempo prolongado en el corral de engorda) e indirecto (mala calidad de la canal) en la industria del ganado de engorda así como deterioro en el

bienestar animal (Buczinski, 2018; Schneider, 2010). Los signos clínicos pueden variar debido a las causas multietiológicas del complejo respiratorio bovino; dentro de los más comunes son los de tipo sistémico (fiebre, depresión y anorexia) y respiratorios (disnea, flujo nasal y tos) (Buczinski, 2018; Buczinski, 2015). Sin embargo, a pesar de establecer esta singnología, hay mucha controversia en cuanto a la capacidad para distinguir los animales enfermos y así como pueden ser muy evidentes las descargas nasales y la depresión, hay otras veces en las que los signos no son tan evidentes y lo único que podría considerarse como alerta es la disminución del aumento diario de peso, lasitud y fiebre (Buczinski, 2018; Ramírez-Romero R., 2014). Los factores estresantes como la transportación, destete o hacinamiento, están contemplados dentro de las causas que generarán una inmunosupresión en los bovinos y este sería el principal causante para que agentes virales (Diarrea Viral Bovina, Virus Respiratorio Sincitial, Virus de la Parainfluenza-3 y Rinotraqueítis Infecciosa Bovina) y bacterianos (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, y *Mycoplasma bovis*) actúen en conjunto generando este síndrome (Arcangioli, 2008; Taylor, 2010). Microscópicamente las lesiones que se pueden encontrar en el complejo respiratorio bovino son bronconeumonía supurativa o fibrinosupurativa, bronquiolitis obliterante, atelectasia y enfisema; estas lesiones son hallazgos que se vienen encontrando durante los sacrificios en los rastros, debido a que los signos clínicos pudieron pasar desapercibidos durante la estancia del animal en el corral de engorda (mencionado anteriormente) (Ramírez-Hernández, 2015; Schneider, 2010).

Neumonía Intersticial Habitual/ Fibrosis Pulmonar Idiopática

La neumonía intersticial habitual (UIP, por sus siglas en inglés) es una enfermedad pulmonar intersticial de tipo crónico en humanos, esta enfermedad está correlacionada con la fibrosis pulmonar idiopática (IPF, por sus siglas en inglés). Esto quiere decir que la enfermedad se llama fibrosis pulmonar idiopática e histopatológicamente es neumonía intersticial habitual, se caracteriza por ser una de las enfermedades más comunes en enfermedades en el intersticio del pulmón y su causa es de tipo idiopático o alguna

enfermedad de tejido conectivo y su media de supervivencia es de 3-5 años. Sus descripciones histopatológicas comunes abarcan los focos fibroblásticos, que es la proliferación de fibroblastos localizados exclusivamente en el intersticio (podría haber células inflamatorias cercanas); además también está el cambio de panal (honeycomb), que son los acúmulos de espacios aéreos agrandados de manera irregular y conteniendo mucina en su interior y delimitados por el epitelio columnar ciliado (pueden contener macrófagos, neutrófilos desechos celulares), este epitelio columnar puede presentar metaplasia escamosa. Finalmente, la característica de patrón de mosaico (sello distintivo), es la combinación de áreas con fibrosis intersticial alternando abruptamente con focos fibroblásticos, cambio de panal y espacios sanos de pulmón. Histológicamente la neumonía intersticial habitual pudiera confundirse con neumonía intersticial no específica, y hasta en ocasiones con neumonía organizada, sin embargo ninguno de estos dos padecimientos han presentado el patrón de mosaico tan característico de UIP (Karki et al., 2014; Mukhopadhyay, 2016; Rabeyrin, 2015). Otros hallazgos histopatológicos importantes y que no son constantes como los tres anteriormente mencionados son la presencia de tejido adiposo en la pleura o en el parénquima pulmonar justo por debajo de la pleura, el cual se tiene considerado como fenómeno metaplásico; así como pequeños focos de metaplasia ósea y severa hipertrofia de la túnica media de las arterias (Mukhopadhyay, 2016). Los signos clínicos de este padecimiento son la tos y disnea progresiva en el paciente con una duración de meses (Mukhopadhyay, 2016; Søyseth, 2015). Tomando en cuenta el mesotelio como sitio de origen, gracias a los análisis clonales en pulmones con IPF se ha revelado la presencia de una población policlonal, en lugar de monoclonal, de fibroblastos. Esto sugiere que los focos fibroblásticos se deben a un proceso reactivo que responde a los estímulos ambientales locales, en lugar de a una sola neoplasia maligna que crece a través del pulmón. Estos focos son parte de un retículo fibrótico continuo que se extiende desde la superficie mesotelial hasta el parénquima pulmonar, identificando al mesotelio como la fuente de origen más probable (Koopmans & Rikenvich, 2018). Cabe señalar que una patología pulmonar compatible con UIP, anteriormente denominada alveolitis fibrosante crónica ha sido referida en bovinos de carne (Pirie & Selman, 1972).

Lesión Pulmonar Crónica en Bovinos y su Analogía en el Humano.

Las investigaciones sobre tuberculosis en bovinos se han venido utilizando como comparación de lesiones pulmonares de tipo crónico en el hombre. Este claro ejemplo del beneficio del bovino como modelo de lesiones en tracto respiratorio y linfonodos de mediastino (Lingjun, 2017). Otra enfermedad que provoca lesiones crónicas en pulmón y que acontecen en el hombre y en bovinos, sin embargo su reconocimiento principal fue en el humano es la enfermedad de pulmón del granjero (alveolitis alérgica extrínseca) provocada por *Saccharopolyspora rectivirgula* (anteriormente *Micropolyspora faeni*), la cual no debe confundirse con la enfermedad del silo (Driehuis, 2018; Schultz, 2016).

La lesión pulmonar crónica en humanos ha sido clasificada de acuerdo a los sitios en los que se origina la lesión, en primer lugar está el **daño bronquiolar primario**, un ejemplo podría ser el virus sincitial respiratorio (RSV) el cual causa lesiones de bronquiolitis en niños y que se han observado lesiones similares en el bovino causadas por el mismo virus respiratorio sincitial (BRSV) (Kalina, 2004; Ryu, 2003). El segundo lugar son **los deterioros al parénquima pulmonar con daño bronquiolar prominente**, en esta clasificación entran las lesiones ocasionadas por enfermedades como neumonitis hipersensible y la neumonía criptogénica organizada (Neumonía organizada o Neumonía organizada con bronquiolitis obliterante) y finalmente, en tercer lugar sería el **daño bronquiolar en enfermedades de vías aéreas mayores**, en donde ya se involucran enfermedades como asma y COPD (cuadro No. 2). Esta organización sirvió para explicar las patogenias del daño bronquiolar en la revisión presentada por Ramírez-Romero, et al (2012) en bovinos con neumonías cónicas (Ramírez-Romero R., 2012; Ryu, 2003). Para este propósito se le restó valor comparativo al adjetivo criptogénico (etiología no definida o idiopática) en el segundo segmento, y se le dio más valor a los casos que describían BOOP cuando las lesiones bacterianas originales por *Streptococcus* en humanos eran causas de fatalidades. Ramírez-Romero y cols. (2012), incluyeron como ejemplos representativos para el primer grupo las infecciones crónicas y/o repetitivas por el VRS en bovinos; para el segundo las infecciones bacterianas oportunistas por *Mannheimia haemolytica* y otras bacterias con potencial de desarrollar cronicidad como *Mycoplasma bovis* como representativos del daño broncointersticial y, en el tercer grupo incluyó los agentes

infecciosos pero también el polvo normalmente presente en el corral como causales del daño crónico insidioso. En todos estos casos dada la vía de entrada aerógena, como principal atributo de las bronconeumonías en el ganado bovino, la presentación crónica de lesiones no resueltas incluirían lesiones comparables en humanos (Ramírez-Romero, 2012). Además, desde 1972 se ha identificado alveolitis difusa fibrosa en ganado de engorda, la cual es comparada con su patología correspondiente en el humano (Pirie, 1972). Actualmente, la lesión es equivalente a la alveolitis fibrosante criptogénica (idiopática), que más recientemente se ha denominado fibrosis pulmonar idiopática (IPF). Sin embargo, el término fibrosis pulmonar idiopática debe aplicarse cuando el patrón corresponde a la neumonía intersticial habitual (UIP) (Gross, 2001).

Recientemente (Lanzas et al., 2010) se ha propuesto que los bovinos en engorda son excelentes modelos también de la patología de poblaciones (epidemiología), dado que representan compatibilidad anatomofisiológica con humanos y las consecuencias de padecimientos respiratorios neumónicos son comparables con el beneficio de la ocurrencia espontánea en grandes poblaciones.

Cuadro No. 2. Enfermedades Pulmonares Crónicas en Bovinos y Humanos

Enfermedades Intersticiales	
Patología	Hallazgos Patológicos
UIP	Fibrosis intersticial con patrón de mosaico, focos fibroblásticos y cambio de “honeycomb” Cambio de panal de abeja
Neumonía Organizada	Tapones de fibroblastos dentro de espacios aéreos en un fondo de coloración pálida
Enfermedades Bronquiales	
COPD	Enfisema y oclusión de bronquios y bronquiolos.
CRB (bovinos)	Bronconeumonía supurativa, y bronquiolitis obliterante

5. WT1.

El tumor de Wilms o nefroblastoma, es un cáncer pediátrico que fue descrito por primera vez por Max Wilms en 1899. Se trata de una neoplasia de tipo maligno que se presenta en infantes antes de los 5 años (Karki et al, 2014; Nakatsuka, 2006 & Scholz & Kirschner, 2005). A pesar de ser un tumor raro en la población infantil (1 de cada 10,000 niños padecen nefroblastoma), este tumor es ampliamente estudiado por varias razones, principalmente para ir mejorando los tratamientos. También porque se ha estudiado a *WT1* como un gen supresor de tumores. Finalmente, *WT1* está relacionado con el desarrollo normal genitourinario, corazón y pulmones en el embrión, así como en el proceso de formación del mesotelio en órganos y cavidades (Hohenstein, 2015; Koopmans & Rikenvich, 2018).

Gran variedad de estudios sobre este gen se han concentrado en su rol de mantener la homeostasis morfológica de la monocapa de células mesoteliales de la pleura (PMC, por sus siglas en inglés) y que a su vez, la ausencia de este gen da inicio a la transición de mesotelio a mesénquima (MMT, por sus siglas en inglés); o también nombrada transición epitelial a mesenquimatoso (EMT), permitiendo una migración hacia el parénquima, en este caso pulmonar, y la formación de fibrosis como sucede en IPF (Karki et al, 2014).

Inmunohistoquímicamente, WT1 se detecta en el núcleo de las células tumorales del tumor de Wilms y del mesotelioma; por lo tanto, WT1 se ha usado tradicionalmente como un marcador de diagnóstico para estos tumores (Nakatsuka et al, 2006).

6. CÉLULAS CEBADAS.

Las células cebadas o mastocitos (mast cell en inglés), fueron descritas por primera vez en 1878 por Paul Ehrlich como unas células granuladas metacromáticas implicadas en la nutrición del el tejido circundante (da Silva E. Z., 2014). Las células cebadas derivan de la médula ósea y aún inmaduras van hacia torrente sanguíneo, para arribar a diferentes tejidos en donde inician su maduración (Ramírez-Hernández, 2002).

Se han clasificado a las células cebadas en dos categorías. Las primeras, son las células cebadas mucosas las cuales están situadas en epitelios respiratorio, urogenital e intestinal; los gránulos de estas células están compuestos de condroitin sulfato y muy poca histamina, el tiempo de vida aproximado es de 40 días por lo que se les considera migratorias y el formaldehído no es su fijador ideal y requieren de tinciones especiales. Las segundas, son las células cebadas del tejido conectivo, su localización es en piel, cavidad peritoneal, capas del músculo intestinal, y alrededor de los vasos sanguíneos pulmonares; los gránulos de estas células contienen suficiente cantidad de heparina e histamina; el formaldehído puede ser un medio de transporte ideal para estas células (Ramírez-Hernández, 2002; Ramirez-Romero, 2000). Cabe mencionar que tanto las células cebadas mucosas pueden desarrollarse en células cebadas de tejido conectivo y viceversa, todo depende de su microambiente en el tejido (Ramirez-Romero, 2000). Dentro de las funciones de las células cebadas está la de mantener la homeostasis además de ser inmunomoduladoras de los endotelios, epitelios y sistema nervioso. Como ya se mencionó su función está asociada a reacciones alérgicas que desencadenará en una infiltración de leucocitos y el comienzo de una respuesta inmune adquirida, seguida de una fase crónica (donde hay proliferación de células cebadas por reclutamiento) que incluye inflamación persistente, remodelación de tejidos y fibrosis. La versatilidad en cuanto a función de las células cebadas no solo las coloca como los primeros mecanismos de defensa sino que también ayudan en procesos de reparación de tejido, su cicatrización y la angiogénesis (da Silva E. Z., 2014; Ramirez-Romero, 2000).

Además de que las células cebadas se han implicado en la patogénesis de varios trastornos crónicos alérgicos / inflamatorios, enfermedades autoinmunes también se han implicado en cánceres, y se le ha añadido una nueva función de plasticidad fenotípica (da Silva E. Z., 2014).

III. HIPÓTESIS.

Las lesiones pulmonares crónicas en bovinos, muestran analogía patológica con las neumonías crónicas en humanos COPD, BOOP y UIP.

IV. JUSTIFICACIÓN.

El conocimiento de la patología y la patogenia de las enfermedades pulmonares crónicas en los bovinos ofrecen una perspectiva de patologías equivalentes en el hombre. Virchow (el padre de la patología) estableció que: “Entre la medicina animal y la humana no hay una línea divisoria, ni debe haberla. (Porque), Aunque el objeto de estudio sea diferente la experiencia que se obtiene constituye la base de toda la medicina”. Lo cual crea una patología comparada de neumonías crónicas en bovinos y humanos (Day, 2010; Sundberg & Schofield, 2009).

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. NUMERO DE MUESTRAS.

Para el presente proyecto de investigación, el tamaño de la muestra se obtuvo utilizando el software Working in Epidemiology (WinEpi ©2006), tomando en cuenta que no tenemos un número conocido de población, con un nivel de confianza del 95% y un error aceptado del 5%, por lo que nos arrojó un tamaño de muestra de 385 individuos; de los cuales se utilizaron los pulmones decomisados de un rastro Tipo Inspección Federal (TIF) mediante los criterios de decomiso de los RATIF (MVRATIF), en base a las Normas Oficiales Mexicanas NOM-009-ZOO-1994 (Procesamiento Sanitario de la Carne) y la NOM-031-ZOO-1995 (Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina) y en base al criterio de los médicos veterinarios zootecnistas autorizados TIF.

2. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS.

De todos los pulmones estudiados (decomisados y controles no decomisados) se obtuvieron muestras de 2 cm² (Figura 3). Estas muestras se obtuvieron desde la periferia incluyendo pleura hacia el interior del parénquima. Todas las muestras fueron del pulmón derecho (Figura 4) (figura 3). Los sitios de muestreo se establecieron de manera rutinaria: dos muestras del lóbulo craneal; una de ellas de la parte craneal (sitio F) y la otra adjunta al bronquio traqueal (sitio G, figura 5). Cuatro muestras del lóbulo caudal; dos de ellas en la parte dorsal (sitios A y B) y las otras dos en el borde caudal (sitios C y D). Finalmente, una más del lóbulo medio (sitio E). Si durante la obtención de muestras nos encontrábamos con alguna lesión de interés, también se recolectaba y se procesaba pero su identificación no correspondía a ninguno de los sitios ya establecidos sino que era manejada por separado con diferente identificación en particular.

Las muestras fueron transportadas en formalina amortiguada al 10% para la técnica histológica convencional de hematoxilina y eosina (H&E). Mientras que el medio de transporte para los cortes semifinos fue glutaraldehído. El tiempo de fijación en formol fue mayor a 24 horas, pero menor de 48 horas debido a que se realizaron técnicas de Inmunohistoquímica (IHQ), por lo que períodos mayores a 48 horas hubieran afectado la expresión de los marcadores (Harlow & Lane, 1999; Heffess & Mullick, 1992).

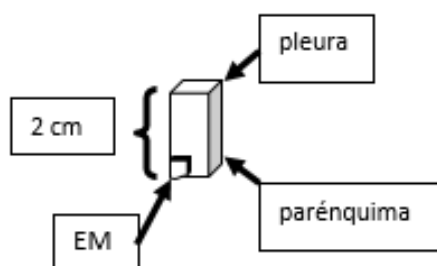


Figura 3. El corte abarca desde pleura hasta parénquima. EM es el corte para microscopía electrónica (corte semifino).

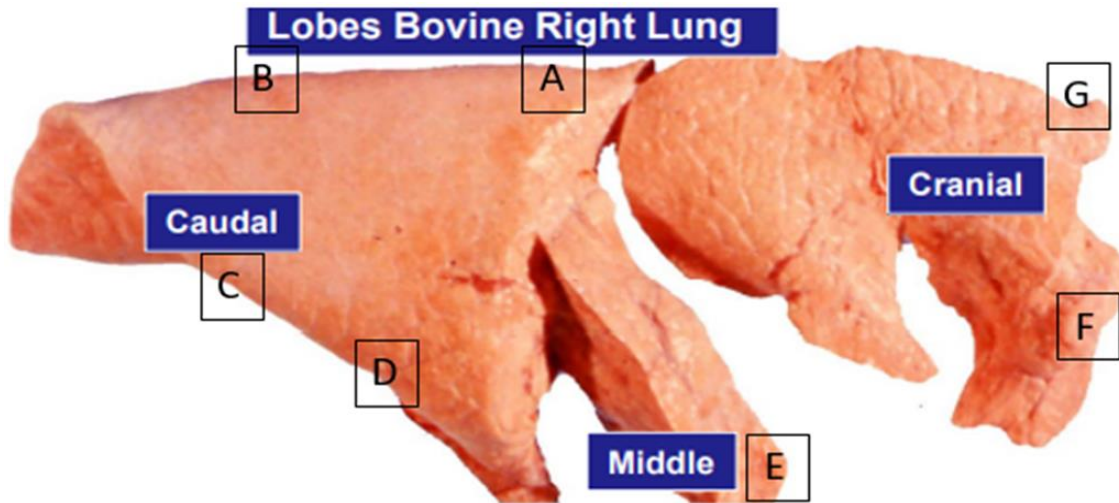


Figura 4. Pulmón derecho de bovino. A, lóbulo medio en su parte dorsal. B, caudal en su parte dorsal. C, lóbulo caudal en su parte caudal. D, lóbulo caudal en el extremo derecho. E, lóbulo medio en extremo derecho. F, lóbulo craneal en el extremo derecho. G, bronquio traqueal junto con parénquima pulmonar. Fotografía: Dr. Alfonso López

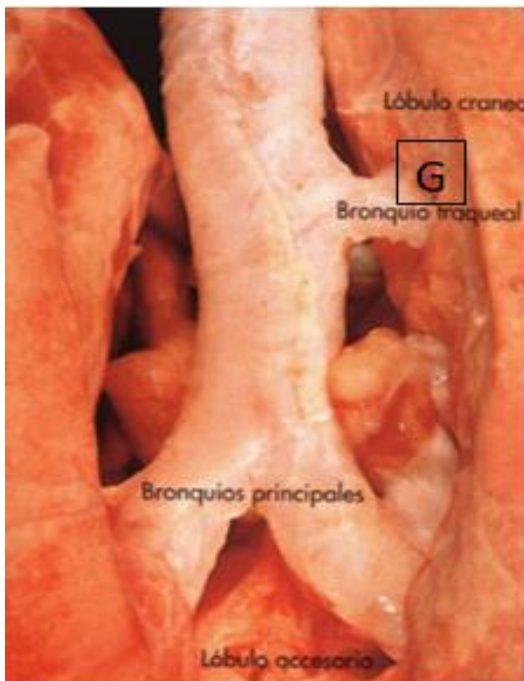


Figura 5. Tráquea con su bronquio traqueal y su bifurcación. Sitio de muestra es bronquio traqueal junto con parénquima pulmonar.

3. CLASIFICACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS PULMONES DECOMISADOS.

Después de la inspección y decomiso por parte del veterinario autorizado, todos pulmones decomisados fueron revisados, palpados y reconocidos en su orientación de las lesiones observadas, la mayoría de ellos fueron fotografiados. De acuerdo a las lesiones encontradas, los pulmones fueron clasificados como **bronconeumonía crónica**, que incluyen consolidación del parénquima craneal; y en la otra clasificación fue por lesiones pleurales o **fibrosis pleural** en ausencia de consolidación del parénquima. Además, nos fueron otorgados dos pulmones no decomisados, sin lesiones, con la finalidad de obtener muestras de animales sanos o controles.

4. ÍNDICE REID.

El índice Reid se definió desde 1960 en las bronquitis crónicas para establecer de manera cuantitativa el grosor de las glándulas mucosas que se encuentran entre el cartílago bronquial y la membrana basal de la mucosa epitelial (figura 6). Se utilizaron los cortes no mayores a 5 μ de grosor en tinciones de H&E para medir desde el cartílago hasta la lámina basal del epitelio y el grosor de las glándulas mucosas de los bronquios. Se registraron los datos obtenidos de la fórmula Índice Reid = glándula/ pared ($IR = A/B$). En la figura 6 se observa con detalle cómo fueron tomadas en cuenta las medidas de “glándulas” y “pared” respectivamente (Gil, 2013; Reid, 1960). Posteriormente, los resultados obtenidos se analizaron mediante un diseño completamente al azar y subsecuentemente se utilizaron para compararlos mediante la prueba de Tukey.

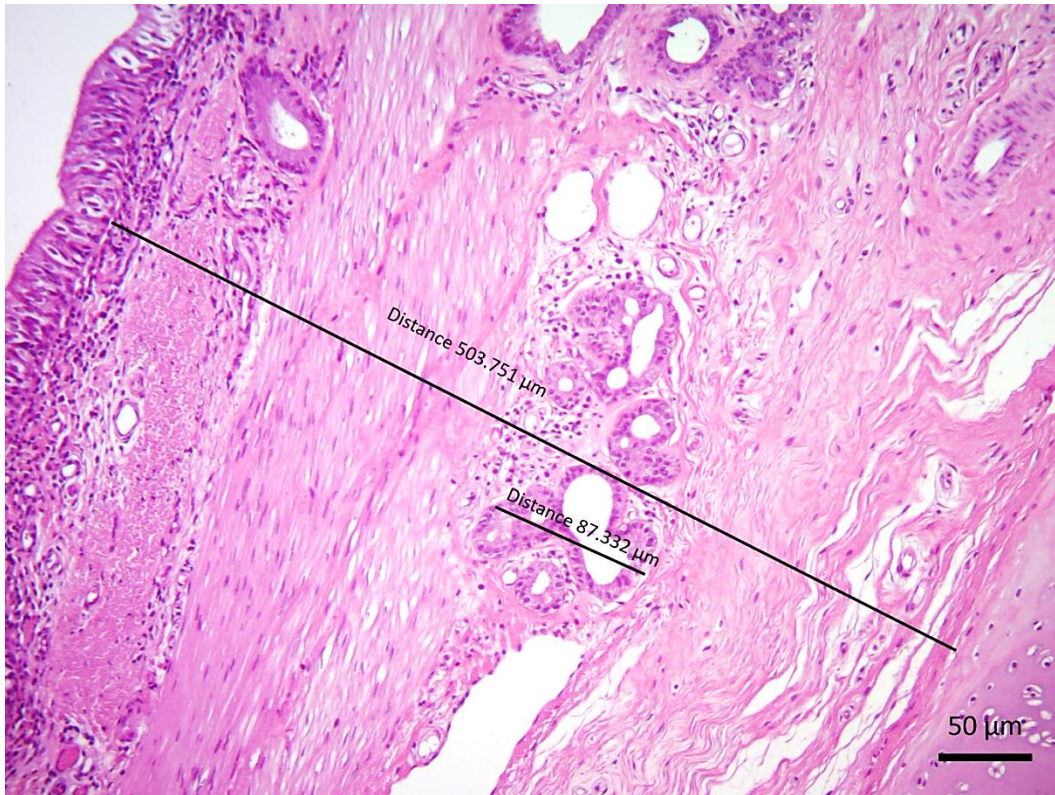


Figura 6. Pulmón de bovino. Índice Reid= glándula/ pared (grosor de la glándula/ desde membrana basal del epitelio hasta cartílago bronquial). H&E, 100X.

5. PROCEDIMIENTO HISTOPATOLÓGICO Y CORTE SEMIFINO.

Las muestras que fueron preservadas en formol al 10%, fueron procesadas por la técnica histopatológica convencional que comprende deshidrataciones en alcohol de diferente concentración, aclaramiento e inclusión en parafina. Posteriormente, son cortadas en un micrótopo a 4 μ , extendidas en un baño de flotación, rehidratadas y teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). Además, también se utilizó la tinción especial de Tricrómico de Masson (figura 7) (Grizzle, 2010; Heffess & Mullick1992).

Las muestras que fueron preservadas en glutaraldehído al 2.5%, fueron procesadas para la técnica de corte semifino y teñidas con azul de toluidina, este proceso amerita que después de la fijación haya una posfijación en tetraóxido de osmio al 2%; subsiguientemente son

incluidas en resina sintética, cortadas en ultramicrotomo a 0.8μ y finalmente, ser teñidas en azul de toluidina.

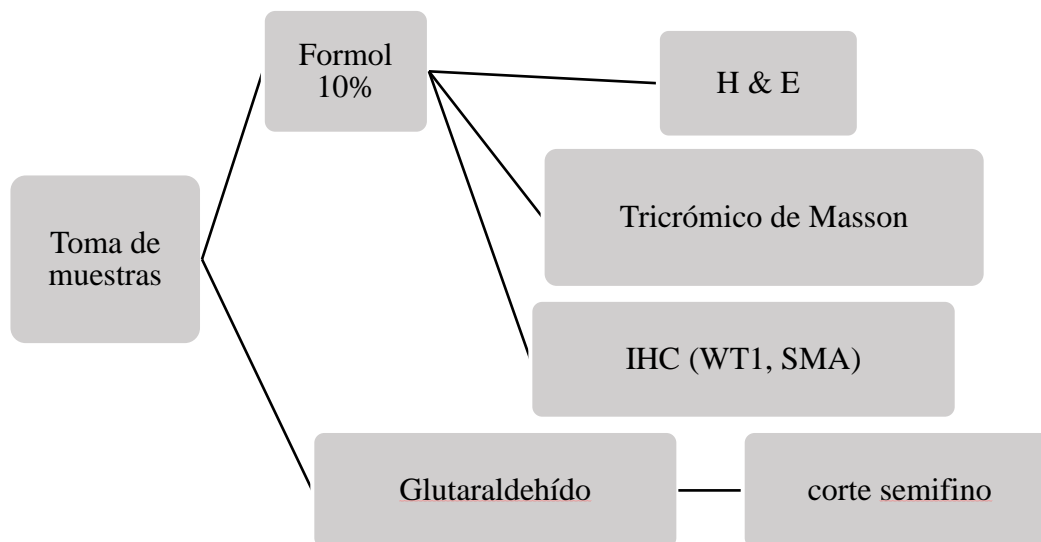


Figura 7. Esquemas de procedimientos.

6. PROCEDIMIENTO PARA EL CÁLCULO DE ESPACIOS ALVEOLARES Y SEPTOS ALVEOLARES.

Los valores de los alveolos y septos alveolares se obtuvieron de los sitios de muestreo establecidos (figura 4). Para los alveolos, se midieron sus límites internos desde 4 diferentes ángulos y fue lo mismo para cada alveolo (figura 8), posteriormente se realizó un promedio de estos 4 valores. La cantidad de alveolos medidos no fueron los mismos para cada sitio de pulmón muestreada; la razón, es que en la técnica de cortes semifinos no es posible obtener un campo visual en el microscopio óptico con alveolos completos y se desecharon los alveolos que se observaban incompletos. Para los valores de los septos se midieron transversalmente los septos que se encontraban adyacentes a los alveolos utilizados para medir el espacio alveolar. Después de que se obtuvieron medidas tanto de alveolos como de septos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para observar las diferencias

muestra, adición de los anticuerpos primarios monoclonales de ratón, contra la proteína de tumor de Wilms humana (WT1 10 clon 6F-H2, listo para usar FLEX, Dako) y contra proteína de α actina de músculo liso humano de ratón (clon α -SMA 1A4, listo para usar FLEX, Dako). Subsiguientemente, se agregó el anticuerpo secundario con un conjugado de estreptavidina y cromógeno, para finalmente de forma manual contrastar con hematoxilina y montar la laminilla.

VI. RESULTADOS.

1. DECOMISOS Y CLASIFICACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS LESIONES.

Se obtuvieron 35 decomisos de 395 animales observados, y de esos 35 decomisados, posteriormente se clasificó la razón del decomiso, observando que 23 fueron por fibrosis pleural (FP), 10 por bronconeumonía (BNM) y 2 se consideraron sanos y recolectados únicamente para servir como controles (CL. Cuadro No. 3).

Cuadro No. 3. Se obtuvieron 35 decomisos y se separa de acuerdo a la clasificación de su lesión.

2 animales control. Pulmones no decomisados sino facilitados con la intención de su inclusión como controles (Se incluye como referencia una fotografía de un pulmón sano proporcionado por Dr. Alfonso López)



10 animales con bronconeumonía. Note la lesión con distribución craneoventral y principalmente los bronquios distendidos (bronquiectasia).



23 animales con fibrosis pleural. Se aprecia una proyección pleural irregular, suave e hiperémica o bien zonas de depresión alternando con zonas gruesas en pleura. Estas lesiones no ocurrieron en los pulmones considerados bronconeumónicos.



Además de la fibrosis pleural (FP) presentada en 23 animales, varios de ellos (9) tuvieron lesiones que se apartaban de la fibrosis. Estas lesiones eran zonas deprimidas y duras



2. LESIONES MICROSCÓPICAS.

La figura 9 demuestra la lesión microscópica que se encontró en pulmones con BNM.

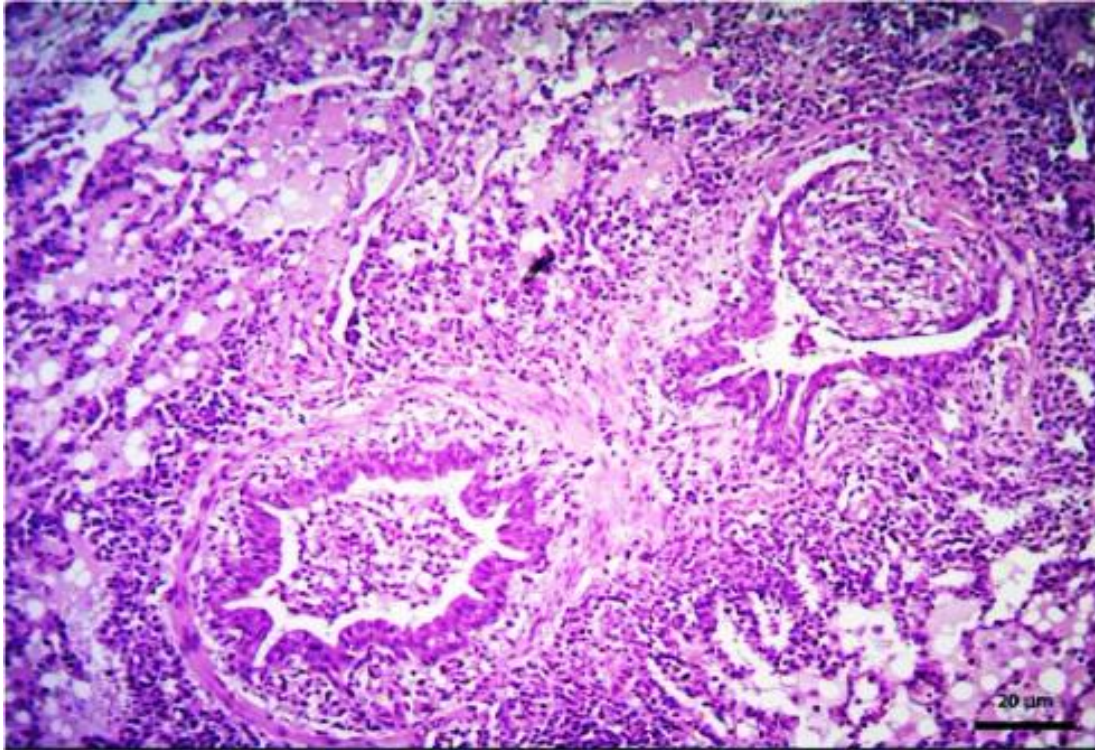


Figura 9. Pulmón de bovino. Lesión microscópica hay exudado que ocluye dos bronquiolos (bronquiolitis obliterante) H&E.

3. ÍNDICE REID.

En las medidas de las glándulas mucosas de los bronquios no se observó diferencia entre los individuos afectados ya sea por BNM o por FP, la diferencia notable fue en los animales sanos comparados con los animales con lesiones (cuadro No. 4).

Cuadro No. 4. Diseño completamente al azar y comparación de Tukey

Análisis de las medias del índice Reid obtenido entre BNM, FP y CLs

	N	Mean	SE	P
BNM	10	0.1948	0.0202	0.0421
FP	23	0.1974	0.0133	
CL	2	0.0734	0.0452	

Método de Comparación Tukey

	Media	Grupos
NI (pleuritis)	0.1974	a
BNM	0.1948	a
CL	0.0734	b

Sin importar si se trata de bronconeumonía o neumonía intersticial, los valores del índice Reid están dentro del mismo rango, no siendo el caso del animal sano.

4. CORTES SEMIFINOS

En el cuadro No.5 observamos que las medidas de los alveolos son significativos, por lo que hay diferencias entre los resultados del animal con BNM, el de FP y el CL. Sin embargo, una vez utilizados estos resultados y comparándolos mediante Tukey vemos que los alveolos del animal CL y el de FP son diferentes, pero el animal BNM, sus medidas, tiene similitud con el CL o el de FP.

El cuadro No. 6 la prueba de ANOVA nos hace ver que también en septos alveolares los resultados son significativos entre los valores del animal con BNM, con el de FP y el CL. Para la comparación de medias en Tukey, el animal con FP es el que se encuentra con medidas similares ya sea con el animal BNM o el CL, mientras que entre CL y BNM, no hay similitud de sus valores.

Cuadro No. 5. Análisis de Varianza en Medidas de Alveolos

Fuente	gL	SS	MS	F	P
BNM, FP, CL	2	939.86	469.932	5.01	0.0126
Error	33	30.94.31	93.767		
Total	35				

Nota: SS es el margen (tipo III) de suma de cuadrados

Gran Media 28.431

CV 34.06

Comparación de medias de Tukey de alveolos

Tratamiento	Media	Grupos homogéneos
CL	35.384	a
BNM	26.395	ab
FP	23.514	b

Alpha 0.05 Error estándar para comparación 3.8764 -4.0421

Valor Crítico Q 3.471 Valor crítico para comparación 9.5141 - 9.9206

Cuadro No. 6 Análisis de Varianza en Medidas de Septos Alveolares

Fuente	gL	SS	MS	F	P
BNM, FP, CL	2	256.923	128.462	5.37	0.0096
Error	33	790.161	23.944		
Total	35				

Nota: SS es margen (tipo II) de la suma de cuadrados

Gran Media 8.0574 CV 60.73

Comparación de Medias de Tukey de septos alveolares

Tx	Media	Grupos Homogéneos
BNM	11.119	a
FP	8.542	ab
CL	4.511	b

Alpha 0.05 Error estándar para comparación 1.9589 - 2.0426

Valor Crítico Q 3.471 Valor crítico para comparación 4.8078 - 5.0132

5. HALLAZGOS MICROSCÓPICOS DE LESIONES CON FIBROSIS PLEURAL.

En el cuadro No. 2 se observan las muestras que presentaron fibroplasia de la pleura caudal en los pulmones decomisados con FP, la cual es una lesión de tipo no infeccioso y su correspondiente lesión microscópica es una fibrosis intersticial subyacente. También se reconocieron zonas

deprimidas y duras que microscópicamente correspondieron con zonas de metaplasia. La figura 10, pertenece a un pulmón con fibrosis pleural, justo en el sitio de la proyección pleural.

