



UNIVERSIDAD NACIONAL DE AUTÓNOMA MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

“Determinación y caracterización de proteasas de secreción acarreadas en Microvesículas (Mvs) de *Mannheimia haemolytica* A2”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

GERARDO ALBERTO RAMÍREZ RICO

ASESORA:

DRA. GUADALUPE MIREYA DE LA GARZA AMAYA

COASESORA:

DRA. CYNTHIA GONZÁLEZ RUÍZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos la Tesis:

"DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DE SECRECIÓN ACARREADAS EN MICROVESÍCULAS(MVs) DE Mannheimia haemolytica A2".

Que presenta el pasante: GERARDO ALBERTO RAMIREZ RICO

Con número de cuenta: 30412768-7 para obtener el Título de: Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de Junio de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Magdalena Guerrero Cruz	
VOCAL	M. en C. Juan Sebastián Barrientos Padilla	
SECRETARIO	Dra. Cynthia González Ruíz	
1er SUPLENTE	M.V.Z. Juan Omar Hernández Ramírez	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Marcos Sánchez Pérez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

**Proyecto parcialmente financiado por el proyecto PAPIIT
RR200113 Y CONACYT EXP 1508 9049.**

DEDICATORIAS

A mis padres:

Yolanda Rico Sandoval y Gilberto Ramírez Del Pino

Mis padres y personas que más quiero en todo el mundo. Siempre se esforzaron para que pudiera realizar esto que ahora está plasmado en hojas. Cada uno expresa su amor a su manera pero sé que siempre estuvo latente durante todo este tiempo, como el mío hacía ustedes. Esto especialmente es para ustedes, espero que estén orgullosos de mí como yo lo estoy de los dos. Espero que esto sea algo de lo que pueda representar su sacrificio hacia mí, que al verlo sonrían y brote una lágrima de felicidad. Así como a mí me llenaba de felicidad ver mis juguetes cada 6 de enero. ¡Gracias, muchas gracias por todo!

A mis Abuelos

Abuelos, abuelitos, esto es algo que siempre quise que vieran y que estuvieran conmigo cuando lo terminará y afortunadamente así es. Los quiero infinitamente, sé que hubo un momento en el cual llegaron a creer que no lo lograría pero aquí esta y también es para ustedes. Pocas personas he visto llorar por mí, pocas personas he visto llorar porque me siento mal, ustedes han sido de esas personas y sé que nunca será suficiente para agradecer eso. Gracias por creerme en mí.

A mis hermanos:

Los recuerdos más gratos que tengo de nosotros era cuando fuimos pequeños. Todos esos juegos inventados, ¿Recuerdas cuando quisiste aprender a patinar, lo recuerdas Luis? ¿Recuerdas cuando fuimos juntos a ver a Megadeth, lo recuerdas Claudia? Porque yo si recuerdo todo lo que vivimos juntos. Espero que sean felices y traten de ser mejores personas cada día. Si lo pueden lograr, para muestra esta este escrito. También es para ustedes, los quiero incondicionalmente.

A mi Tío Gerardo:

Siempre te vi como un padre, te admiro como no tienes idea, parte de estar en esta carrera fue por ti, siempre fuiste y serás un ejemplo a seguir, muchas cosas de las que soy o mejor dicho, como soy son gracias a ti. Dibujar, jugar futbol, música, videojuegos. La primera vez que fui a un restaurante fue cuando tú me llevaste, recuerdo esos panecillos con mantequilla. Nunca olvidaré el día que estaba enfermo y me llevaste a la casa el Nintendo 64 de tu cuñado, no sabes lo que significo eso para mí. Espero que te sientas orgulloso de mí. Gracias Tío, muchas gracias por todo.

A Cynthia:

No sé qué decir que no te haya dicho ya. Me viste crecer en todos los ámbitos, tanto profesional y personal. De verdad te siento como una mamá para mí. Te debo tantas cosas que a veces pienso que me tardaría toda la vida para tratar de pagarte lo que has sido para mí, lo que has hecho por mí. Muchas gracias por estar conmigo cuando necesito hablar con alguien, gracias por recomendarme en mi segundo hogar, muchas gracias por ayudarme a conseguir el mejor trabajo del mundo. Muchas gracias "Mamá". Gracias por confiar en mí y gracias por enseñarme ese mágico mundo llamado investigación.

A la Doctora Mireya:

Muchas gracias doctora por abrirme las puertas de su laboratorio, de mi segundo hogar. Desde que llegué ahí me recibieron como si no fuera un desconocido. Siempre que acudo me siento como en casa. Las palabras que algún día me dijo significaron el principio de lo que trato de conseguir día con día: "Un potencial de investigador". Espero que no la haya decepcionado. Gracias por los festejos de mi cumpleaños, era la primera vez después de hace mucho tiempo que alguien celebraba por esa pequeña fecha especial. Gracias por todo.

A Sara:

Muchas gracias por todo el tiempo, esfuerzo, dedicación y paciencia. Sin ti no habría logrado esta meta. Gracias por adoptarme y mostrarme el camino correcto. Gracias por ser mi guía, gracias por ser mi maestra, gracias por todo, muchísimas gracias.

