

## ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES MORFOLOGICAS DE LA BOLSA DE FABRICIO EN LA ENFERMEDAD DE GUMBORO.

(MORFOLOGICAL ALTERATIONS OF THE BURSE OF FABRICIUS IN GUMBORO DISEASE)

por

A. Bernabé, A. Gázquez, A. Blanco, A. Jover y A. Ruiz.

Departamento de histología y anatomía patológica de la Facultad de veterinaria de la Universidad de Córdoba (España).

Palabras clave (Keywords): Bolsa de Fabricio (Fabricius bursa). Enfermedad de Gumboro (Gumboro disease). Virosis. Gallina (chickens).

### Summary

In the present work we have studied by electronic microscope the alterations that occur in the parenchyma of the Fabricio's bag of male chickens, (Leghorn race) a day old, inoculated in the eyes with 0,1 ml from virus of the Gumboro Disease (country virus, strain 52/70). A total of 73 chickens divided into 20 lots, 19 of them experimental and one control, has been used. The modifications we have found are mainly a decrease of the lymphocyte number and a vacuolization of the epithelial cells.

### Resumen

En el presente trabajo hemos estudiado, con el microscopio electrónico, las alteraciones que ocurren en el parénquima de la bolsa de Fabricio de pollos machos, raza Leghorn, de un día de edad, inoculados por vía ocular con 0,1 ml del virus productor de la enfermedad de Gumboro (virus campo, cepa 52/70). Se ha utilizado un total de 73 pollos divididos en 20 lotes: 19, experimentales, y uno, testigo. Las modificaciones que hemos encontrado son, fundamentalmente, una disminución en el número de linfocitos y vacuolización de las células epiteliales.

**Recibido para publicación el 27-4-1981.**

### Introducción

La enfermedad de Gumboro se puede considerar como una enfermedad en cierta manera controlada por los medios de inmunización en masa por vía oral. Sin embargo, las alteraciones histopatológicas provocadas por el virus de la mencionada enfermedad representan un prototipo de injuria vírica a nivel del sistema inmunitario. Por eso el estudio de dichas lesiones en el sistema linfocitario y el crecimiento del virus en las propias células es de suma importancia. En el presente trabajo estudiamos con microscopio electrónico las alteraciones que se presentan en la enfermedad de Gumboro, en la bolsa de Fabricio, en el transcurso de una inoculación experimental por vía ocular.

La bolsa de Fabricio es un órgano linfoepitelial característico de las aves. Es un saco, redondo y oval, situado en posición dorsal y a nivel de la cloaca. La luz central del órgano presenta alrededor de unos doce pliegues tapizados por una mucosa que le asemeja a las vellosidades intestinales (Firth (3) y Naukkarinen y col. (12) ). Está envuelta por una cápsula formada por una túnica serosa y otra muscular (Hoffman(5) ). La luz del órgano se encuentra tapizada por una mucosa constituida por un epitelio cilíndrico modificado que da lugar a una serie de repliegues en los cuales se localizan los nódulos linfáticos (Rampi y col. (13) ).

Firth (3), en 1977, expone que el epitelio de la mucosa es del tipo pseudoestratificado, en el que existen tres tipos de células: tipo I, tipo II y tipo III. El tipo I es una célula oval de citoplasma claro que contiene gránulos sudanófilos y es P.A.S. positivo; el núcleo es oval o esférico y a veces se puede encontrar a cualquier nivel del epitelio y es el menos frecuente de los tres. El tipo II es el más numeroso y son células cilíndricas de núcleo oval que poseen un aparente nucleolo; el núcleo normalmente se localiza en el centro de la célula, y el citoplasma, altamente basófilo, contiene gránulos P.A.S. positivos. El tipo III es una célula caliciforme con núcleo hiper cromático y material secretorio P.A.S. positivo.

En el punto del epitelio donde se localiza la cima de cada folículo se presentan células epiteliales indiferenciadas. La superficie epitelial que se encuentra inmediatamente encima del folículo, va a formar el denominado casquete epitelial del folículo( Firth (3) ).