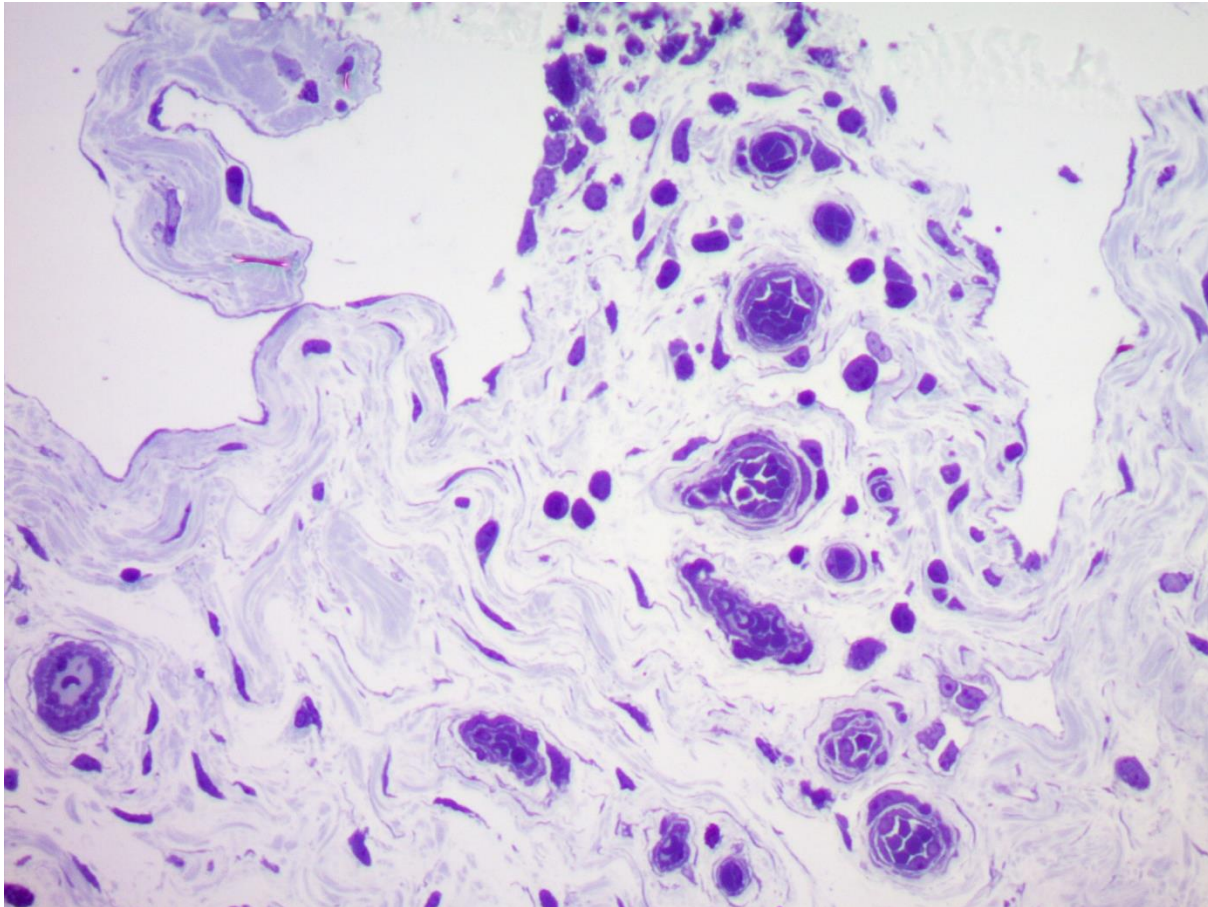


Figura 10. Pulmón de bovino. Se aprecian algunos vasos sanguíneos con linfocitos y fibroblastos rodeados de matriz colagenoide. Esta sección corresponde al exceso de pleura que se observa como proyecciones en los bordes del lóbulo caudal del pulmón. Corte semifino con azul de toluidina 400X.

Las figuras 11, 17 y 24, representan la metaplasia que se encontraba en las zonas de depresión y de consistencia duras que se señalan en la figura 11. Dicha metaplasia podía ser adiposa (figuras 12, 13, 14, 15 y 16), condroide u ósea. La figura 17 muestra la metaplasia condroide en H&E, mientras que la figura 18, muestra el mismo campo con tinción de tricrómico de Masson. Las figuras 19, 20 y 21 muestran la inmunorreactividad a WT1, en diferentes aumentos. Las figuras

22 y 23, son los mismos campos que la figura 17, pero con inmunorreactividad positiva a α SMA en diferentes aumentos. Finalmente la figura 25 muestra cuatro insertos con lesiones compatibles a UIP.

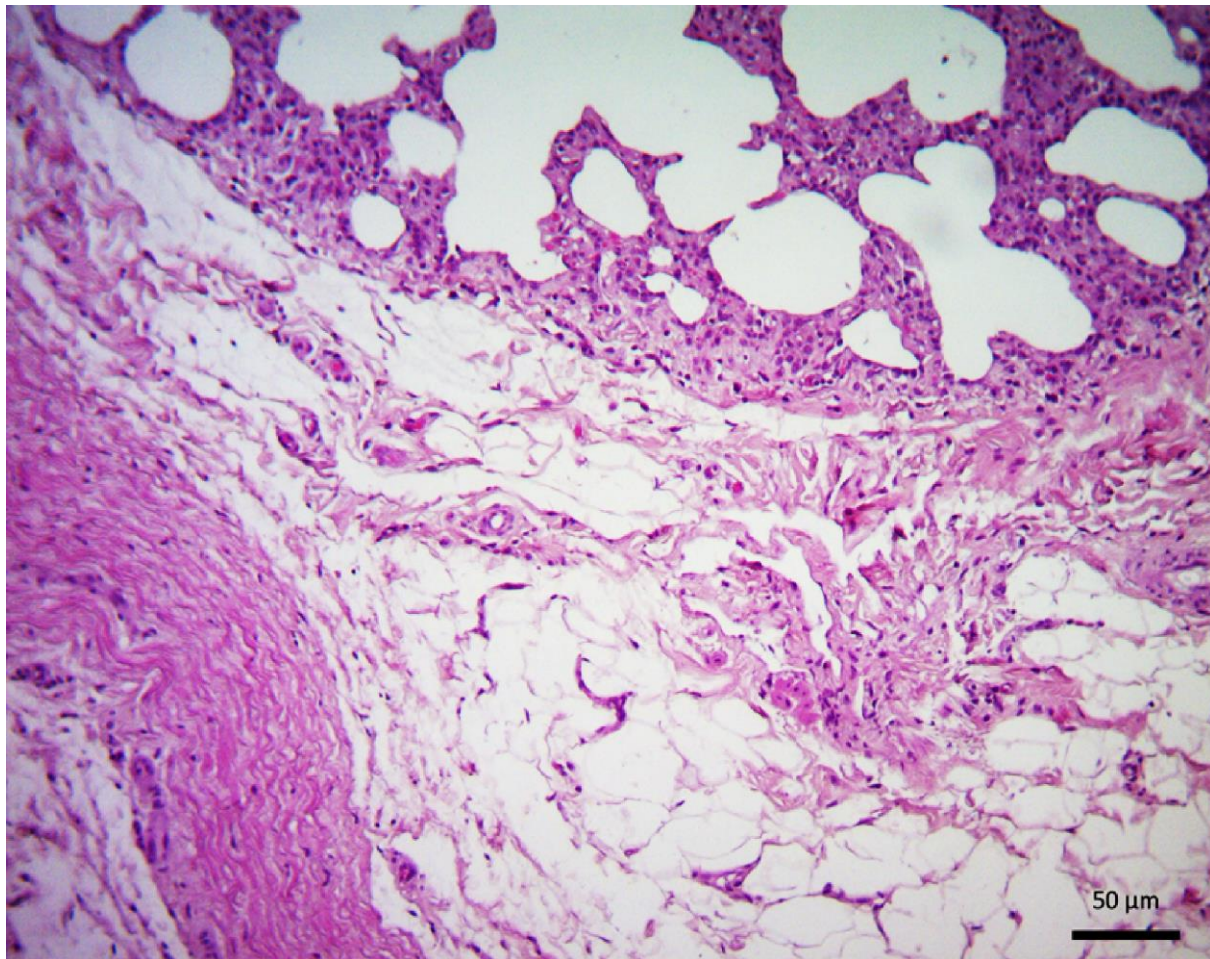


Figura 11. Pulmón de bovino. Severa Pleuritis, metaplasia adiposa y engrosamiento de septos alveolares. H&E 100X.

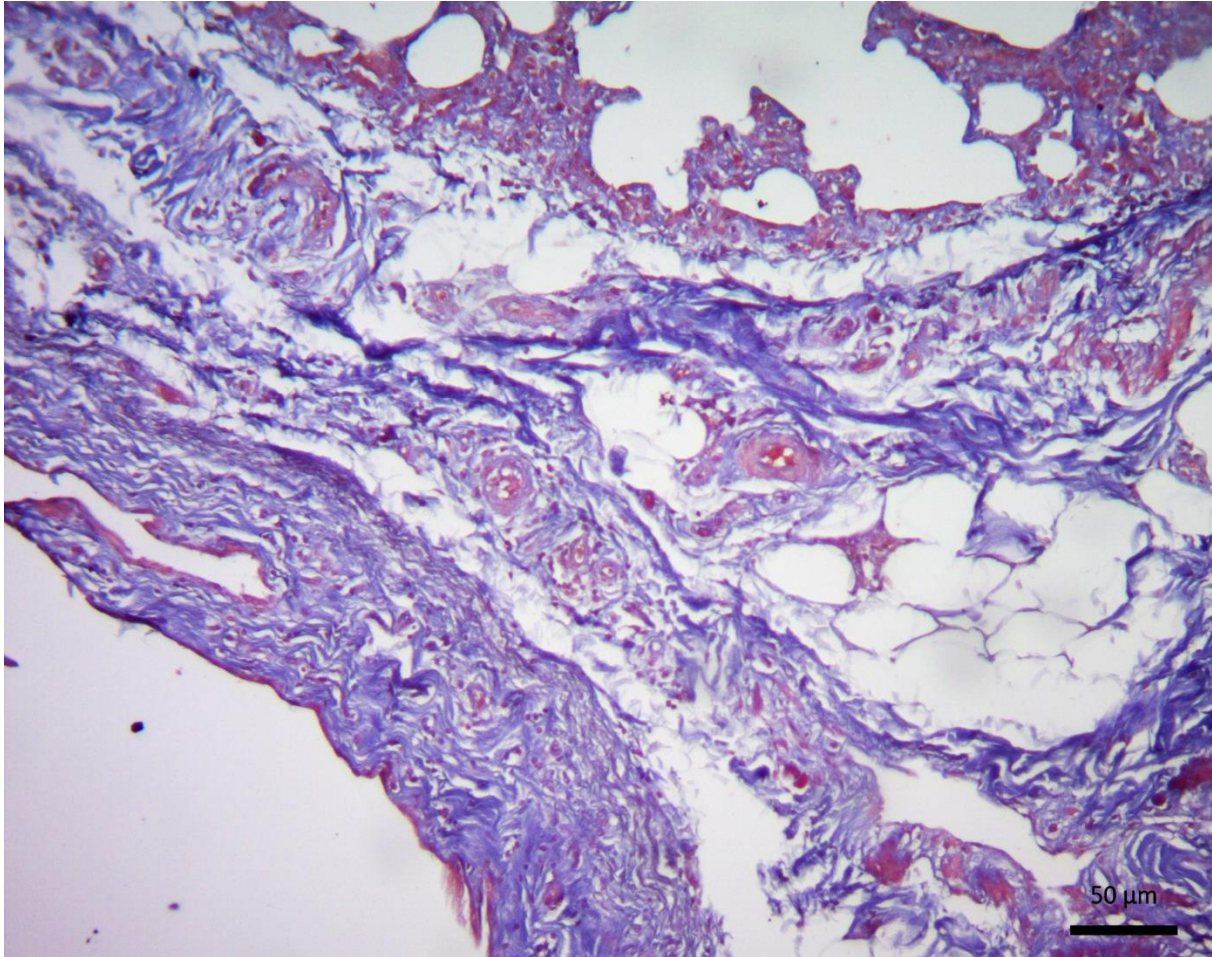


Figura 12. Pulmón de bovino. Fibrosis Pleural severa, metaplasia adiposa. El tejido conectivo fibroso está teñido de color azul mientras que los componentes musculares (escasos), se tiñen de rojo. Tricrómico de Masson, 100X

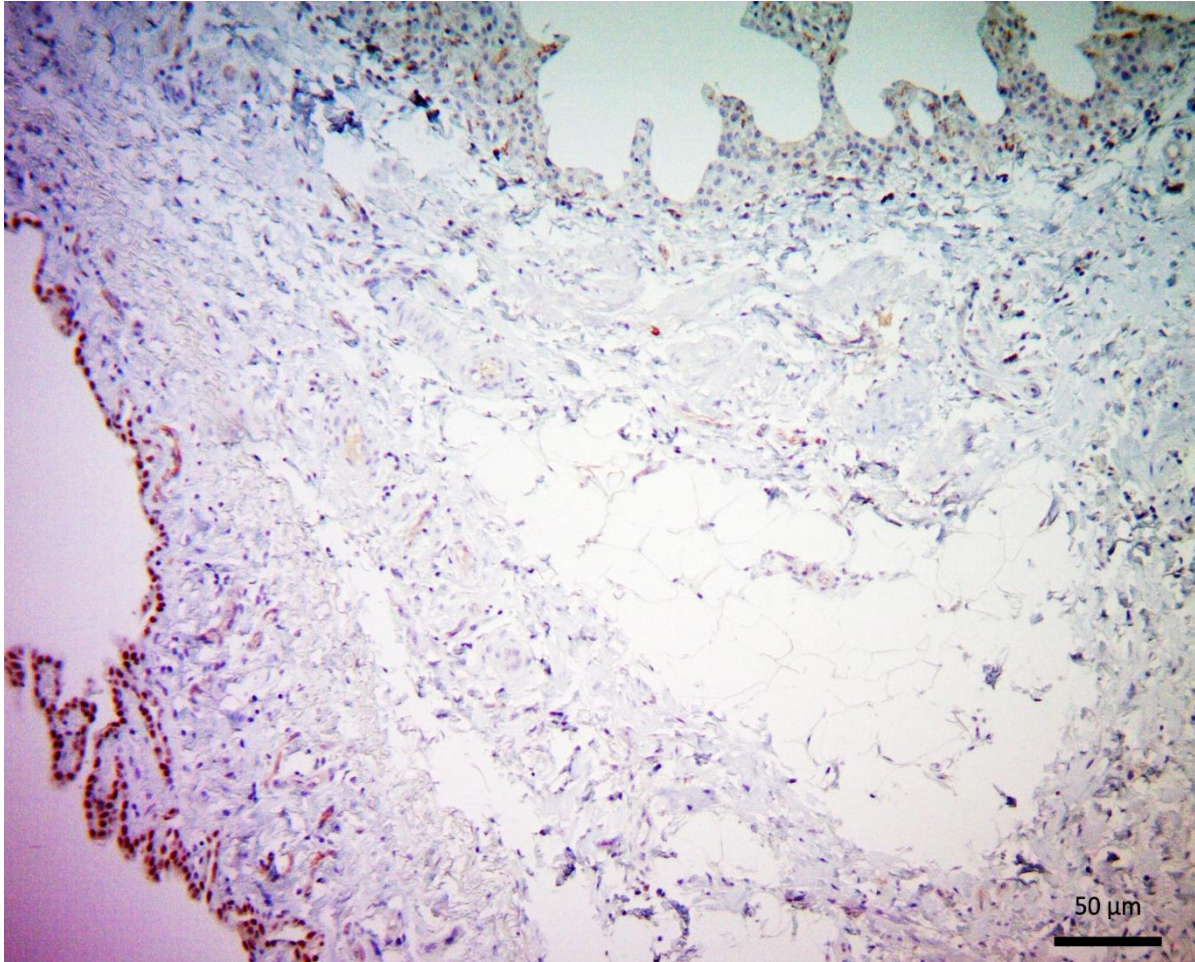


Figura 13. Pulmón de bovino. Pleuritis severa, metaplasia adiposo. Las células del mesotelio y escasas células submesoteliales muestran inmunorreactividad a WT1. No hay inmunorreactividad en ninguna otra zona del campo. WT1 100X.

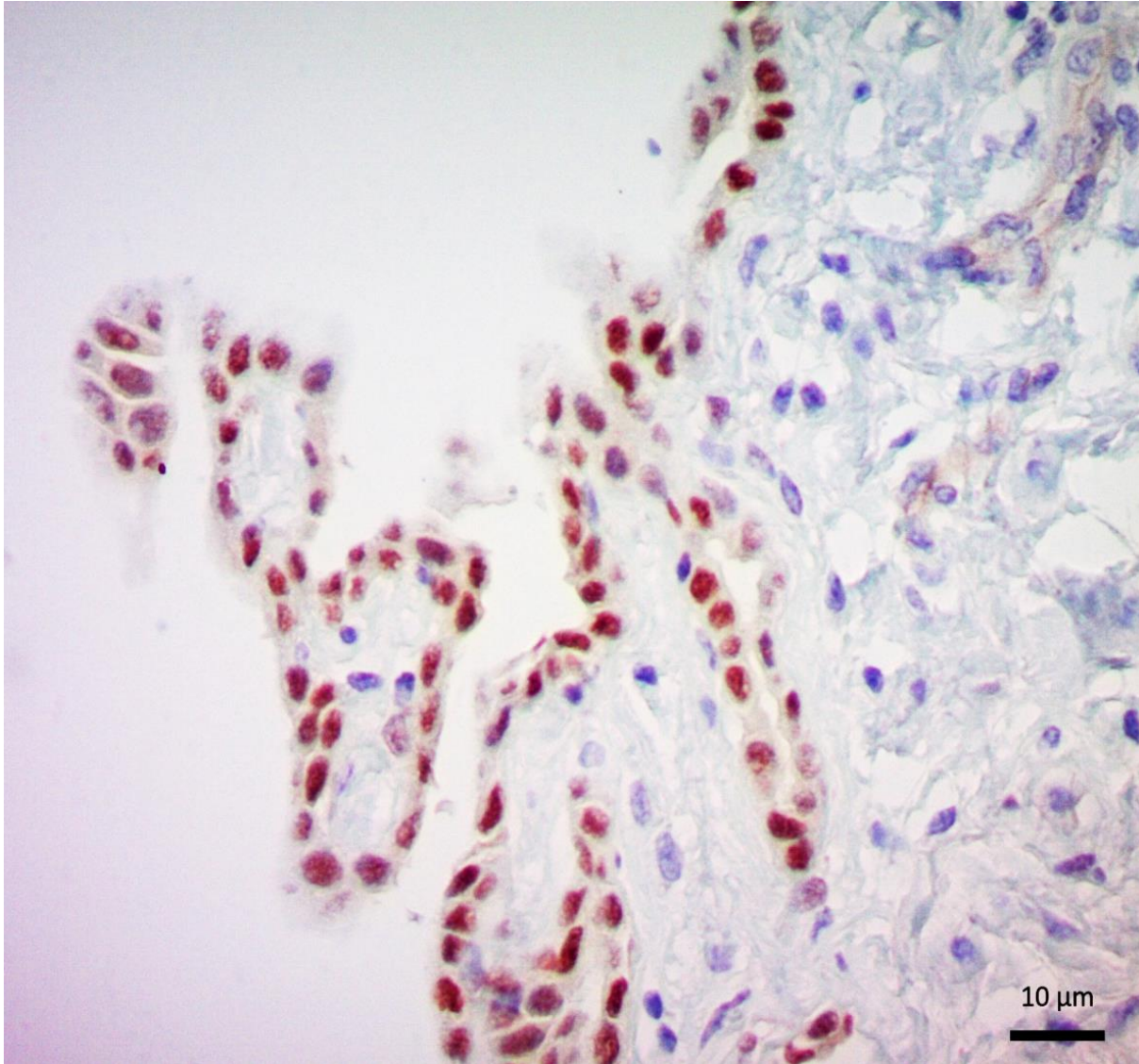


Figura 14. Pulmón de bovino. FP severa, metaplasia adiposa. Con mayor aumento, las células no se muestran planas (el epitelio escamoso plano es la morfología normal de las células del mesotelio), hay una mejor confirmación de que son células inmunorreactivas a WT1. WT1 400X.