A Mariana Edaly:

Eres esa gran persona que nunca pensé encontrarme, quizá la que siempre soñé cada noche (literal). Nadie más que tu sabe lo que pase durante todo este proceso, ¿Recuerdas esas veces que deliraba con mis geles? ¿Recuerdas las veces que deliraba con la centrifuga? ¿Cuándo alguna vez no te quise dar un beso porque tenía una cepa en sueños y no podía hablar? Nadie puede decirte o nadie puede platicarte de todo lo que hacía en este proyecto, nadie sabe todos los días que estaba en el CINVESTAV y hasta que hora trabajaba ahí, nadie más que tú lo sabe. La mejor parte de mi vida la pase contigo, la mejor etapa de mi vida la viví contigo, difícilmente habrá algo que la superé, nunca nada cambiará eso y tú lo sabes. Me conociste como alumno, profesor e intentos de investigador, me viste crecer poco a poco. A pesar de todo lo que realizaba siempre tenía tiempo para ti porque siempre fuiste la número 1 en mi vida. Necesitaría un libro entero para decirte todo lo que siento por ti. Gracias, en verdad gracias por ser parte de mi vida en ese proceso, en esa etapa.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Cynthia González Ruíz por todo el tiempo dedicado, ayuda, orientación y esfuerzo para realizar este proyecto.

A la Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya investigadora del departamento de Biología Celular del CINVESTAV por toda su confianza y apoyo para realizar este trabajo. Especialmente por haberme brindado la oportunidad de realizar este proyecto dentro de las instalaciones y equipo de laboratorio.

A la Dra. Magda Elizabeth Reyes López por su ayuda y asistencia en la realización de la Microscopía Electrónica de Transmisión. Gracias por la paciencia y por resolver todas mis preguntas. Gracias.

A mis maestros y amigos Ernesto y Omar, gracias por dedicarme un poquito de su tiempo, gracias por brindarme su amistad y por enseñarme y guiarme dentro de mi vida profesional. Los admiro amigos. ¡Gracias!

A mi mamá, gracias mamá por siempre estar ahí, gracias por apoyarme en todo, gracias por sacarme adelante, gracias por nunca dejarme caer, gracias por nunca negarme nada, gracias por darme todo a pesar de no quedarte con nada. Eres lo más grande para mí, eres la mejor mamá del mundo, eres lo mejor y lo que más quiero en este mundo. Te quiero infinitamente.

A toda mi familia, especialmente a mis Tío Alejandro, Teresa, Cruz e Irene, muchas gracias por abrirme las puertas de su hogar, gracias por ayudarme a cumplir mi sueño. Gracias a mis primos/hermano Fabián, Monse, Cesar, Luis, Brenda, Isaac por siempre estar conmigo y ser la mejor familia del mundo.

A mi mejor amigo Humberto, siempre me viste esforzarme y luchar por lo que quiero, me viste crecer, llorar y sacrificarme por ser mejor día a día. Espero que estés orgulloso de mí porque yo lo estoy de ti. A mi otro mejor amigo Jorge, te conozco desde el kínder, toda una vida juntos, compartiendo vivencias, gustos, pasiones, amigos, sabes lo que significas para mí, gracias por interesarte en este proyecto, ayudarme y escucharme cuando lo necesitaba.

A todos los que forman parte del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV del laboratorio 52 por todo el apoyo brindado, consejos, ayuda y comentarios. Muchas gracias a todos.

A mi escuela UNAM por darme todos los beneficios que necesitaba para lograr lo que soy ahora, por haberme brindado la oportunidad de obtener una formación académica de calidad y contribuir a ser un humano diferente a los demás.

ÍNDICE

Página

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Antecedentes generales.....	1
I.2. Mannheimia haemolytica.....	4
I.3. Mecanismos de defensa pulmonares Específicos e Inespecíficos.....	5
I.3.1 Mecanismos inespecíficos de defensa pulmonar.....	6
I.3.2 Mecanismos específicos de defensa pulmonar.....	12
I.4. Factores predisponentes para la Mannheimiosis Neumónica.....	16
I.4.1 Estrés.....	16
I.4.2 Interacción virus-bacteria.....	17
I.4.3 Mycoplasmas y otros microorganismos.....	18
I.5. Signología clínica.....	19
I.6. Patogenia de la enfermedad.....	20
I.7. Factores de virulencia de Mannheimia haemolytica.....	20
I.7.1. Capsula.....	21
I.7.2. Adhesina.....	21
I.7.3. Proteínas de Membrana Externa.....	22
I.7.4. Lipopolisacárido.....	23
I.7.5. Leucotoxina.....	23
I.7.6. Proteasas de secreción.	24
I.7.6.1. Neuraminidasa.....	26
I.7.6.2. Sialoglicoproteasa.....	27
I.8. Microvesículas (MVs).....	28
I.9 Interacción y respuesta inmune de las MVs con el hospedero.....	33
II. JUSTIFICACIÓN.....	37