Para Mandelli y Valeri (9) las partículas víricas que se observan en la enfermedad de Gumboro presentan idénticas características que los reovirus. Asdrubali y Mughetti (1) observan, a las 24 horas postinfección, partículas viriásicas en el citoplasma de numerosas células linfocitarias y macrófagos, por lo que según estos mismos autores estas partículas se replican en los macrófagos.

Según Mandelli y col.(10) las alteraciones de la bolsa de Fabricio en infecciones experimentales son las siguientes:

1. Necrosis de las células linfocitarias, plasmorragia y emigración de linfocitos en toda la estructura folicular y particularmente en la zona medular.

2. Hiperemia, edema e infiltración celular del tejido interfolicular.

3. Destrucción de la trama fibrilar argentófila que sostiene la zona cortical del folículo.

4. Proliferación del epitelio folicular y aparición de numerosos macrófagos que contienen en el citoplasma zonas sudanófilas y P.A.S. positivas.

5. Aspectos iniciales regenerativos, consistentes en la repoblación linfocitaria de la zona cortical del folículo.

6. Fenómenos de reparación consistentes en la activación fibroblástica del estroma interfolicular.

Por otro lado, Asdrubali y Mughetti (1) exponen que la depleción linfocitaria de los folículos en la bolsa de Fabricio se debe a la inva-

sión viriásica del linfocito, que es seguidamente fagocitado y digerido por los macrófagos. Estos mismos autores observan que, en una fase relativamente avanzada de la infección los macrófagos son particularmente numerosos en la zona medular y este fenómeno está íntimamente asociado a la proliferación epitelial.

Para Cheville (2) existe en la infección por virus, de la enfermedad de Gumboro, una necrosis de linfocitos seguida de fagocitosis y presencia de histiocitos, así como de partículas viriásicas de 58 a 65  $m\mu$  de diámetro en el citoplasma de macrófagos, células endoteliales y heterófilos.

Mandelli y Valeri (9) encuentran partículas de virus tanto en el espacio intra como extracelular, y exponen que las lesiones observadas se hallan sobre todo en los macrófagos, que invaden precozmente los folículos necróticos y particularmente su zona medular. Los macrófagos afectados pueden llegar a sufrir procesos de necrosis y dan lugar a que el virus pueda salir al espacio extracelular.

Para el presente trabajo hemos utilizado como material de experimentación 75 pollos machos de raza Leghorn, de un día de edad al comienzo de la experiencia, exentos de toda enfermedad infecciosa o parasitaria. A los veinte días de edad, a cada animal de experimentación se le administró por vía ocular 0,1 ml de virus producto de la enfermedad de Gumboro ("virus campo", cepa 52/70, cedido gentilmente por los Laboratorios Sobrino) a una dilución 1/40. Los pollos se distribuyeron en 19 lotes que, en relación con las lesiones observadas, se reagruparon según el cuadro I, en el que también se expone la edad y horario de sacrificio.

Los animales sometidos a inoculación experimental y los testigos se mantuvieron bajo idénticas condiciones de temperatura y horas luz. La primera se sostuvo a 36° C durante la primera semana y se disminuyó progresivamente de acuerdo con la edad. La luz artificial se mantuvo encendida durante las 24 horas de los seis primeros días, y el resto de la experiencia, en fotoperíodos de once horas. Se les administró una alimentación adecuada y tanto el pienso como el agua lo tomaron a discreción.

Cuadro I.

Grupos	Lotes	Nº de animales tratados	Animal testigo	Edad	Sacrificio en h.p.i.
I	1	2	1	20 días	3
	2	2	1	20 "	19
	3	2	1	20 "	23
	4	3	1	21 "	48
II	5	3	1	22 "	72
	6	3	1	23 "	96
	7	3	1	24 "	120
	8	3	1	25 "	144
	9	3	1	26 "	168
	10	3	1	27 "	192
	11	3	1	28 "	216
	12	3	1	29 "	240
III	13	3	1	31 "	288
	14	3	1	33 "	336
	15	3	1	35 "	384
	16	3	1	37 "	432
	17	3	1	39 "	480
	18	3	1	41 "	528
	19	3	1	43 "	576

Tras la administración del virus, los pollos se escogieron al azar y se sacrificaron por decapitación. Simultáneamente, con los animales tratados fue sacrificado un pollo testigo. Inmediatamente después de la decapitación se realizó la extracción de la bolsa de Fabricio para su estudio con microscopio electrónico.