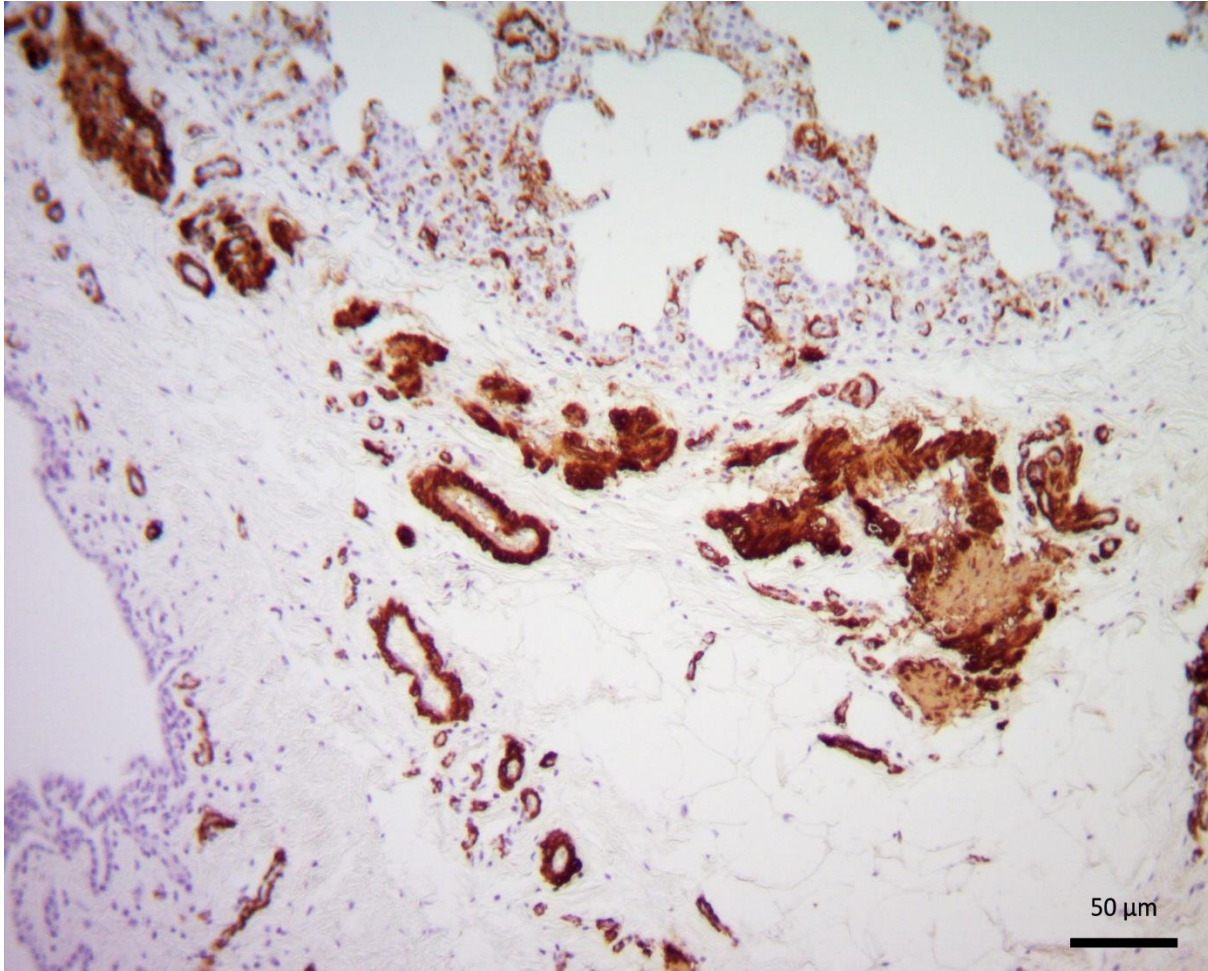


Figura 15. Pulmón de bovino. FP severa, metaplasia adiposa y engrosamiento de septos alveolares. Se observa que hay inmureactividad a α SMA solo en vasos sanguíneos y nula inmunorreactividad en mesotelio. α SMA 100X

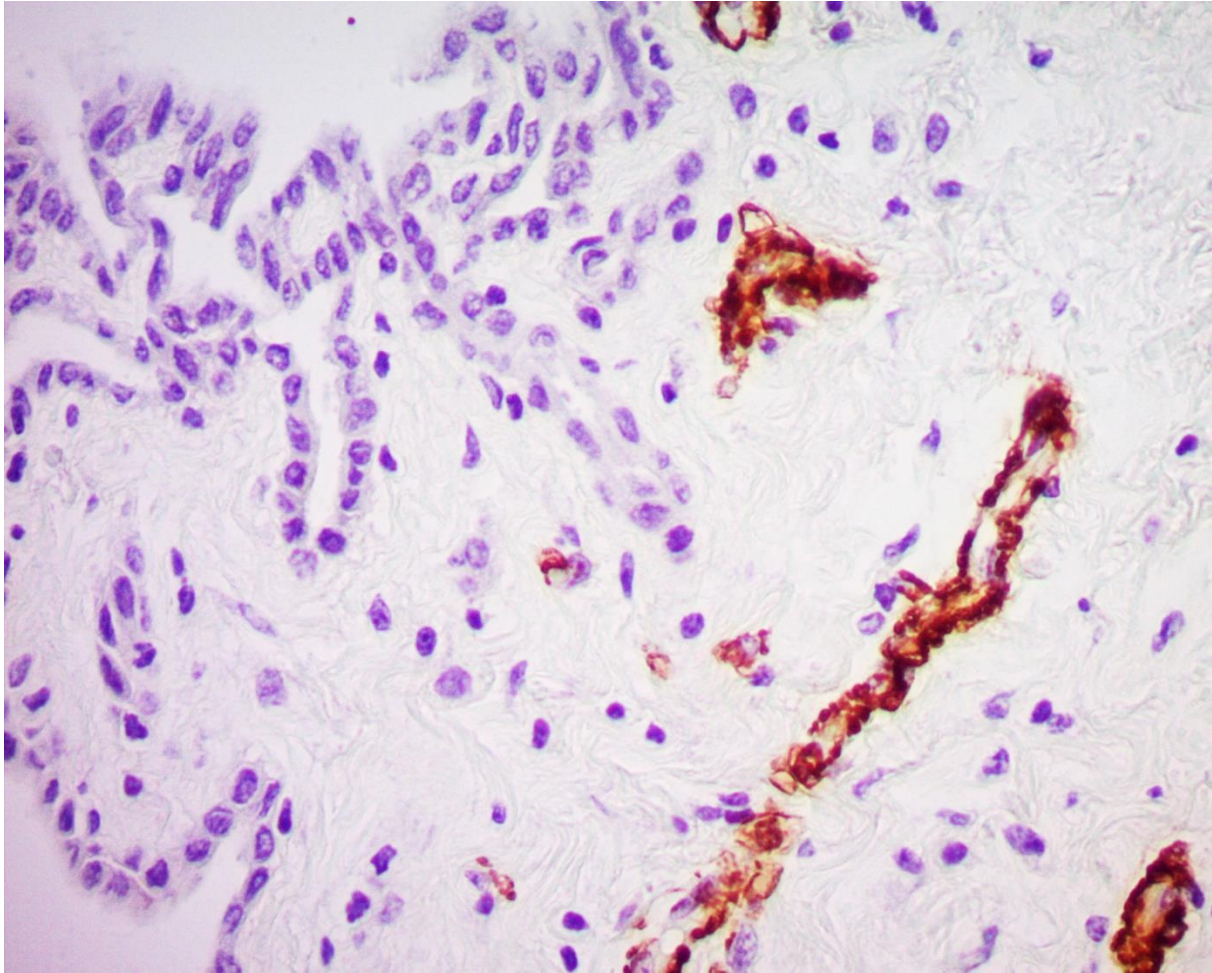


Figura 16. Pulmón de bovino, FP severa y metaplasia adiposa. En este campo con mayor aumento se observa que hay inmureactividad a α SMA solo en vasos sanguíneos y nula inmunorreactividad en mesotelio. α SMA 400 X

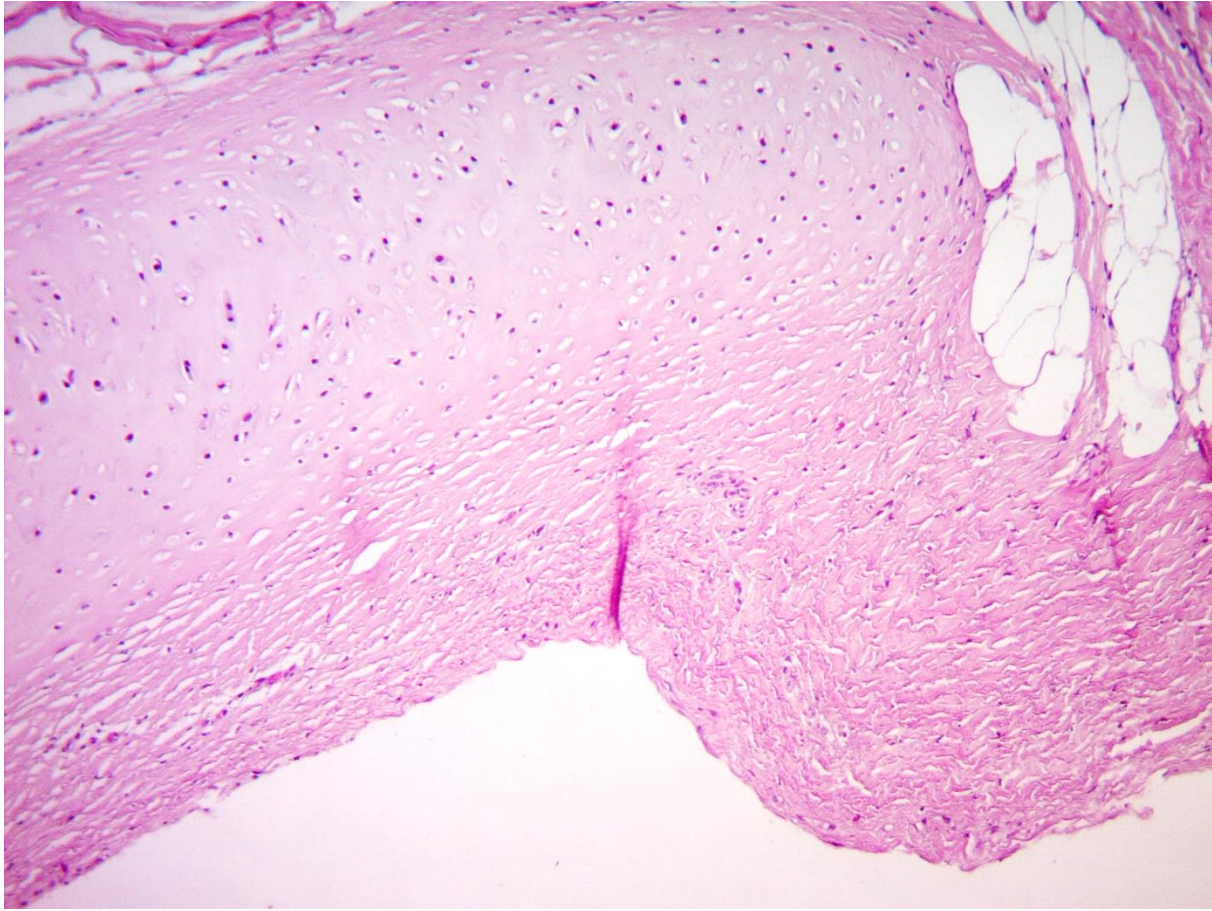


Figura 17. Pulmón de bovino. Fibrosis Pleural severa y metaplasia condroide. H&E 100X.

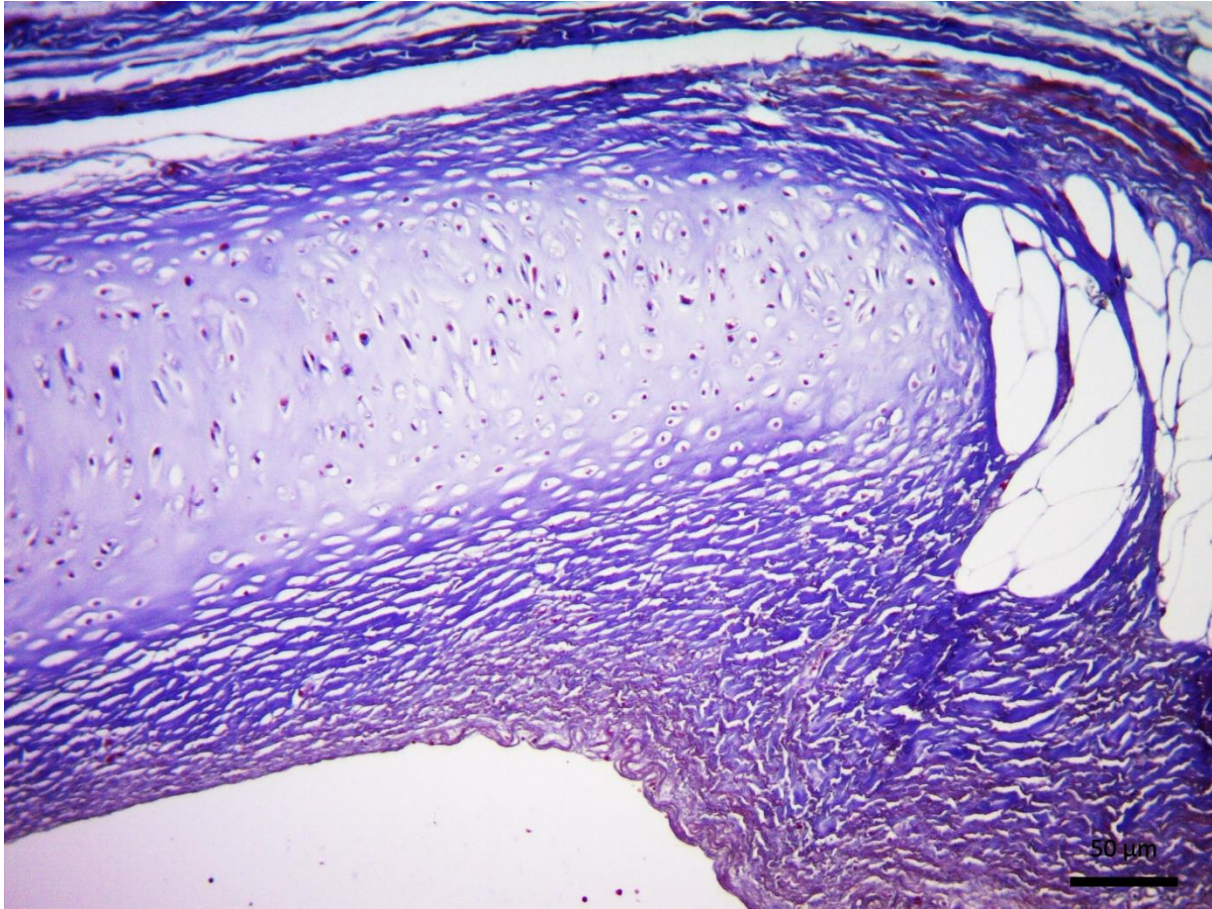


Figura 18. Pulmón de bovino. FP severa y metaplasia condroide. Se observa que el tejido conectivo fibroso y el cartílago (tejido conectivo) se tiñen de color azul. Tricrómico de Masson 100X.

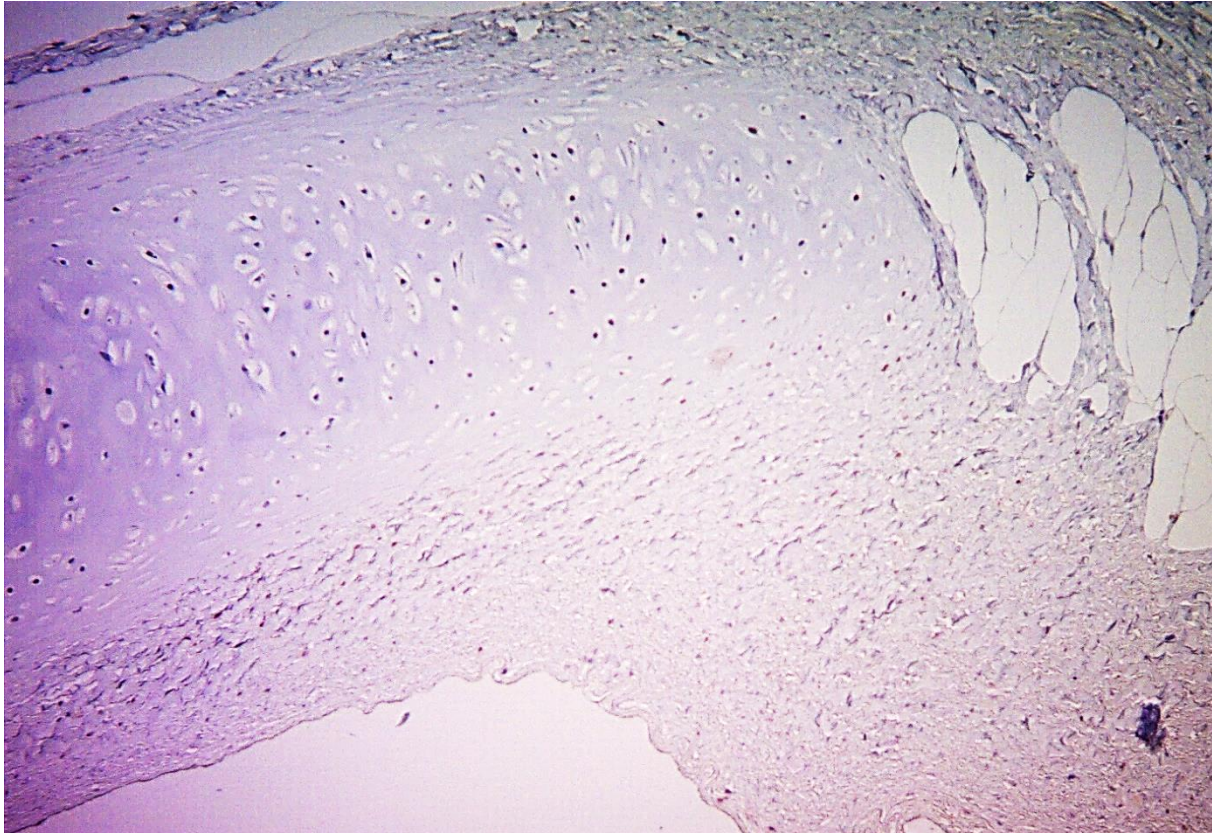


Figura 19. Pulmón de bovino. FP severa, metaplasia condroide. Hay inmunorreactividad en células del mesotelio, pero es más evidente hacia las células submesoteliales, inclusive en células adyacentes al cartílago. WT1 100X.