### Estudio ultraestructural

Las muestras, previamente fijadas en glutaraldehído al 5 p.100 en solución tampón-fosfato según el proceso de Sabattini y col. se refijaron en tetróxido de osmio al 2 p.100 en tampón-fosfato. Seguidamente se deshidrataron en una escala ascendente de acetonas. Finalmente, se incluyeron las muestras en durcapán A.C.M. (araldita). De los bloques obtenidos, se realizaron cortes de 600 Å de espesor, que se contrastan con acetato de uranilo al 2 p.100, y a continuación, con citrato de plomo. Los cortes se han obtenido en un ultramicrotomo L.K.B. modelo II, de avance térmico y cuchillas de vidrio. Para su observación se ha utilizado un microscopio PHILIPS modelo 300 del Servicio de Microscopía de la Universidad de Córdoba, con el que se realizaron las electronografías en placas de 9 x 6,5 cm, Agfa-Gevaert, tipo Sciencia.

### Observaciones

Atendiendo a la similitud del cuadro lesional de los distintos lotes, los hemos reagrupado para su discusión y estudio como a continuación se expone:

GRUPO I .....	Lotes 1 al 4 (ambos inclusive)
GRUPO II .....	Lotes 5 al 12 " "
GRUPO III .....	Lotes 13 al 19 " "

GRUPO I. En las muestras obtenidas de los animales sacrificados entre las 3 y 48 horas después de la inoculación hemos encontrado, con el microscopio electrónico, imágenes muy similares. En el epitelio que reviste la bolsa de Fabricio las modificaciones que se encuentran son escasas, si bien podemos destacar una ligera degeneración mucoide en el citoplasma de las muestras correspondientes a los lotes últimos de este grupo.

En general, los folículos linfoepiteliales están sumamente desarrollados y en el tejido intersticial encontramos numerosos vasos que están hiperémicos. En estos folículos linfoepiteliales se distinguen dos zonas características: una periférica, en la que encontramos de forma definida una banda de células epiteliales que se relacionan entre sí por fuertes desmosomas y que emiten numerosas prolongaciones citoplasmáticas, constituyendo una red tridimensional donde se localizan los linfocitos. Estas células no muestran alteraciones, si bien, en los lotes últimos de este grupo, podemos destacar la existencia de un incipiente edema que separa las células entre sí, así como la presencia de citolisosomas que, como estudiaremos más adelante, se hacen mucho más evidentes. A este primer nivel, hemos podido estudiar un parénquima linfocitario muy abundante, constituido sobre todo por linfocitos maduros y elementos linfoblásticos, que muestran un alto índice mitótico. Tanto los linfocitos como los linfoblastos se disponen a modo de mosaico y, al mismo tiempo, se relacionan con las células epiteliales. Otra central, en la que observamos la existencia de células epiteliales distribuidas de una forma más laxa que en la zona periférica y sin mostrar apenas modificaciones. A estos niveles son muy numerosos los linfocitos y linfoblastos y, como ocurriera anteriormente, son también numerosas las mitosis.

GRUPO II. Las muestras estudiadas al microscopio electrónico, de los lotes 5 al 12, son muy diferentes de las correspondientes al grupo anterior y presentan gran número de lesiones. En el tejido conectivo intersticial hemos encontrado que todos los elementos capilares están dilatados e hiperémicos, con marginación leucocitaria y fenómenos de Sticking-effect. Igualmente observamos tumefacción de las células endoteliales, lo que favorece el desarrollo de edema. En general, todo el folículo linfoepitelial presenta una fuerte depleción linfocitaria, que inicialmente es