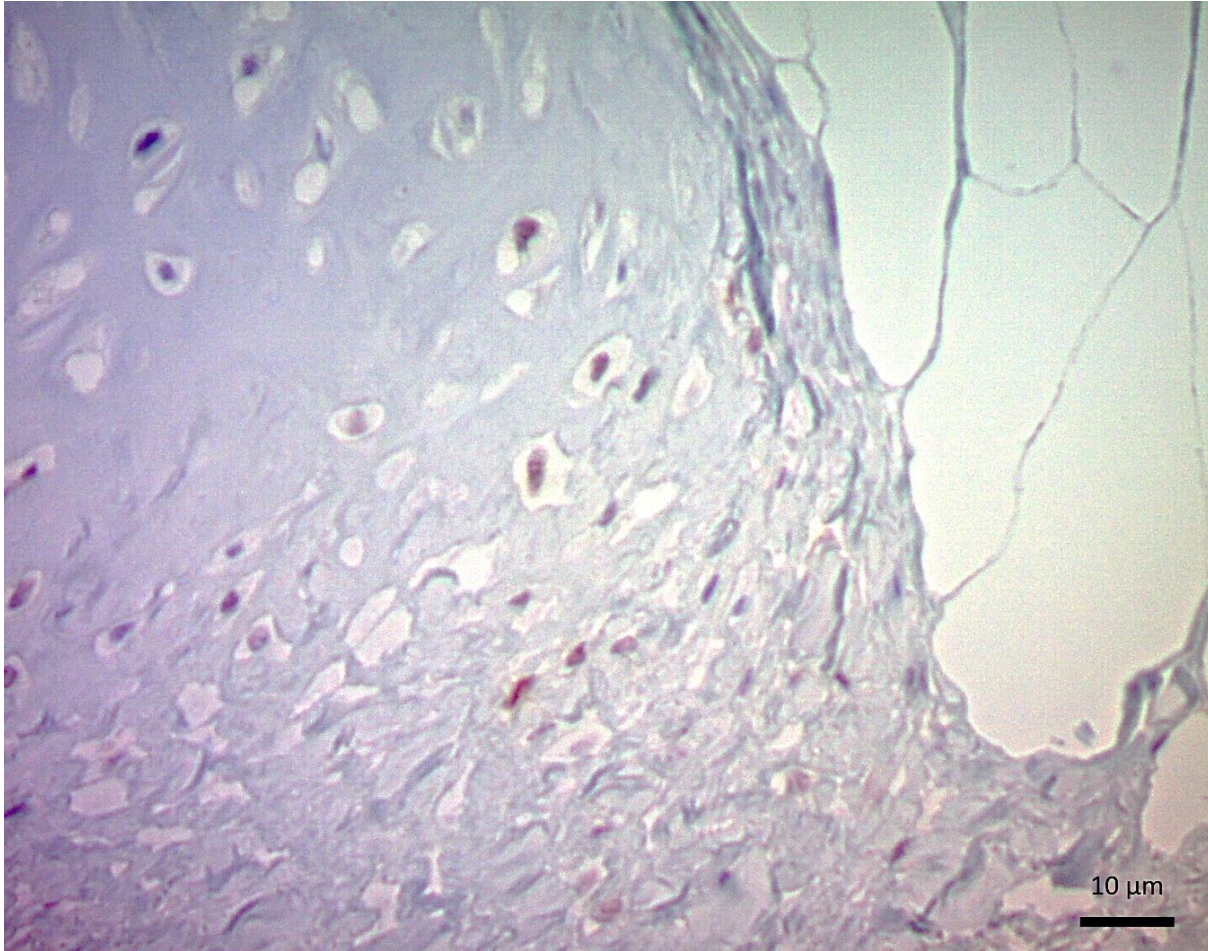


Figura 20. Pulmón de bovino, FP severa, metaplasia condroide. Con mayor aumento se observa que hay inmunorreactividad en el núcleo de células que se encuentran en laguna. WT1 400X.

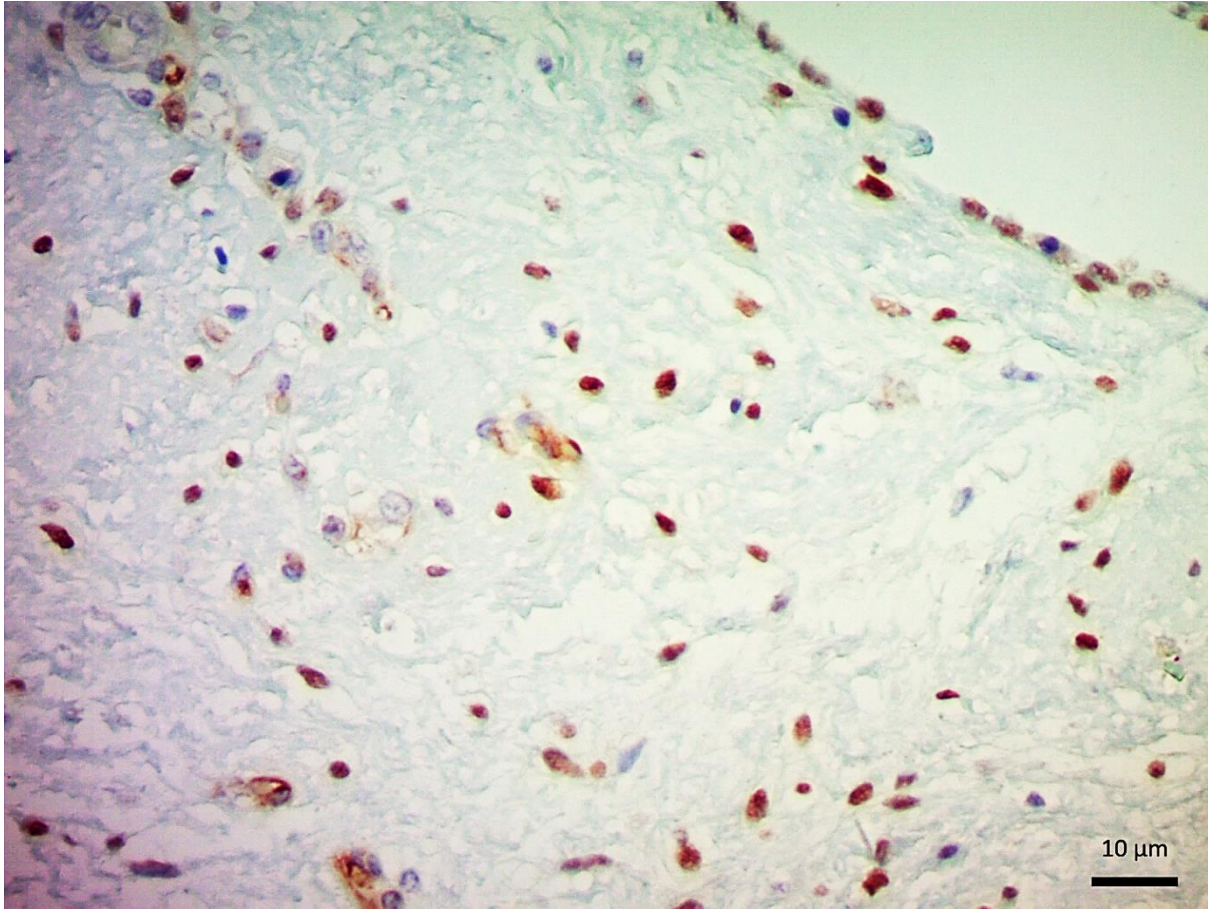


Figura 21. Pulmón de bovino. Pleuritis severa. Con mayor aumento, se observa que hay una inmunorreactividad tanto en células del mesotelio como en este conglomerado celular submesoteliales. WT1 400X.

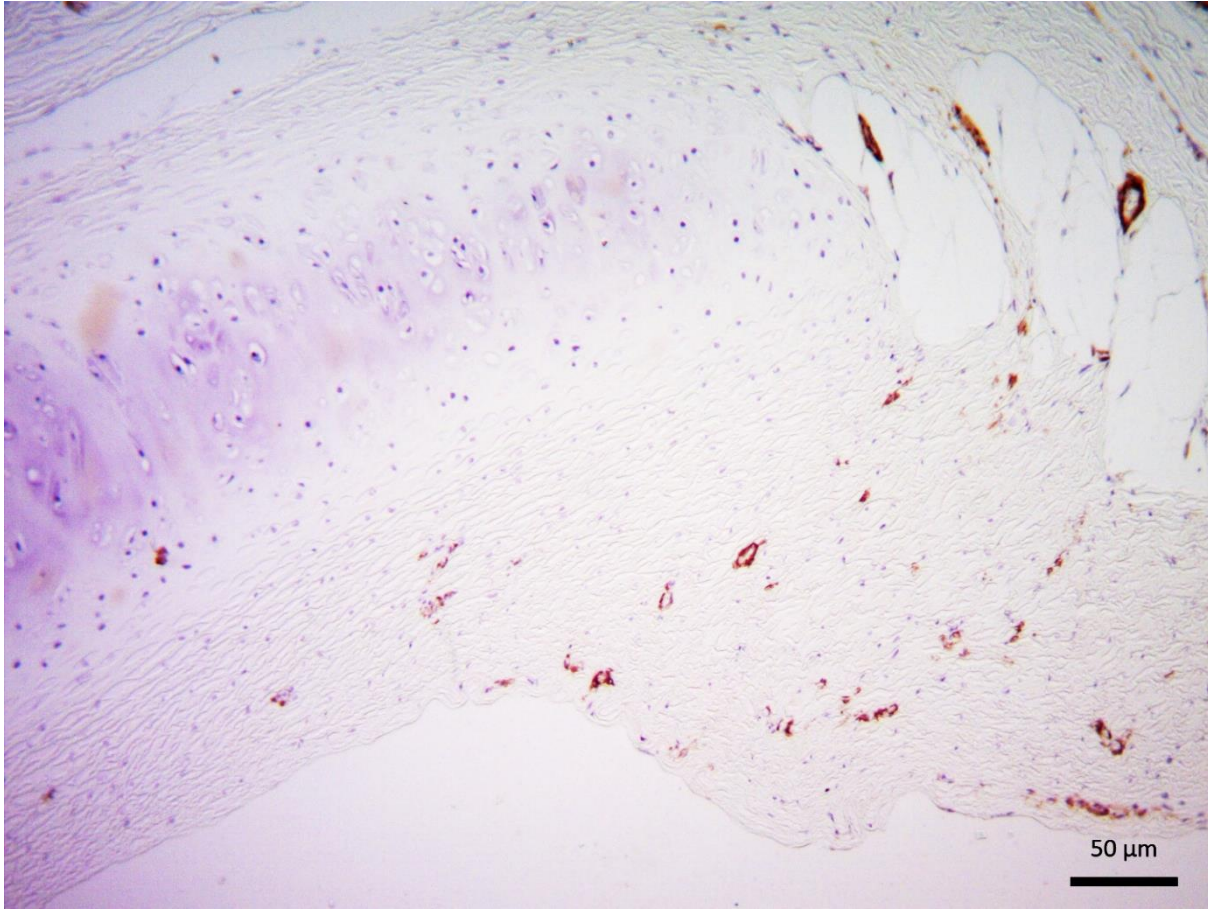


Figura 22. Pulmón de bovino. Fibrosis Pleural severa con metaplasia condroide. No hay evidencia de inmunorreactividad células de mesotelio, sin embargo si la hay en vasos sanguíneos y en vasos sanguíneos de nueva formación. Tampoco se ven células positivas en cartílago. α AML 100X

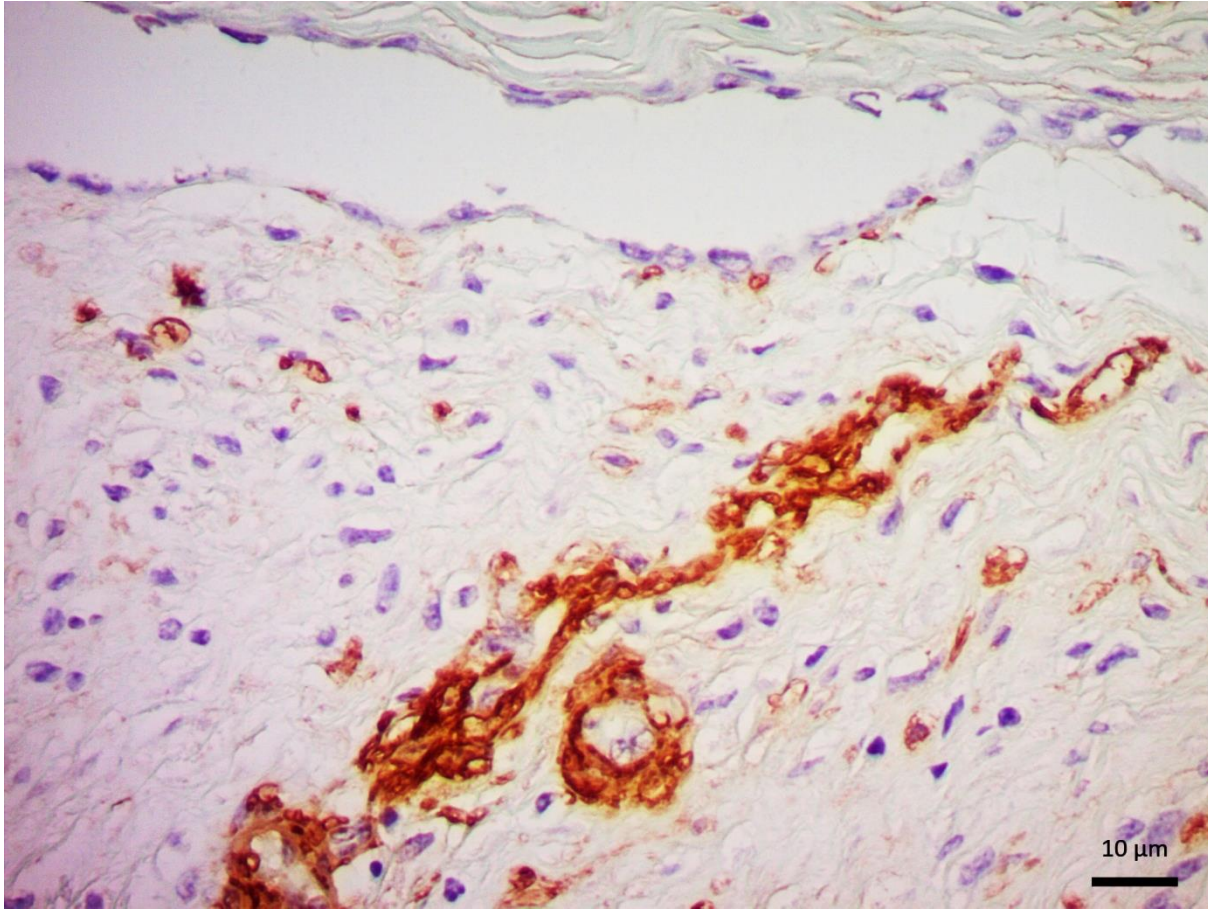


Figura 23. Pulmón de bovino. Fibrosis Pleural severa. Con mayor aumento se observa que no hay evidencia de inmunorreactividad células de mesotelio, sin embargo si la hay en vasos sanguíneos y en vasos sanguíneos de nueva formación, así como en miofibroblastos aislados. , α AML 400X

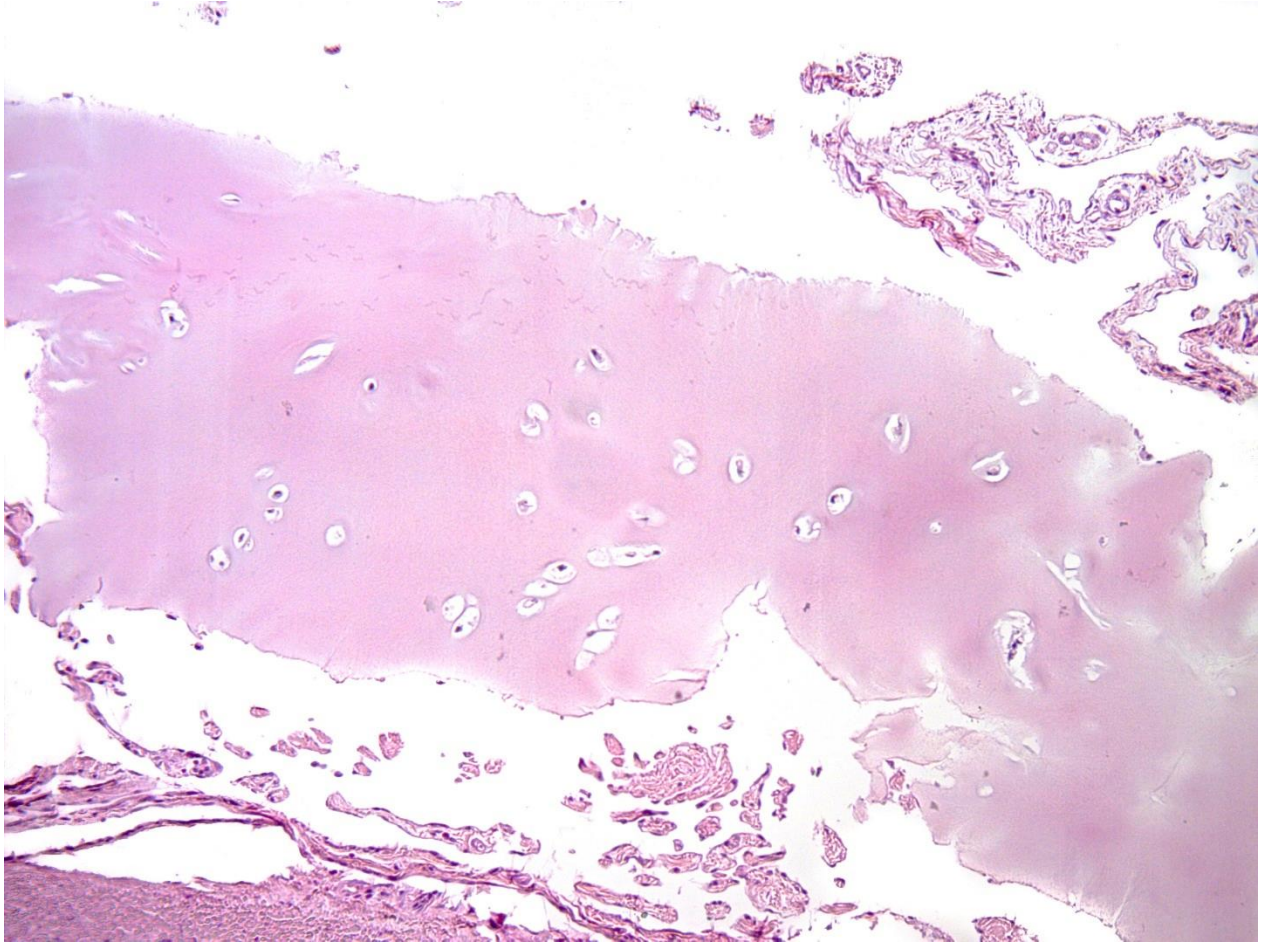


Figura 24. Pulmón de bovino. Fibrosis Pleural severa con metaplasia ósea. Se observan las proyecciones pleurales en la esquina superior derecha. H&E 100X.

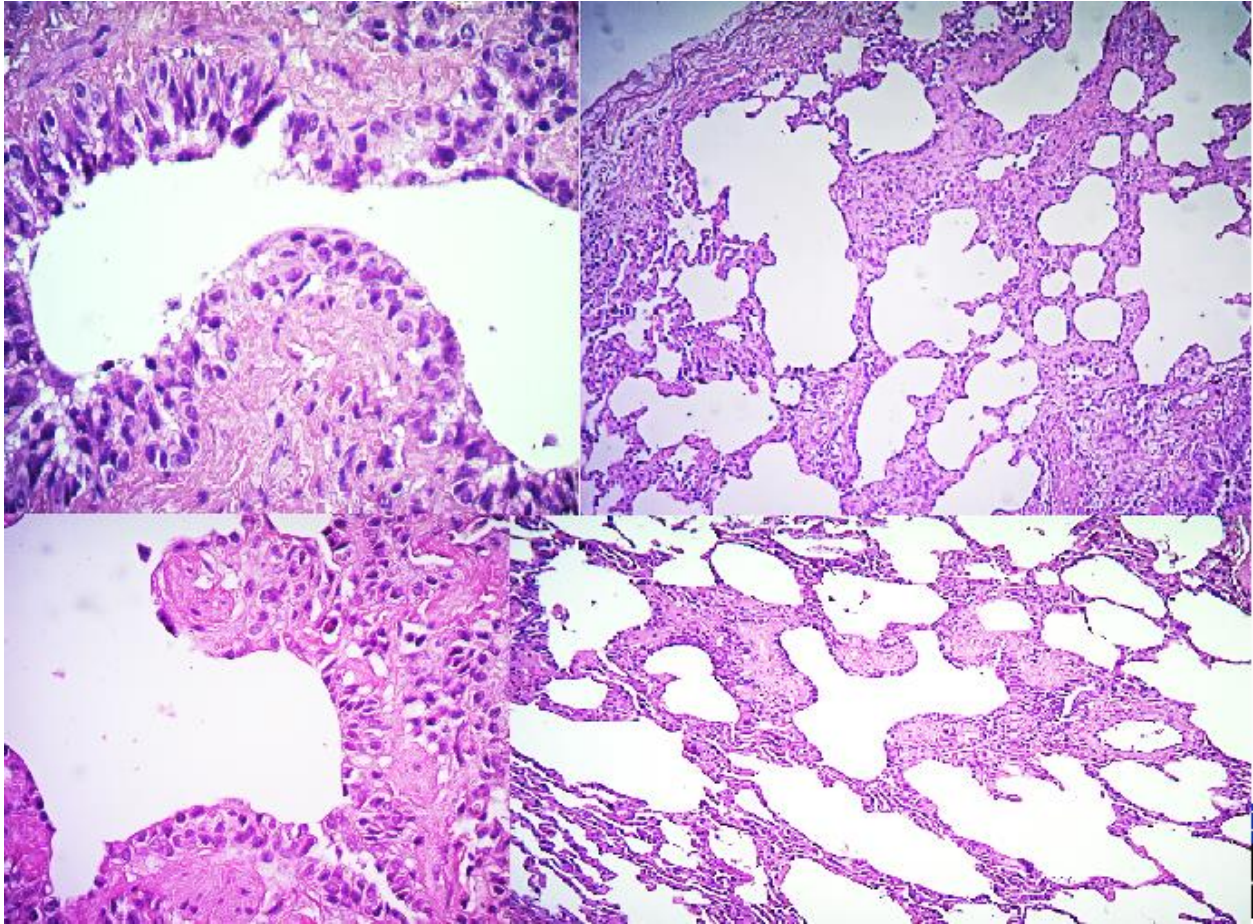


Figura 25. Pulmón de bovino. Esquina superior izquierda: metaplasia escamosa, H&E 400X. Esquina superior derecha: cambio de panal o honeycomb, H&E 100X. Esquina inferior izquierda: focos fibroblásticos, H&E 400X. Esquina inferior derecha: Patrón de mosaico junto con pulmón sano y atelectasia, focos fibroblásticos, H&E 100X.

VII. DISCUSIÓN.

En el presente estudio se consideró realizar morfometría de las glándulas en bronquios traqueales (índice Reid), ya que no hay antecedentes previos en bovinos, solo en el humano (Reid, 1960), y en cerdos (Gil, 2013) y zorros (Nevárez-Garza, 2008). Reid en 1960 observó que la amplitud de las glándulas bronquiales es mayor en los casos de bronquitis crónica; comparados con el grosor de las glándulas de personas sanas. En nuestro caso, nosotros realizamos el estudio con animales que también poseían lesiones crónicas tanto de tipo infeccioso (BNM) como no infeccioso (FP) y los controles y los resultados arrojados en bovinos, fue que sin importar si se trata de una lesión crónica infecciosa o no infecciosa, las glándulas fueron más amplias que en los individuos controles. La morfometría realizada en alveolos y septos alveolares es la primera en realizarse en bovinos. Los resultados en los septos alveolares del animal con FP y BNM, resultaron ser mayores que el valor aproximado que se tiene de referencia de 1-1.5 μ (Getty, 1982). Esto puede explicarse por el hecho de que los pulmones de los animales de engorda están bajo hipertensión (Krafsur et al., 2019). La cual obedece a un rápido crecimiento y la obesidad que al parecer es un patrón común en animales gordos enviados a rastro (Neary et al., 2015). Además, nuestras muestras fueron recolectadas y fijadas en formol al 10% por medio de inmersión, mientras que en los estudios originales estos valores corresponden a animales de laboratorio y pulmones fijados por perfusión.

Las lesiones encontradas en los pulmones decomisados que se utilizaron para este estudio, se clasificaron como fibrosis pleural con fibrosis intersticial subyacente, y que fueron las causas más frecuentes para decomiso, en comparación con la otra clasificación que fue bronconeumonía, por lo que se demostró que las lesiones asociadas al CRB no fueron las más numerosas. Es probable que la idea principal de secuelas del CRB como causa de decomiso haya perdurado porque no se han realizado estudios de patología veterinaria, y no se había prestado atención a que los pulmones decomisados podrían tener lesiones derivadas de patogenias diferentes a CRB. Por ejemplo, Gonzalez-Vazquez en el 2008, realizó un estudio lesiones histopatológicas de casos crónicos de BNM, pero su universo de estudio estuvo enfocado en BNM crónicas o agudas y las BNM agudas las desechó de su estudio.

En 2012, Ramírez-Romero y sus cols. proponen a los bovinos como modelo animal ya que las lesiones microscópicas y con el uso de la histoquímica HQ como herramienta de diagnóstico, el CRB tiene relación con EPOC y BOOP. Sin embargo, aquí también los animales de estudio fueron brotes (en varias partes del país) de animales de corral de engorda que padecían neumonías subagudas y crónicas relacionadas con CRB. Fue hasta el 2015 y 2016 que se trabajaron con muestras obtenidas mediante decomiso en rastro (Lara-Alcocer, 2016; Ramírez-Hernández, 2015). Ramírez-Hernández (2015) al clasificar las lesiones que ameritaban decomiso en el rastro, comprobó que las lesiones clasificadas como no infecciosas del tipo de FP fueron las que más decomisos causaron, sin embargo no se hizo el estudio de la posible causa de estas lesiones. Lara-Alcocer (2016) tomó en cuenta la relación de rumenitis con neumonías y también encontró procesos de tipo no infecciosos con lesiones de FP como causa principal de decomisos, sin embargo este estudio no logró dar relación estadística entre las rumenitis y las FP, por lo que tampoco encontró la posible razón de estas lesiones. En el presente estudio observamos que la FP, la cual está asociada a fibrosis intersticial fue la mayor causa de decomisos. Estas lesiones estuvieron ligadas a un hallazgo microscópico relevante que observamos y fue metaplasia (adiposa, condroide u ósea). Sobre la metaplasia que se encontró en los pulmones con FP y fibrosis intersticial debe señalarse que se abre un interesante y amplio campo de investigación que incluye la transdiferenciación de células mesoteliales (MET). Nuestros resultados de inmunohistoquímica fueron inmunorreactividad a WT1 en células de mesotelio y en menor cantidad en células submesoteliales, mientras que la inmunorreactividad a α -SMA fue nula en mesotelio pero muy evidente en vasos sanguíneos pequeños y de nueva formación y conglomerados fibroblastoides submesoteliales. Este hallazgo puede definirse como una transformación mesotelial a mesénquima (MMT), ya que para que lleve a cabo esta transformación es necesaria la participación de WT1 y ésta se encuentra evidente en las células mesoteliales de nuestro estudio (Karki et al, 2014; Koopmans & Rikenvich, 2018). Una explicación más completa es que mientras WT1 se encuentre evidente, no comienza la transformación a fibroblastos o miofibroblastos sino hasta que disminuye su expresión es cuando se favorece a esta transformación de las células del mesotelio y su migración al intersticio ya como fibroblastos o células de músculo liso (Koopmans & Rinkervich, 2018), es por eso que α -SMA no va a ser inmunorreactiva en células de mesotelio mientras WT1 esté expresada.

En humanos, la metaplasia adiposa y ósea no son raras en los casos de UIP, incluso el valor que ocupan es bastante alto, para la metaplasia adiposa es de 83% mientras que para la ósea es de 21% (Travis, 2000). Mukhopadhyay (2016) En humanos la metaplasia condroide también es común pero en peritoneo de personas sometidas a procedimientos quirúrgicos o diálisis peritoneal (Mutsaers, 2015). La metaplasia adiposa, condroide u ósea todavía no se ha documentado en bovino hasta ahora, estos hallazgos se encuentran en personas que padecen fibrosis pulmonar idiopática/ neumonía intersticial habitual, a (IPF/UIP), sin embargo estas no son las características más evidentes para llegar al diagnóstico de UIP, también existen características histopatológicas contundentes para diagnosticar UIP, como la existencia del patrón de mosaico adyacente a pulmón sano, focos fibroblásticos y el cambio de panal (honeycomb) (Mukhopadhyay, 2016). Todas estas características histopatológicas se encontraron en algunos pulmones de este estudio (figura 25), por lo que se ha propuesto, que los bovinos sean considerados como modelo experimental para el estudio de UIP en el hombre así como ya se ha propuesto EPOC y BOOP (Ramírez-Romero R. et al, 2012).

VIII. CONCLUSIÓN

1. Las lesiones pulmonares crónicas en animales aparentemente sanos y aptos para consumo humano, presentan lesiones en el intersticio, en la pleura y en los vasos sanguíneos.
2. Estas lesiones mencionadas en el punto No. 1, son compatibles con cuadros patológicos iniciales de enfermedades respiratorias crónicas en humanos: BNM supurativa crónica en bovinos y COPD en humanos; BNM fibrinosa crónica en bovinos y NO (Neumonía Organizada o BOOP) en humanos y Fibrosis pleural e intersticial subyacente en bovinos y UIP en humanos.
3. En UIP hay evidencia de que la metaplasia mesenquimal se origina de la transición epitelial a mesenquimal de las células del mesotelio pleural.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

1. Andrew Churg, A. W. (April de 2018). Cicatricial organising pneumonia mimicking a fibrosing interstitial pneumonia. *Histopathology*, 72(5), 846-854. DOI:10.1111/his.13443
2. Arcangioli, M. D. (2008). The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. . *The Veterinary Journal*. 177(1), 89-93.
3. Batra, H. &. (1 de August de 2014). The pleural mesothelium in development and disease. *Frontiers in Physiology*, 5(284), 1-6. doi:10.3389/fphys.2014.00284
4. Buczinski, S. F. (August de 2018). Validation of a clinical scoring system for bovine respiratory disease complex diagnosis in preweaned dairy calves using a Bayesian framework. *Preventive Veterinary Medicine*, 156, 102-112. doi:10.1016/j.prevetmed.2018.05.004
5. Buczinski, S. O. (May de 2015). Bayesian estimation of the accuracy of the calf respiratory scoring chart and ultrasonography for the diagnosis of bovine respiratory disease in pre-weaned dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 119(3-4), 227-231V. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.02.018
6. Churg, A. W. (April de 2018). Cicatricial organising pneumonia mimicking a fibrosing interstitial pneumonia. *Histopathology*, 72(5), 846-854. doi:10.1111/his.13443
7. Day, M. J. (2010) One Health: the small animal dimension. *Veterinary Record*, 167: 847-849. doi: 10.1136/vr.c6492
8. da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C., & Oliver, C. (2014). Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(10), 698-738. <https://doi.org/10.1369/0022155414545334>
9. Driehuis, F. W. (2018). Silage review: Animal and human health risks from silage. *Journal of Dairy Science* , 101(5), 4093-4110. doi:10.3168/jds.2017-13836
10. García-Araque, H.F., & Gutiérrez-Vidal, S.E. (2015). Aspectos básicos del manejo de la vía aérea: anatomía y fisiología. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 38 (2), 98-107.

11. Getty, R. (1982). Anatomía de los Animales Domésticos Tomo I. Sistema respiratorio. México. Salvat Editores.
12. Gil, V., Ramírez, T., Paz, Y., Quesada-Canales, O., Suárez-Bonnet, A., Herráez, P., & Andrada, M. (2013). Measurement of the Reid Index in Normal Pig Lungs. *Journal of Comparative Pathology*, 148(1), 102. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.11.227>
13. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of COPD. GOLD 2018
14. Gonzalez-Vazquez, M. A. (2008). *CARACTERIZACIÓN DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN CASOS CRÓNICOS DE NEUMONÍA EN EL GANADO EN CORRAL DE ENGORDA*. Monterrey, Nuevo León, México.
15. Grizzle, W. E. (2010). Models of Fixation and Tissue Processing. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*. 84(5): 185–193. doi: 10.3109/10520290903039052
16. Gross, T. J. (16 de August de 2001). Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The New england Journal of Medicine*, 345(7), 517-525. doi:10.1056/NEJMra003200
17. Hare, W. (1982). Sistema Respiratorio de los Rumiantes. En R. Getty, *Sisson y Grossman Anatomía de los Animales Domésticos* (Vol. 1, págs. 1017-1030). Barcelona, España: Elsevier Masson.
18. Harlow, E. & Lane, D. (1999). Using Antibodies a Laboratory Manual. United States: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
19. Heffess, C. S. & Mullick, F. G. (1992). Métodos Histotecnológicos. Estados Unidos: Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América.
20. Kalina, W. & Gershwin, L. J. (July de 2004). Progress in Defining the Role of RSV in Allergy and Asthma: From Clinical Observations to Animal Models. *Clinical & Developmental Immunology*, 11(2), 113-119. doi:10.1080/10446670410001722131
21. Karki, S., Surolia, R., Hock, T. D., Guroji, P., Zolak, J. S., Duggal, R., Ye, T., Thannickal, V. J., Antony, V. B. (2014). Wilms' tumor 1 (Wt1) regulates pleural mesothelial cell plasticity and transition into myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB*

journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 28(3), 1122–1131. doi:10.1096/fj.13-236828

22. Koopmans, T., & Rinkevich, Y. (2018). Mesothelial to mesenchyme transition as a major developmental and pathological player in trunk organs and their cavities. *Communications biology*, 1, 170. doi:10.1038/s42003-018-0180-x
23. Krafur, G. M., Neary, J. M., Garry, F., Holt, T., Gould, D. H., Mason, G. L., ... Stenmark, K. R. (2019). Cardiopulmonary remodeling in fattened beef cattle: a naturally occurring large animal model of obesity-associated pulmonary hypertension with left heart disease. *Pulmonary Circulation*, 9(1). doi.org/10.1177/2045894018796804
24. Lai-Fook S.J. (2004). Pleural mechanics and fluid exchange. *Physiological Reviews*: 84 (2), 385-410.
25. Lanzas, C., Ayscue, P., Ivanek, R. & Gröhn, Y. T. (2009). Model or meal? Farm animal populations as models for infectious diseases of humans. *Nature Reviews Microbiology*, 8(139), 139–148. doi:10.1038/nrmicro2268
26. Lara-Alcocer, A. S. (2016). *RELACIÓN ENTRE RUMENITIS Y NEUMONÍAS EN BOVINOS EN CORRAL DE ENGORDA* . General Escobedo, Nuevo León, México.
27. Lingjun, Z. J. (4 de May de 2017). Animal Models for Tuberculosis in Translational and Precision Medicine. *Frontiers in Microbiology*, 8, 717. doi:10.3389/fmicb.2017.00717
28. MacNee, W. (2006). ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Pathology, pathogenesis, and pathophysiology. *BMJ (Clinical research ed.)*, 332(7551), 1202-1204.
29. Martínez-Burnes, J., López-Mayagoitia, A., Ramírez-Romero, R. & García-Márquez, L. J. (2018). Mecanismos de defensa del sistema respiratorio y factores predisponentes para el desarrollo de neumonías en bovinos de engorda. En *TEMAS DISCIPLINARES EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA* (págs. 55-76). Ciudad Victoria, México: Universidad Autónoma de Tamaulipas.
30. Mukhopadhyay, S. (2016). Introduction of lung pathology. En S. Mukhopadhyay, *Non-Neoplastic Pulmonary Pathology* (págs. 1-13). Cambridge, UK: Cambridge University.