parcial y resulta prácticamente total en los últimos lotes del grupo. En la zona periférica encontramos que las células de la banda epitelial se hallan separadas unas de otras por un fuerte edema, quedando muy manifiestos los desmosomas. En estos elementos celulares se aprecian numerosos citolisosomas y cuerpos residuales. En la zona central de estos folículos linfoepiteliales es donde hemos encontrado mayor número de alteraciones. Como mencionamos anteriormente, existe una depleción casi total tanto de linfocitos como de linfoblastos. A nivel de las células epiteliales encontramos dos grupos celulares muy diferentes. En el primero se mantienen las relaciones entre las células (desmosomas), muestran los núcleos en vías de degeneración, con bordes dentados y la cromatina condensada en grandes grumos adosados a la envoltura nuclear; el citoplasma se presenta muy vacuolizado con numerosos e irregulares citolisosomas y cuerpos residuales. En el segundo, los elementos han perdido las conexiones entre sí y se han tornado elementos globulosos. La característica más importante de estas células es la presencia de cuerpos de inclusión viriásicos de disposición más o menos poliédrica. En el citoplasma de estas células se aprecian grandes vacuolas que se constituyen a modo de quistes celulares y en donde se encuentran productos de desecho, junto con la presencia de sustancias grasas. Son numerosas las células de este tipo que están en vías de desintegración.

GRUPO III. En los estudios realizados de las muestras correspondientes a los lotes 13 al 19 hemos encontrado una disminución del cuadro lesional descrito anteriormente. La arquitectura de la bolsa es aparentemente normal y se distinguen los folículos linfoepiteliales inmersos en un tejido conectivo muy vacuolizado. Las zonas periféricas de los folículos linfoepiteliales muestran una banda de células epiteliales a modo de empalizada, sin presentar modificaciones y entre las que se intercalan numerosos elementos linfocitarios que muestran numerosas mitosis. Las zonas centrales de los folículos linfoepiteliales mantienen su entramado, constituido por células epiteliales entre las que se intercalan numerosos linfocitos y linfoblastos aparentemente normales. En los lotes últimos de la investigación se puede afirmar que existe una reconstrucción de la bolsa de Fabricio.

### Discusión

En este capítulo seguimos considerando la agrupación de los lotes realizada en el capítulo de Observaciones.

En las observaciones de las muestras correspondientes al primer grupo de experimentación hemos encontrado una morfología similar a la que se describe tradicionalmente Firth (3), destacando nítidamente los folículos linfoepiteliales con sus zonas periférica y central. En este primer grupo, las células que constituyen el casquete epitelial del folículo, apenas presentan alteraciones, si bien, como estudiara Ibraginov (6) son de interés las que se refieren a la existencia de citolisosomas.

En general, según Landgraf y col. (7), la bolsa de Fabricio, en este primer grupo de experimentación, corresponde a un órgano activo, puesto que se observan numerosas figuras de mitosis en un gran almacenamiento de linfocitos. Por otra parte, no hemos encontrado un significado manifiesto a las figuras de necrosis observadas en los linfocitos.

En el segundo grupo de nuestra investigación hemos encontrado imágenes que son semejantes a las del fotomicroscopio, en las que hallamos linfocitos en escaso número, como corresponde a una depleción linfocitaria, y la presencia de formaciones quísticas a partir de elementos epiteliales.

En relación con los linfocitos en la bolsa de Fabricio ocurre algo similar a lo descrito por Mozos (11) en el timo, es decir, la disminución del número de mitosis y del número general de los propios linfocitos, así como abundantes figuras de necrosis celulares. Pero las lesiones celulares más evidentes recaen sobre las células epiteliales del folículo linfoepitelial. En primer lugar, células epiteliales del casquete del folículo muestran una tumefacción evidente y, como estudiaran Rampi y col. (13), la presencia de un edema que separa a dichos elementos entre sí. A nivel de estos elementos celulares hemos encontrado vacuolas que ocupan

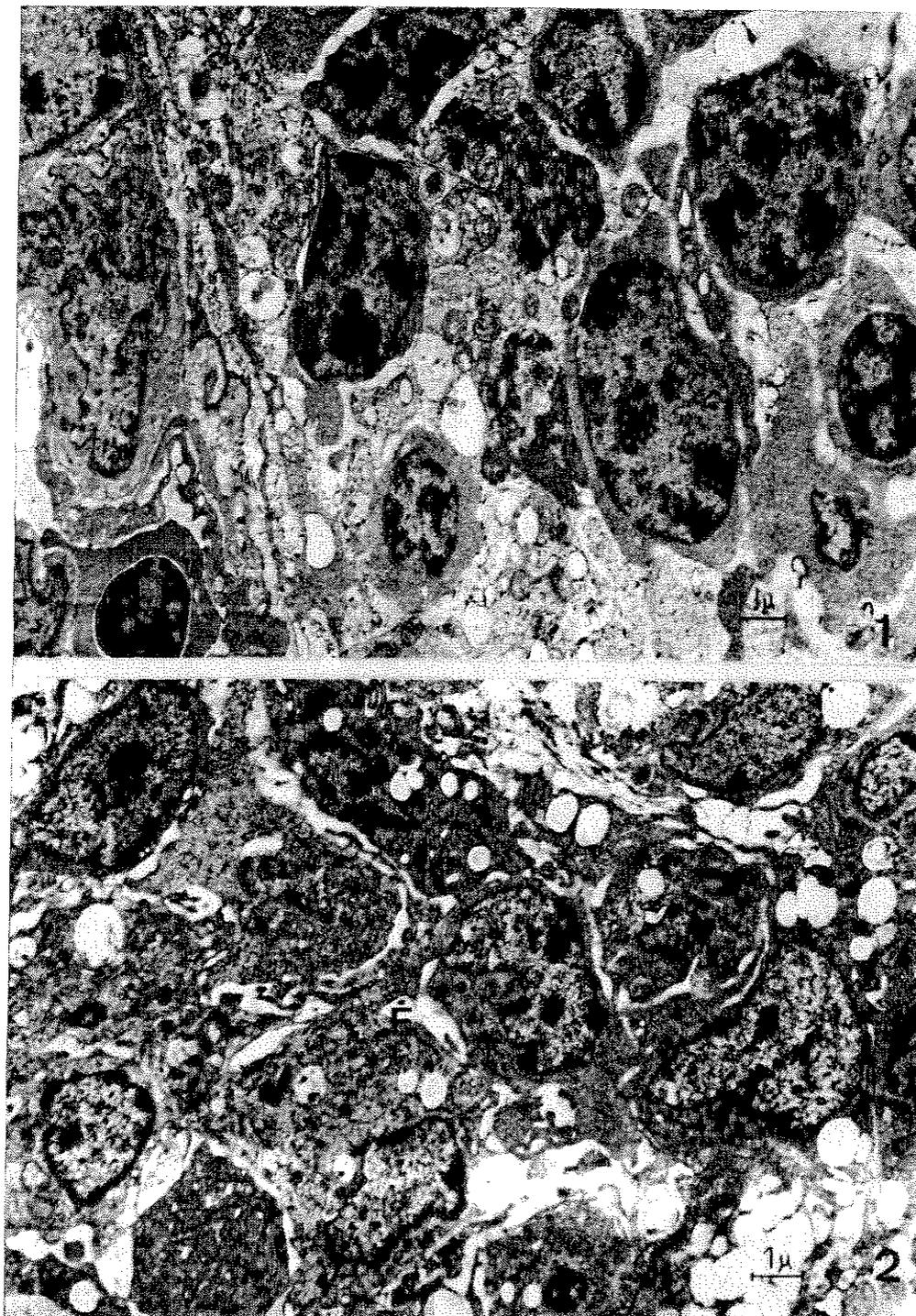
gran parte del citoplasma y la existencia de abundantes citolisosomas y cuerpos residuales; imágenes que corresponden, como citara Vindevogel y col. (14), a células en degeneración. Pero coincidimos con Asdrubali y Mughetti (1) en que son más evidentes las alteraciones de las células epiteliales a nivel de la medula del folículo. La mayoría de ellas muestran claramente uniones que constituyen una red tridimensional muy laxa y, como estudiara Cheville (2), con un manifiesto edema. En estas células las imágenes son muy similares a las discutidas anteriormente. Entre estas células retículo-estrelladas, al igual que Giambrome y col. (4), hemos observado células aparentemente epiteliales, aunque no muestran con claridad desmosomas. Son células tumefactas, con claros quistes celulares y numerosos citolisosomas que, según Landgraf (7), se encuentran claramente en vías de degeneración. Pero, como estudiaran Mandelli y Valeri (3), lo más importante es la presencia en el citoplasma de estas células de cuerpos de inclusión en los que se distinguen las partículas viriásicas con su típica morfología (Lunger y Maddux (8)).