31. Mutsaers, S. B. (2015). Mesothelial cells in tissue repair and fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 6(113), 1-2. doi:10.3389/fphar.2015.00113
32. Nakatsuka, S. O., Oji, Y., Horiuchi, T., Kanda, T., Kitagawa, M., Takeuchi, T., Kawano, K., Kuwae, Y., Yamauchi, A., Okumura, M., Kitamura, Y., Oka, Y., Kawase, I., Sugiyama, H., & Aozasa, K. (17 de March de 2006). Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Modern Pathology*, 19, 804-814. doi:10.1038/modpathol.3800588
33. Neary, J. M., Booker, C.W., Wildman, B. K. & Morley, P.S. (2016). Right Heart Failure in Feedlot Cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine* , 30(1), 326-334. doi:10.1111/jvim.13789
34. Neary, J. M., Garry, F. B., Holt, T. N., Thomas, M. G., & Enns, R. M. (2015). Mean pulmonary arterial pressures in Angus steers increase from cow–calf to feedlot–finishing phases, *Journal of Animal Science* 93, (8) 3854–3861, DOI: 10.2527/jas.2015-9048.
35. Nevárez-Garza, A. M. (october de 2008). Hyperplastic and Metaplastic Changes in the Bronchi and Bronchioles of Red Foxes (*Vulpes vulpes*) Naturally Infected with *Crenosoma vulpis* and *Eucoleus aerophilus*. *Journal of Animal and Veterinary Advances* , 7(10), 152-156.
36. Petty T. L. (2006). The history of COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 1(1), 3-14.
37. Pirie, H. M., & Selman, I. E. (1972). Animal Models of Human Diseases: A Bovine Pulmonary Disease Resembling Human Diffuse Fibrosing Alveolitis. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 65(11), 987–990. <https://doi.org/10.1177/003591577206501137>
38. Popper, H. H. (February de 2002). Bronchiolitis obliterans. Organizing pneumonia. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 86, 101-106.
39. Prohl, A., Ostermann, C., Lohr, M., & Reinhold, P. (2014). The bovine lung in biomedical research: visually guided bronchoscopy, intrabronchial inoculation and in vivo sampling techniques. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (89), 51557. DOI:10.3791/51557

40. Rabeyrin, M. T. (2015). Usual interstitial pneumonia end-stage features from explants with radiologic and pathological correlations. *Annals of Diagnostic Pathology*, 19(4), 269-276. doi:org/10.1016/j.anndiagpath.2015.05.003
41. Ramírez-Hernández, C. (2002). *Cuantificación de células cebadas durante el inicio y progresión de la reacción local de Shwartzman* (tesis de licenciatura). Monterrey, Nuevo León, México.
42. Ramírez-Hernández, C. (2015). *Lesiones macroscópicas y microscópicas en pulmones de bovinos engordados en corral que ameritan decomiso en rastro* (tesis de maestría). General Escobedo, Nuevo León, México.
43. Ramírez-Romero, R. & Ramírez-Hernández, C. (2014). Primer Simposio Bienestar Animal y Enfermedades Respiratorias de los Bovinos de Corral de Engorda. *Patología del Complejo (Síndrome) Respiratorio Bovino*. Monterrey: Bayer. Junio 3-4.
44. Ramírez-Romero, R., Nevárez-Garza, A. M., Rodríguez-Tovar, L. E., Wong-González, A., Ledezma-Torres, R. A., y Hernández-Vidal, G. (2012). Histopathological Analogies in Chronic Pulmonary Lesions between Cattle and Humans: Basis for an Alternative Animal Model, *The Scientific World Journal*, vol. 2012, Article ID 647403, 7 pages. DOI: 10.1100/2012/647403.
45. Reid, L. (1960). *Measurement of the bronchial mucous gland layer: a diagnostic yardstick in chronic bronchitis*. *Thorax*, 15, 10.
46. Rhodes, J. (2005). Comparative physiology of hypoxic pulmonary hypertension: historical clues from brisket disease. *Journal of Applied Physiology*, 98 (3), 1092-1100. DOI: 10.1152/jappphysiol.01017.2004.
47. Rickards, K. J., Page, C. P., Lees, P., & Cunningham F. M. (2000). Phosphodiesterase activity in neutrophils from horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 76 (3-4), 319-330. DOI:10.1016/S0165-2427(00)00220-8.
48. Ryu, J. H. (September de 2003). Bronchiolar Disorders. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168(11), 1277-1292. doi:10.1164/rccm.200301-053SO

49. Samuelson, D. (2007). *Textbook of Veterinary Histology*. St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
50. Schneider, M. J., Tait, R. G., Ruble, M. V., Busby, W. D., & Reecy, J. M. (2010). Evaluation of fixed sources of variation and estimation of genetic parameters for incidence of bovine respiratory disease in preweaned calves and feedlot cattle. *J Anim Sci*, 88(4), 1220-1228. doi: 10.2527/jas.2008-1755
51. Scholz, H. & Kirschner, K. M. (2005). A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology*, 20(1), 54-59. doi: 10.1152/physiol.00048.2004
52. Schultz, C. (2016) Comparing silo filler disease with farmer's lung disease. *Gen Int Med Clin Innov* 1(5), 76-78. DOI: 10.15761/GIMCI.1000123
53. Sevin, C. M., & Light, R. W. (2011). Microscopic Anatomy of the Pleura. *Thoracic Surgery Clinics*, 21 (2), 173-5. DOI: 10.1016/j.thorsurg.2010.12.003.
54. Søyseth, V. A. (2015). Diagnosis of biopsy verified usual interstitial pneumonia by computed tomography. *Respiratory Medicine*, 109(7), 897-903. doi:10.1016/j.rmed.2015.05.008
55. Sundberg, J. P. and Schofield, P. N. (2009). One medicine, one pathology, and the one health concept. *J Am Vet Med Assoc*. 2009 June 15; 234(12):. doi:10.2460/javma.234.12.1530.
56. Taylor, J. D. (october de 2010). The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *The Canadian Veterinary Journal*, 51(10), 1095-1102
57. Travis, W. M. (2000). Idiopathic Nonspecific Interstitial Pneumonia: Prognostic Significance of Cellular and Fibrosing Patterns: Survival Comparison With Usual Interstitial Pneumonia and Desquamative Interstitial Pneumonia. *The American Journal of Surgical Pathology*, 24(1), 19-33. doi:10632484
58. Yalcin, N. G., Choong, C. K. C., & Eizenberg, N. (2013). Anatomy and Pathophysiology of the Pleura and Pleural Space. *Thoracic Surgery Clinics*, 23 (1), 1-10. DOI: 10.1016/j.thorsurg.2012.10.008

59. Yousem, S. A. (2017). Cicatricial variant of cryptogenic organizing pneumonia. *Human Pathology*, 64, 76-82. doi:10.1016/j.humpath.2017.03.018

ANEXO I

Trabajo publicado “on line first” en Veterinary Pathology: Primer publicación 27 de marzo del 2019.

Fat, cartilage and bone metaplasia in lungs of cattle with caudal pleural lesions and subjacent interstitial fibrosis

C. Ramírez-Hernández¹, L.J. García-Márquez², H. Decanini-Arcaute³, J. Martínez-Burnes⁴, R. Ramírez-Romero^{1*}

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Posgrado Conjunto Agronomía-Veterinaria, Campus Ciencias Agropecuarias. Av. Francisco Villa s/n, Ex-Hacienda el Canadá, 66050, Gral. Escobedo, N.L. México.

²Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario (CUIDA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Colima, México.

³Departamento de Patología, Hospital Christus-Muguerza Alta Especialidad, 64060, Monterrey, N.L., México.

⁴Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia "Dr. Norberto Treviño Zapata", Universidad Autónoma de Tamaulipas, México

*Correspondence: Rafael Ramírez-Romero, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Campus Ciencias Agropecuarias, Av. Francisco Villa s/n. 66050, Gral. Escobedo, Nuevo León, México

Email: raramirez@prodigy.net.mx

Tel. +52 (81)1340 4390, ext. 3612

Abstract

The changes associated with condemned lungs in cattle with chronic pleural lesions of the caudal lobes were characterized by histology and immunohistochemistry (IHC). Fibroproliferative pleural lesions were microscopically confirmed. Occasionally, the pleural lesions also included adipose, chondroid and osseous metaplasia which were covered by mesothelial cells, mostly in

the absence of inflammation. Other lungs also showed fibrosis in the subpleural interstitium and interlobular septa. In both condemned and non-condemned lungs, immunoreactivity to Wilms tumor 1 (WT1) was normally observed on surface mesothelial cells but not on the submesothelial fibroblasts and myofibroblasts. Conversely, the myofibroblasts beneath the pleura, but not the mesothelial cells, showed immunoreactivity to alpha smooth muscle actin and calponin. However, in the lungs with myofibroblastic foci in the pleura, the proliferated cells maintained WT1 immunoreactivity similar to those of some metaplastic cells. These findings may reflect the plasticity of mesothelial cells *in vivo*.

Keywords: bovine, meat inspection, slaughterhouse, pleural lesions, immunohistochemistry, mesothelium, myofibroblasts, pleural metaplasia,

Bovine respiratory disease complex (BRDC) is the leading cause of morbidity and mortality in feedlot cattle.⁷ The typical pattern of BRDC-related pneumonia is fibrinosuppurative bronchopneumonia.¹⁶ There is a trend for cases of bronchopneumonia in feedlot cattle to have longer courses, and chronic lesions are more frequently observed than 30 years ago.⁷ Therefore, chronic bronchopneumonia and its sequelae could be responsible for many lung condemnations in abattoirs. Nonetheless, in two consecutive surveys in abattoirs in Monterrey, Mexico (2014-2016), pleural lesions not related with BRDC were the main cause of lung condemnation. Herein, we characterized the pleural and parenchymal changes.

This study was performed in 2016 in a government-certified abattoir (TIF 356, SAGARPA-SENASICA) in Monterrey, Mexico. This abattoir specializes in cattle fattened in pens. All procedures adhered to the official norms (Official Mexican Norm NOM-009-ZOO-1994, Sanitary Processes of Meat and NOM-033-ZOO-1995 Humane Slaughter of Wild and Domestic Animals).

Previously, an official veterinarian had confirmed that the animals were in good health based on antemortem inspection. The veterinary inspector was unaware of the study and had full decision-making power in condemning or approving the reviewed lungs. The condemned lungs were used as our study material. A representative survey of 389 bovines, including 57 condemned lungs was statistically convenient (Epitools¹⁷). The lungs were carefully examined, palpated, recorded and photographed. Based on the gross appearance, the lesions were divided into two main groups: chronic bronchopneumonia and chronic pleural lesions. Other causes of condemnation were excluded. Ten non-condemned lungs from fattened cattle were included as controls.

From all cases and controls, representative samples were obtained from the right lung, including four samples from the caudal lobe (two from the dorsal surface and two from the ventral edge), one from the middle lobe, and two each from the cranial and caudal parts of the cranial lobe. In addition to the systematic sampling procedure, samples were collected from small, hard and depressed circular areas with a range between 3 to 15 mm diameters, recognized in several lungs. All samples were collected at a depth that included the subjacent parenchyma. In a subsequent sampling in lungs condemned with pleural lesions (8/100=0.08), central samples in caudal and cranial lobes were also included. These samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, processed routinely, sectioned (4 μ m) and stained with hematoxylin and eosin (HE) and Masson's trichrome. Additional sections were labeled by immunohistochemistry (IHC) employing the two-step system EnVision™ FLEX on an automated platform (Autostainer Link 48) as according to the manufacturer's instructions (Agilent Technologies Dako, Comercial Biomédico JR, México). The primary antibodies included mouse anti-human Wilms' tumor protein (WT1, clone 6F-H2 prediluted, DAKO) which reacts with the amino-terminal amino acids of all the complete isoforms of WT1 and was intended as a marker of mesothelial cells; mouse anti-human alpha smooth muscle actin (α -SMA; clone 1A4 prediluted, DAKO) which is specific to amino-terminal amino acids of human alpha smooth muscle actin with a cross reaction in cattle, and was used as a marker of myofibroblasts and smooth muscle cells; and mouse anti-human calponin (CALP; clone CALP 1:100 dilution, Bio Care Medical, Pacheco CA. USA) which reacts with the isoform 34kD and was intended as a marker of smooth muscle cells, myoepithelium and myofibroblasts. The IHC procedure included a streptavidin-biotin complex with diaminobenzidine as the substrate (Dako, Mexico; Comercial Biomedico Ramirez, S.A, de C.V.), followed by slight counterstaining by hematoxylin. The negative controls were lymphoid tissue in all three assays, and the positive controls were fallopian tube, colon and mammary gland tissue. Selected lung samples were fixed in 2.5% buffered glutaraldehyde and subsequently in osmium tetroxide, embedded in Epon and sectioned on an ultramicrotome to obtain semithin (\approx 0.8 μ m) sections. These sections were stained with toluidine blue and routinely mounted with a coverslip for observation under a light microscope.

Of 389 cattle inspected during the period of the study, there were 57 condemned lungs (57/389, 14.6%; 95% confidence interval [CI]: 11.5-18.5%). Among the condemned lungs, the prevalence of typical bronchopneumonia (7/57, 12.3%; 95% CI: 6.1-23.2) was lower than the prevalence of pleural lesions (50/57, 87.7%; 95% CI: 76.7-93.9). Most lungs with pleural lesions lacked cranioventral consolidation of lung tissue, with a few (8/50) exhibiting minimal consolidation. Chi-square (uncorrected) analysis showed highly significant differences ($P < 0.0001$) between the groups,¹⁷ indicating that grossly, the chronic caudal pleural lesions and chronic bronchopneumonia were found as separate lesions. Subsequently, the study exclusively focused on the lungs that were condemned because of pleural lesions.

Lungs condemned for pleuritis were partially collapsed and showed combinations of 3 distinctive lesions: locally extensive villous excrescences formed by proliferation of pleural connective tissue, depressed foci of pleural metaplasia, and extensive fibrosis of the pleura and subjacent interlobular septa. The gross, histologic and IHC findings in each of these are described as follows. First, all 50 of the lungs condemned for pleuritis had soft hyperemic veils of pleural villous excrescences at the edges of the caudal lobes, or more thickened plaques that were irregularly attached to the dorsal surface but not over the cranial lobes (Figs. 1 and 2). The caudal pleural lesions were not identified in lungs condemned for bronchopneumonia or other reasons. These caudal pleural lesions were only located on the visceral pleura and not on the parietal pleura. Microscopically, these villous excrescences corresponded to extensive deposits of collagen accompanied by newly formed blood vessels and infiltrating lymphocytes and plasma cells, and were covered by mesothelial cells (Fig. 1, inset). Whereas the controls had WT1 immunoreactivity only in mesothelial cells (Fig. 3), WT1 immunoreactivity in the villous lesions of condemned lungs was present in surface mesothelial cells and in cells within the proliferative tissue (Fig. 4). α -SMA immunoreactivity in control lungs was present in small blood vessels and rare subpleural myofibroblasts but not in surface mesothelial cells, whereas α -SMA immunoreactivity was present in numerous cells within in the villous lesions of condemned lungs (Fig. 5). Similar but less intense calponin immunoreactivity was present.

Second, several lungs had hard and brittle circular depressions on the pleura (Fig. 2). The depressions were present in 31 of the 50 lungs condemned for pleuritis (62%; 95% CI: 48.1-74.1). Microscopically, these corresponded to zones of pleural metaplasia that were subjacent to the above-described proliferative lesions. They always contained adipose tissue (100%) (Fig. 6), and some (14/31, 45.1%; 95% CI: 29.1-62.2) also contained hyaline cartilage (Fig. 7) and bone tissue (2/31, 6.4%; 95% CI: 1.7-20.7) (Fig. 8), but there were minimal inflammatory changes. In these lesions, immunoreactivity to WT1 occurred in the surface mesothelium and occasionally in the metaplastic tissue (Figs. 6 and 7 insets).

Third, extensive fibrosis of the pleura and subjacent interlobular septa was observed microscopically in 9 of the 50 lungs condemned for pleuritis (18%; 95% CI: 9.7-30.8). These pleural lesions were focally extensive and extensively distorted the lung tissue (Figs. 6 and Supplemental Figure S1). These lesions did not involve the alveoli or alveolar septa of the lung parenchyma, but the epithelium of bronchioles frequently showed squamous metaplasia (Fig. S2). The subsequent sampling in lungs condemned because of pleuritis confirmed that the deeper lung parenchyma was not affected. Moreover, numerous degranulated mast cells were present (Figs. S3 and S4). Within the lesions of pleural and interlobular fibrosis, calponin immunolabeling was present in proliferated and hypertrophied myoblastic cells in the tunica intima of small veins, and highlighted the arterial and venous smooth muscle hypertrophy (Figs. S5-S8).

In this study, pleural lesions were the main cause of lung condemnation. All affected lungs were from apparently healthy animals approved for slaughter. The findings of pleural metaplasia and subjacent chronic interstitial fibrosis were unexpected. Identical pleural lesions have been observed in routinely slaughtered beef cattle,⁴ but pleural metaplasia was not reported.

Mesothelial cells have the potential to differentiate into myofibroblasts.^{1,10,13,15} The *in vitro* plasticity of mesothelial cells is broad and includes specialized cell lineages, such as adipocytes, chondrocytes and osteoblasts.^{1,11,13,15} The clonal proliferation of the mesothelial-derived myofibroblasts is influenced in a restrictive manner by WT1.^{9,10,15,18} WT1 maintains the epithelial phenotype in the pleura, and its downregulation favors myofibroblastic transdifferentiation. Transdifferentiation is a prerequisite for mesothelial cells to traffick into the subjacent lung parenchyma.^{9,10,15,18} The WT1 immunoreactivity on the mesothelial surface and the positive reaction in subpleural myofibroblastic foci identified here are similar to that described in human idiopathic pulmonary fibrosis (IPF).^{9,18} Furthermore, the WT1 immunoreactivity in the periphery of metaplastic tissues is compatible with their mesothelial origin, suggesting the potential of mesothelial cells to differentiate in adipose and cartilage tissues *in vivo*. Previous studies have also shown peritoneal cartilaginous metaplasia in human patients after surgical procedures in the abdomen.⁵

Endothelial cells can also undergo myofibroblastic transdifferentiation, as occurs in lung fibrosis and pulmonary hypertension.^{6,8} In fact, pulmonary hypertension and muscularization of small arteries and veins commonly occur in hypertensive lung disease, and has been reproduced in animal models of lung fibrosis.⁸

Alternatively, a recent morphometric analysis identified that myofibroblastic foci in fibrotic lung disease forms a reticulum complex that extends from the pleura to the subjacent parenchyma.³ Therefore, episodes of insidious damage related to peripheral (subpleural) tractional forces could explain the caudal pattern of the lung lesions in this study, similar to changes in basal lobes in some fibrotic lung diseases in humans, and might reflect the naturally thick pleura in cattle and humans.^{12,14}

In our study, inflammatory cells were uncommon, except for degranulating mast cells. Their significance in these lesions of cattle is not known, although mast cells contribute to abnormal remodeling in pulmonary fibrosis.²

This study describes proliferative, fibrotic and metaplastic lesions in the caudal pleura of cattle, which are a frequent cause of lung condemnation. We propose that the metaplastic tissues originated from transdifferentiated mesothelial cells.

Declaration of conflicting interests

The authors declare no conflicts of interest related to the research, authorship or publication of this article.

Acknowledgments

We express our sincere gratitude to the personnel of the Anatomía Patológica Department, Hospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León, for their great support in performing all of the techniques employed herein.

Funding

SEP, México; PRODEP, Research Network on Wildlife Diseases. Project: 2013; extension 2016-2017.

References

- 1 Batra H, Antony VB. Pleural mesothelial cells in pleural and lung diseases. *J Thorac Dis.* 2015;7(6):964-80. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.02.19.
- 2 Cha SI, Chang CS, Kim EK, et al. Lung mast cell density defines a subpopulation of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Histopathology.* 2012 Jul;61(1):98-106. doi: 10.1111/j.1365-2559.2012.04197.x.
- 3 Cool CD, Groshong SD, Rai PR, Henson PM, Stewart JS, Brown KK. Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: the fibroblast reticulum. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(6):654-658.
- 4 Doherty MI, Hannan J, Sheahan BJ, Kelly AP. Serositis at routine slaughter in Irish cattle. *Ir Vet J.* 1990;43:40-44.
- 5 Fadare O, Bifulco C, Carter D, Parkash V. Cartilaginous differentiation in peritoneal tissues: a report of two cases and a review of the literature. *Mod Pathol.* 2002;15 (7):777-780.
- 6 Farkas L, Gauldie J, Voelkel NF, Kolb M. Pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary fibrosis: a tale of angiogenesis, apoptosis, and growth factors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011 Jul;45(1):1-15. doi: 10.1165/rcmb.2010-0365TR.
- 7 Fulton RW, Blood KS, Panciera RJ, et al. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *J Vet Diagn Invest.* 2009; 21(4):464-477.
- 8 Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, et al. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 43(2): 161-172. doi: 10.1165/rcmb.2009-0031OC.
- 9 Karki S, Surolia R, Hock TD, et al. Wilms' tumor 1 (Wt1) regulates pleural mesothelial cell plasticity and transition into myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB J.* 2014;28(3):1122-1131. doi: 10.1096/fj.13-236828.
- 10 Koopmans T, Rinkevich Y. Mesothelial to mesenchyme transition as a major developmental and pathological player in trunk organs and their cavities. *Commun Biol.* 2018;1:170. doi: 10.1038/s42003-018-0180-x.