Los fenómenos hemorrágicos de los folículos linfoepiteliales, como describen Mandelli y Valeri (9), son otra de las alteraciones de mayor importancia y se constituyen a partir, fundamentalmente, de roturas de los capilares, al separarse la porción cortical de la medular, por edema.

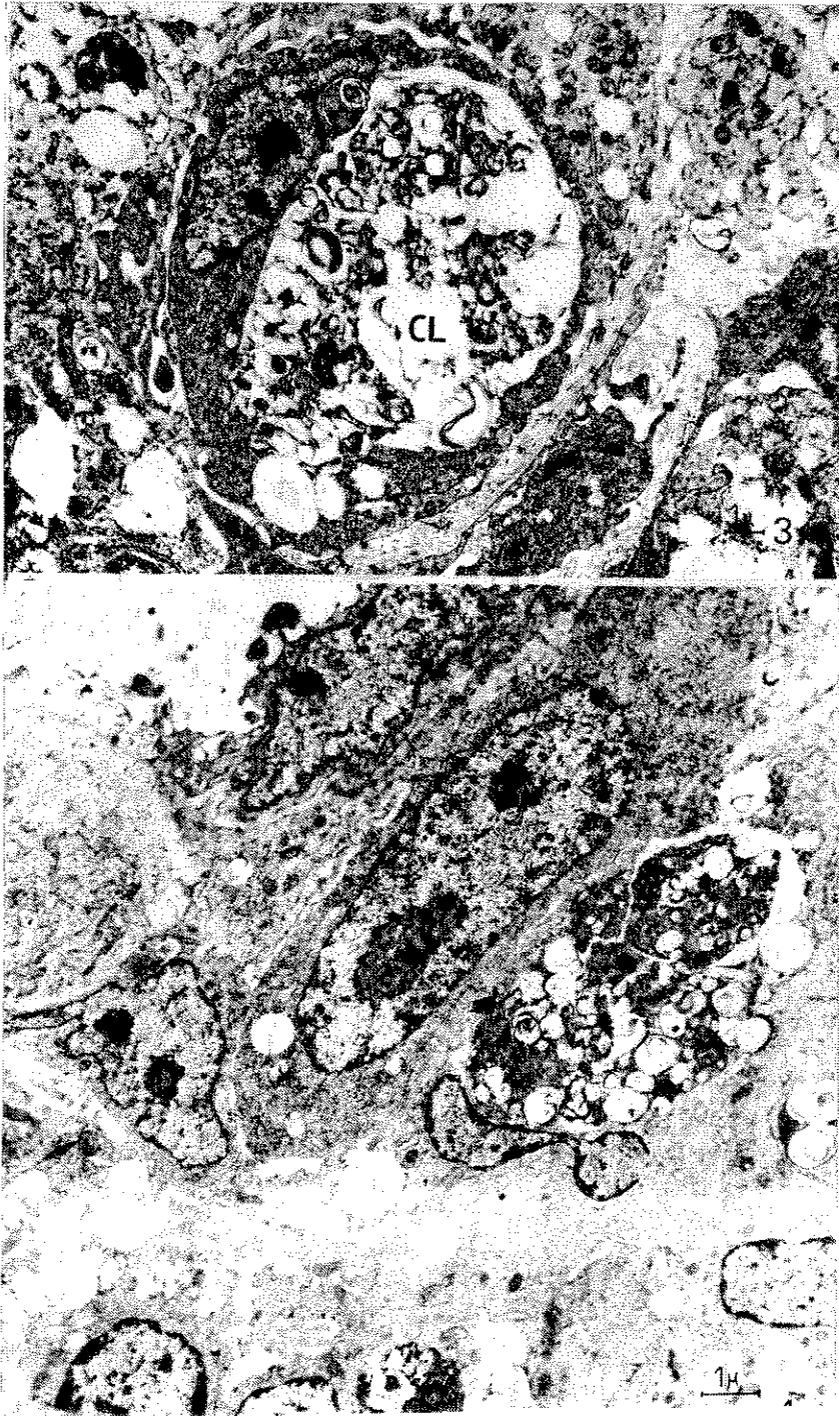
Al igual que ocurre en el timo (Mozos (11)), el tercer grupo se caracteriza por un regreso a la normalidad con la presencia de numerosos linfocitos y la constitución del lecho epitelial que reviste la totalidad del folículo.

Piè de las figuras

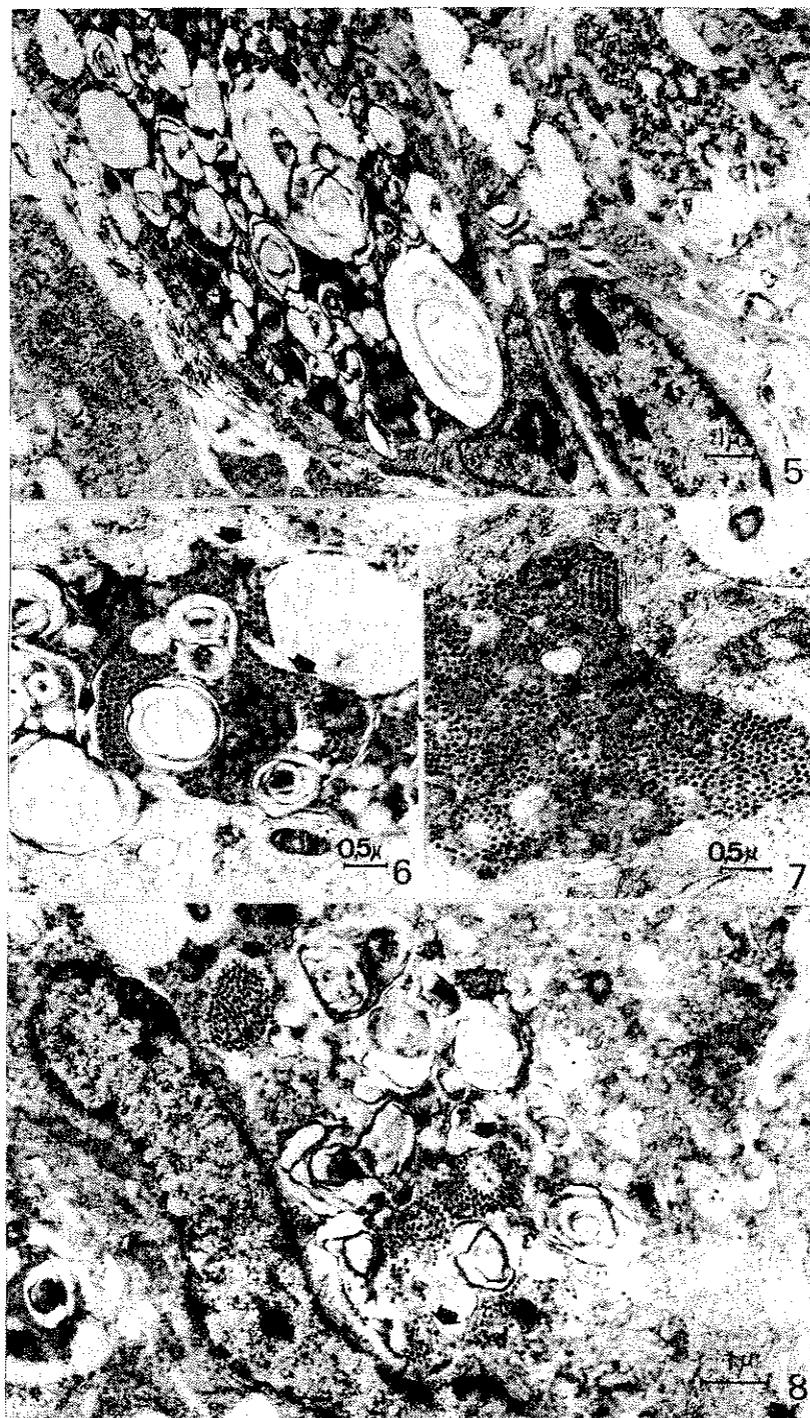
- Figura 1. Detalle del parénquima de la bolsa de Fabricio. Se observan numerosos linfocitos y linfoblastos. x 10 500.
- Figura 2. Detalle del parénquima de la bolsa de Fabricio. Se observan numerosas células epiteliorreticulares (E). x 9 500.
- Figura 3. Célula epiteliorreticular con gran citolisosoma (CL) en su citoplasma. x 9 500.
- Figura 4. Célula epiteliorreticular con un citolisosoma en el que se aprecian partículas viriásicas (flecha). x 11 000.
- Figura 5. Detalle de célula epiteliorreticular con un gran citolisosoma. x 10 000.
- Figura 6. Detalle de un citolisosoma con partículas viriásicas (flecha). x 25 000.
- Figura 7. Detalle de partículas de virus. x 25 000.
- Figura 8. Célula epiteliorreticular con un gran citolisosoma, con numerosas partículas viriásicas (flecha). x 11 500.