- 11 Lachaud CC, Rodriguez-Campins B, Hmadcha A, Soria B. Use of mesothelial cells and biological matrices for tissue engineering of simple epithelium surrogates. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3:117. doi: 10.3389/fbioe.2015.00117.
- 12 Lai-Fook SJ. Pleural mechanics and fluid exchange. *Physiol Rev.* 2004;84(2):385-410.
- 13 Lansley SM, Searles RG, Hoi A, et al. Mesothelial cell differentiation into osteoblast- and adipocyte-like cells. *J Cell Mol Med.* 2011; 15(10):2095-2105. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01212.x.
- 14 Leslie KO. Idiopathic pulmonary fibrosis may be a disease of recurrent, tractional injury to the periphery of the aging lung: a unifying hypothesis regarding etiology and pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136(6):591- 600. doi: 10.5858/arpa.2011-0511-OA.
- 15 Mutsaers SE, Birnie K, Lansley S, Herrick SE, Lim CB, Prêle CM. Mesothelial cells in tissue repair and fibrosis. *Front Pharmacol.* 2015;6:113. doi: 10.3389/fphar.2015.00113.
- 16 Panciera RJ, Confer AW. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Vet Clin N Am-Food A.* 2010;26(2):191-214
- 17 Sergeant, ESG, 2018. Epitools epidemiological calculators. Ausvet Pty Ltd. Available at:<http://epitools.ausvet.com.au>.
- 18 Zolak JS, Jagirdar R, Surolia R, et al. Pleural mesothelial cell differentiation and invasion in fibrogenic lung injury. *Am J Pathol.* 2013;182(4):1239-1247. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.12.030.

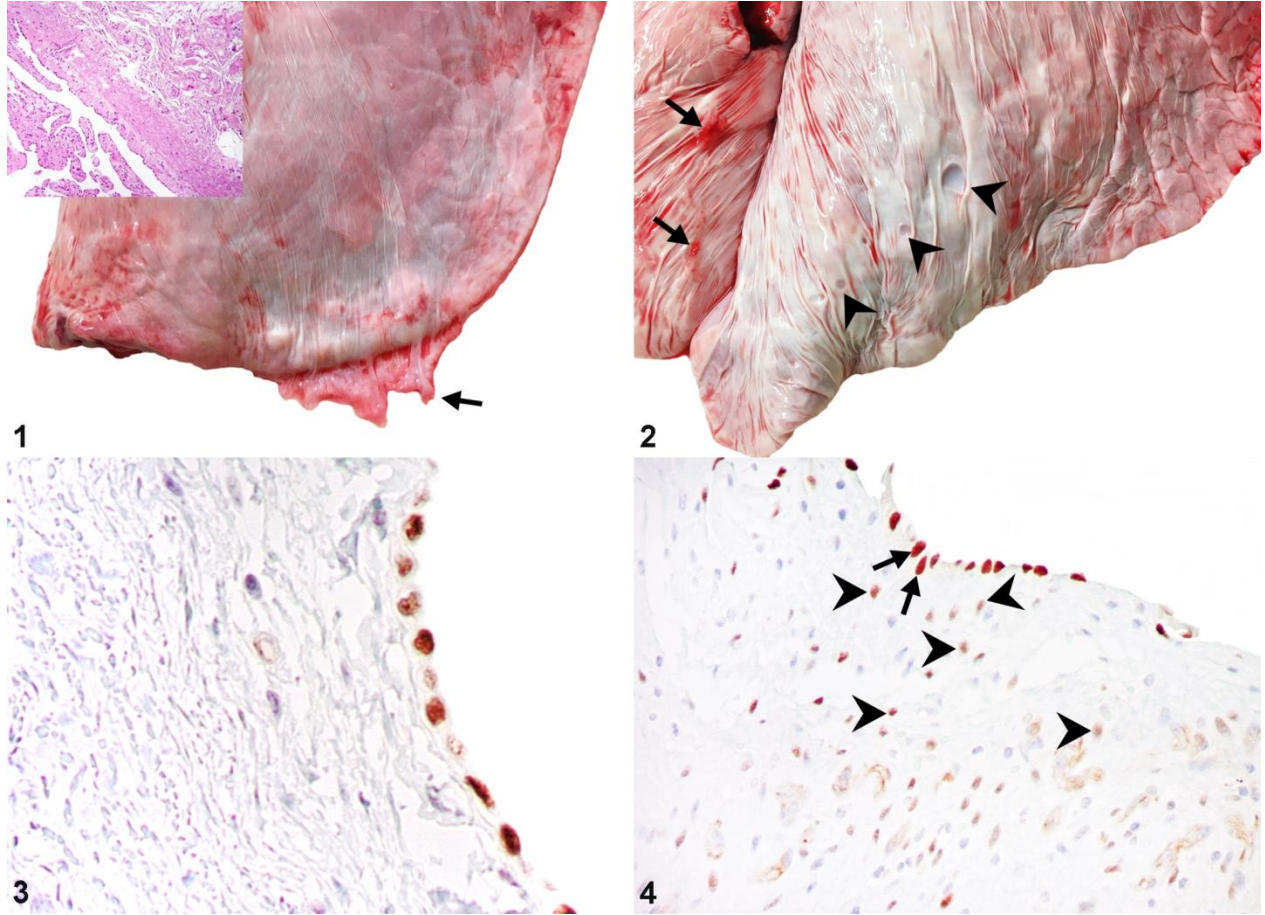
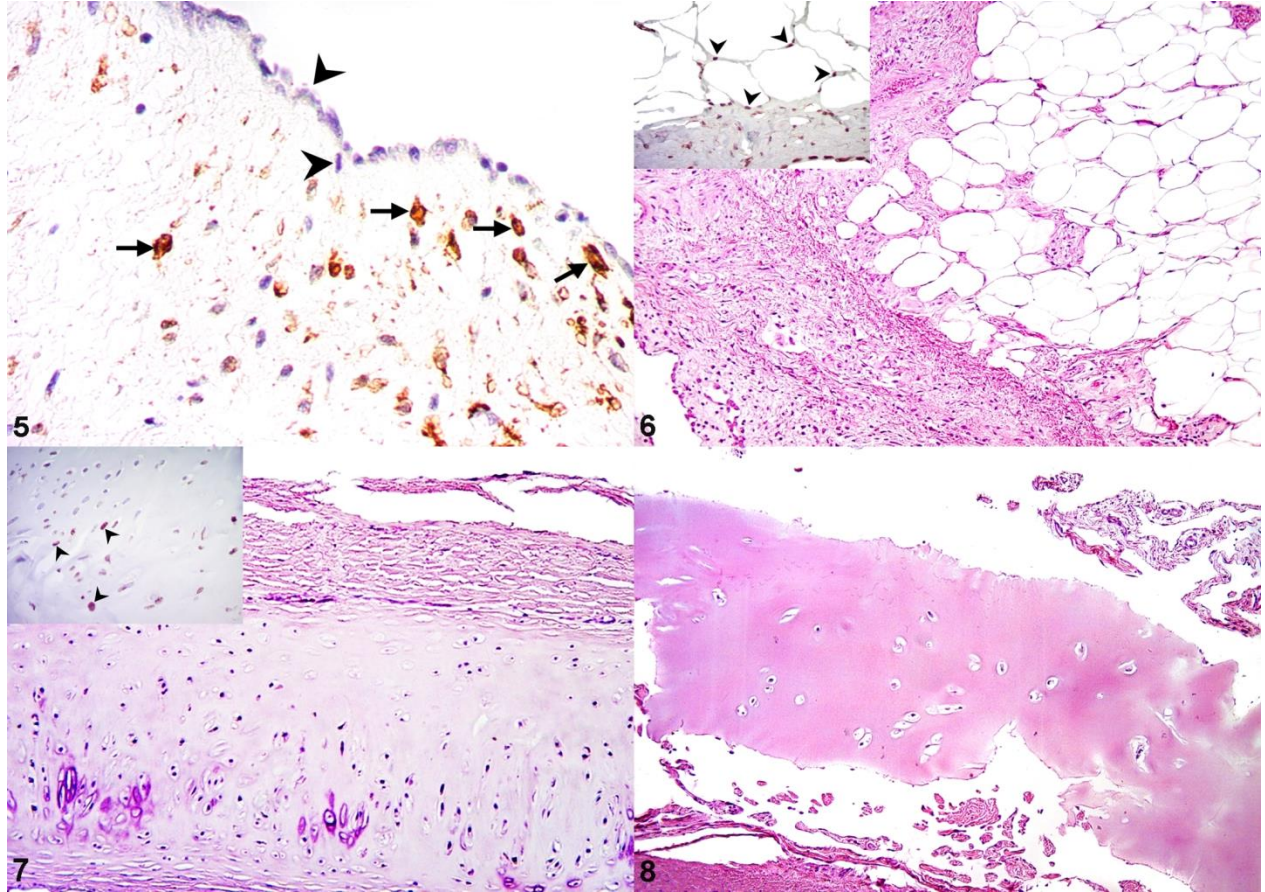
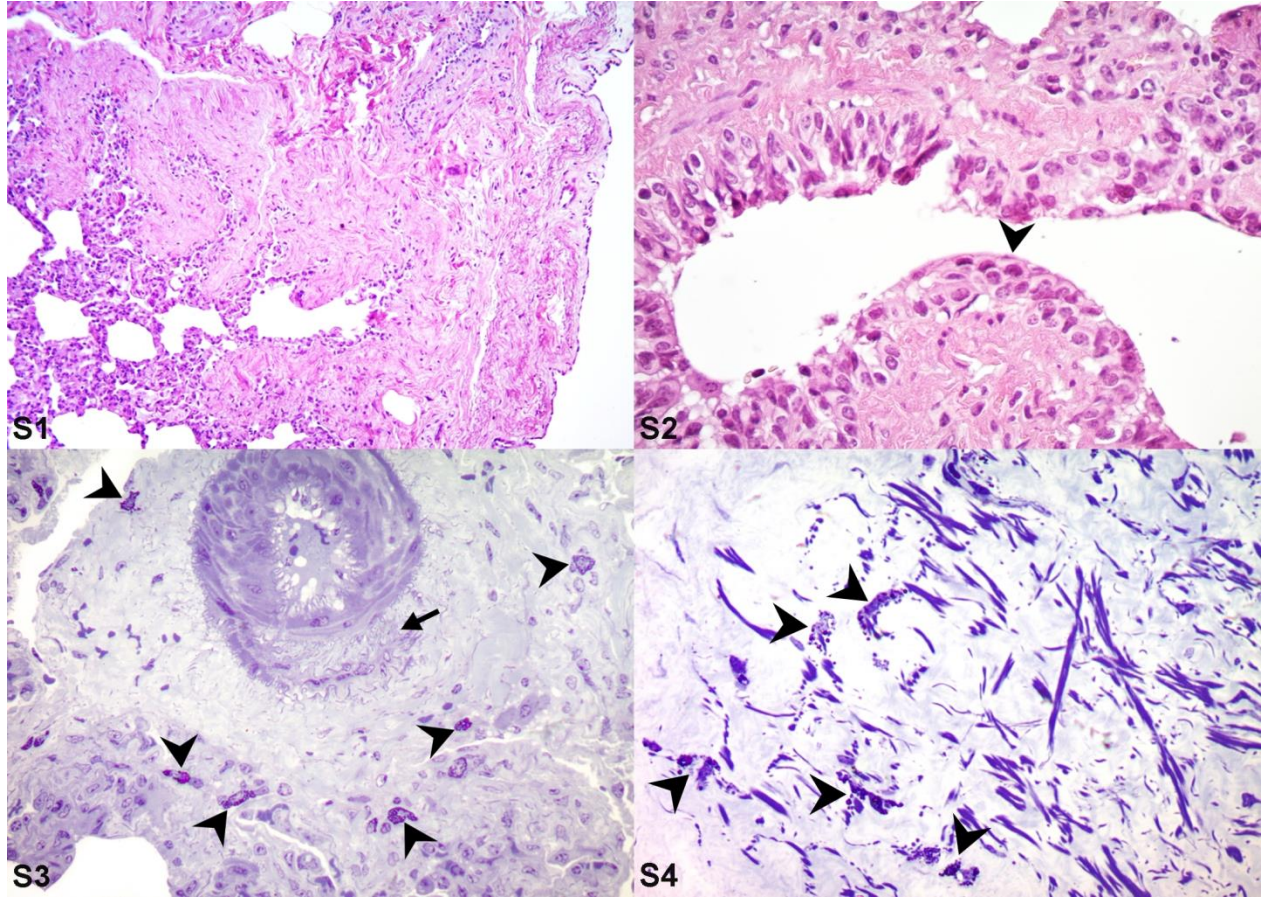


Figure legends

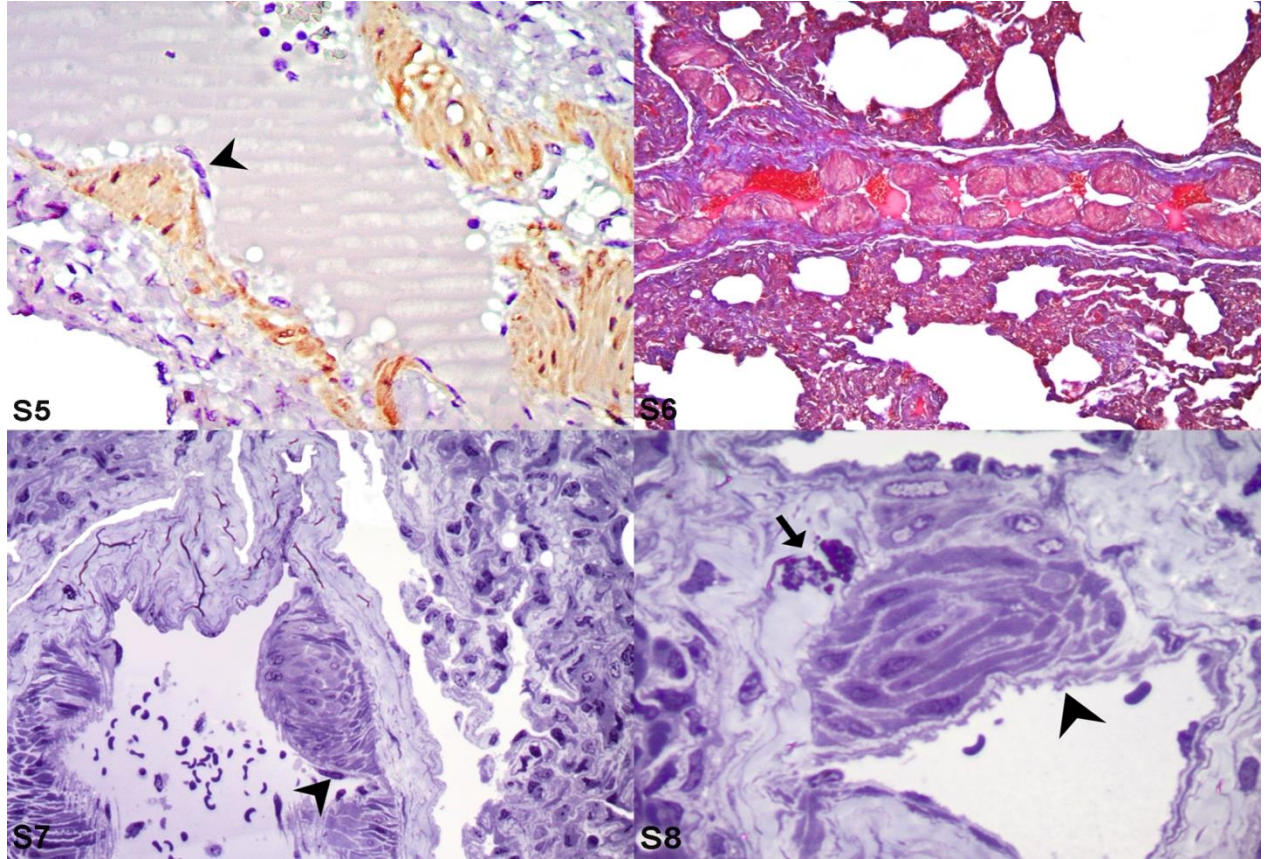
Figures 1-4. Chronic caudal pleural lesions, lung, cattle. **Figure 1.** The margin of the caudal lobe has villous pleural excrescences that were soft and hyperemic. Inset: villous structures with a core of connective tissue project from a zone of pleural fibrosis. There are also infiltrating lymphocytes. Hematoxylin and eosin. **Figure 2.** There are several hyperemic fibrous plaques that tightly adhere to the pleura (arrows), and depressed foci with a hard and brittle texture (arrowheads). **Figure 3.** Normal pattern of strong intranuclear immunoreactivity for WT1 in mesothelial cells on the pleural surface. Non-condemned (control) lung. **Figure 4.** In a myofibroblastic focus in a lung condemned for pleuritis, nuclear WT1 immunoreactivity is most intense in surface mesothelial cells (arrows) and present but less intense in clustered cells in the submesothelial myofibroblastic focus (arrowheads).



Figures 5-8. Pleural myofibroblastic foci and metaplasia, lung pleura, cattle. **Figure 5.** Surface mesothelial cells are proliferating and a few are delaminating (arrowheads) but there is no α -SMA immunoreactivity. Conversely, the proliferating submesothelial myofibroblasts are immunoreactive for α -SMA (arrows). **Figure 6.** Adipose metaplasia below the fibrotic pleura, with extension of the fibrosis to the interlobular septum. There is expansion of adjacent alveoli. The mesothelium (lower left) is hyperplastic. Hematoxylin and eosin (HE). Inset: WT1-immunoreactive adipocytes (arrowheads) and mesothelium (bottom right). **Figure 7.** There is cartilaginous metaplasia beneath the fibrotic pleura. HE. Inset: WT1-immunoreactive chondrocytes (arrowheads) in the area of cartilaginous metaplasia. **Figure 8.** There is osseous metaplasia within the proliferated pleura HE.



Supplemental Figures S1-4 Proliferation of fibrous connective tissue, lung, bovine. **Figure S1.** The extensive proliferation of fibrous connective tissue subjacent to the pleura distorts the contiguous parenchyma. Hematoxylin and eosin (HE). **Figure S2.** A small bronchiole has epithelial hyperplasia with squamous metaplasia (arrowhead), and with fibrous connective tissue proliferation at the periphery. HE. **Figure S3.** There is deposition of excessive extracellular matrix in the interstitium with several associated mast cells (arrowheads). The wall of the small artery is undergoing remodeling (arrow). Semithin section, toluidine blue. **Figure S4.** There are disorganized and fragmented collagenous fibers and numerous infiltrating mast cells, all of which are degranulated (arrowheads) with many free dispersed granules. Toluidine blue stain.



Supplemental Figures S5-8. Proliferation and hypertrophy of subendothelial myoblastic cells, lung, bovine. **Figure S5.** Proliferation and hypertrophy of calponin-immunoreactive cells protruding within the lumen of the small vein. The myoblastic cells are covered by nonimmunoreactive hyperplastic endothelium (arrowhead). **Figure S6.** Smooth muscle hypertrophy distorting the luminal space in a sagittally sectioned vein within the lung. Masson's trichrome stain. **Figure S7.** Semi-thin section of a small vein showing the hyperplasia and hypertrophy of myoblastic cells covered by endothelium (arrowhead). Toluidine blue stain. **Figure S8.** Interstitial proliferation of myoblastic cells between two small venules. The basal membrane in the venule is denuded (arrowhead). There are two partially degranulated mast cells adjacent (arrow). Toluidine blue stain.