Figuras 1 y 2



Figuras 3 y 4



Figuras 5, 6, 7 y 8

### Bibliografía

1. Asdrubali, G. y L. Mughetti. Contributo alla conoscenza degli aspetti ultrastrutturali della bursa di Fabricio nella malattia di Gumboro sperimentale. Nuova Veterinaria, 2, 71-87 (1972).
2. Cheville, N.F. Studies of the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. Am.-J. Pathol. 51, 537-555 (1967).
3. Firth, G.A. The normal lymphatic system of the domestic fowl. Vet. Bull. 3, 167-179 (1974).
4. Giambrome, J.J., D.J. Fletcher, P.D. Lukert, R.K. Page y C.E. Edeson. Experimental infection of turkeys with infectious bursal disease virus. Avian Disease, 22, 451-458 (1978).
5. Hoffman, F.G. Histologische Untersuchungen an lymphatischen Organen des Huhnes (Gallus domesticus) während des ersten Lebensjahres. Z. Zellforsch. 136, 45-58 (1973).
6. Ibraginov, V.A. Pathomorphology of the bursa of Fabricius in fowls. Veterinary Moscow, 5, 55-68 (1976).
7. Landgraf, H., E. Vielitz and R. Dirsch. Occurrence of and infectious disease affecting the burse of Fabricius (Gumboro disease). Dt. tierärztl. Wschr. 74, 6-10 (1967).
8. Lunger, P.D. and T.C. Maddux. Fine structure studies of the avian infectious bursal agent. I. In vivo viral morphogenesis. Avian Diseases. 16, 874-893 (1972).
9. Mandelli, G. and A. Valeri. Ultramicroscopic finding in the bursa of Fabricius in Gumboro disease. Folia Vet. Latina. 2, 785-821 (1972).

10. Mandelli, G., A. Rinald, D. Gessi, G. Pascualli y A. Valeri. Infezione sperimentale del pulcino di un giano col virus della malattia di Gumboro. Extracto de Atti Soc. Italiana Sci. Vet. 13 (1969).
11. Mozos, E. Estudio de las alteraciones morfológicas del timo en la enfermedad de Gumboro. Tesina. Universidad de Córdoba. (1980).
12. Naukkarinen, A., A.V. Arstila and T.E. Sorvart. Morphological and functional differentiation of the surface epithelium of the bursa of Fabricius in chicken. Anat. Rec. 191, 415-432 (1978).
13. Rampi, T., G. Castelli and G. Mandelli. Histological finding in the bursa of Fabricius in Gumboro disease. Clínica Vet. 98, 479-491 (1975).
14. Vindevogel, M., M. Gouffaux, G. Muelemans, J.P. Duchatel y P. Hallen. Maladie de Gumboro. Distribution et persistance du virus chez le poussin inoculé. Etudes sur la transmission de la maladie. Avian Path. 5, 31-38 (1976).