III. HIPÓTESIS.....	37
IV OBJETIVOS GENERAL.....	38
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
VI. 1. Obtención de MVs.....	39
VI. 2. Precipitación de proteínas del sobrenadante.....	39
VI. 3. Cinética de crecimiento bacteriano.....	41
VI. 4. Cuantificación de proteínas.....	41
VI. 5. SDS-PAGE.....	41
VI. 5. 1. SDS-PAGE en geles copolimerizados con 0.2% de substrato.....	42
VI. 6. Caracterización parcial de las proteasas acarreadas en MVs.....	44
VI.7 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	44
VII. RESULTADOS.....	45
VII. 1 Cinética de crecimiento bacteriano.....	45
VII. 2 SDS-PAGE de las MVs.....	47
VII. 3 SDS-PAGE de las proteínas precipitadas del SN de cultivo a partir de células completas.....	48
VII. 4. SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo a partir de células completas copolimerizado con 0.2% de substrato.....	49
VII. 4. 1 SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo de cultivo a partir de células completas y de MVs, gel copolimerizado con 0.2% de gelatina.....	52
VII.5 SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo a partir de células completas copolimerizado con 0.2% de hemoglobina bovina.....	53
VII. 5. 1 SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo a partir de células completas y MVs copolimerizado con 0.2% de hemoglobina bovina.....	55
VII. 6 SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo a partir de células completas copolimerizado con 0.2% de apolactoferrina bovina.....	56
VII. 6. 1. SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo a partir de células completas y MVs copolimerizado con 0.2% de apolactoferrina bovina.....	59

VII.7 SDS-PAGE al 7.5% del SN de cultivo a partir de células completas copolimerizado con 0.2% de hololactoferrina bovina.....	60
VII. 7. 1. SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo a partir de células completas y MVs copolimerizado con 0.2% de hololactoferrina bovina.....	62
VII.8 SDS-PAGE al 10% de las MVs copolimerizado con gelatina utilizando inhibidores de proteasas.....	63
VII.9 Microscopia Electrónica de Transmisión.....	64
VIII. DISCUSIÓN.....	66
IX. CONCLUSIONES.....	73
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	74

RESUMEN

Entre las enfermedades infecciosas que afectan a los rumiantes, las de origen respiratorio constituyen la principal causa de pérdidas en el ámbito mundial, especialmente en animales jóvenes. *Mannheimia haemolytica* es la principal bacteria aislada de procesos neumónicos en rumiantes. *M. haemolytica* es un cocobacilo, Gram negativo, patógeno oportunista de ganado, ovejas y otros rumiantes. De esta bacteria, se han caracterizado Microvesículas (MVs), identificado en ellas diversos factores de virulencia. Poco se ha descrito sobre la presencia de compuestos con actividad de proteasa secretados por este género bacteriano y menos aún a partir de MVs. De tal manera que Si las Mvs de *M. haemolytica* A2 arrastran durante su proceso de formación, una gran cantidad de factores de virulencia los cuales participan directamente en la patogenia de la enfermedad, entonces es posible que dichas estructuras acarren proteasas de secreción biológicamente activas, las cuales podrían ser liberadas en MVs y ejercer un efecto directo sobre diferentes sustratos. El objetivo general del trabajo fue determinar y caracterizar proteasas de secreción acarreadas en MVs de *Mannheimia haemolytica* A2. Para comprobar esto se obtuvieron sobrenadantes de cultivo puro de células completas de *M. haemolytica* A2 a diferentes tiempos de incubación (6, 12, 24, 48 hrs.) y MVs sobreestimulando su producción de dichas estructuras con Gentamicina de 12-16 horas de incubación a 37 ° C en agitación suave. Para obtener una mayor cantidad de proteína se precipitó el sobrenadante de cultivo de células completas con etanol absoluto relación volumen muestra – etanol 1:3 a -20° C durante 1 hora. Posteriormente se estandarizó la concentración y presencia de proteína por el método de Bradford y SDS PAGE al 10%. Después se corrieron geles de poliacrilamida SDS PAGE al 7.5 y 10% copolimerizados con gelatina, hololactoferrina, apolactoferrina y hemoglobina al 0.2%, teñidos con azul de coomasie. Se realizó una cinética crecimiento para comprobar en qué fase de crecimiento se le estaba agregando la Gentamicina, esta se realizó con un cultivo puro overnight en placa de agar sangre e incubándose a BHI a 37° C a 150 RPM, tomándose lecturas cada hora en Densidad óptica y en Unidades formadoras de colonias, obteniendo como resultado que correspondía a la Fase estacionaria tardía de crecimiento bacteriano en dichas condiciones. De los sobrenadantes obtenidos se obtuvo como resultado que a las 24 horas de incubación se observaron bandas concretas de degradación en los diferentes sustratos usando como control una cepa de referencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Estandarizando esto se obtuvieron MVs con tiempo de incubación de 24 hrs. Posteriormente se corrieron geles de poliacrilamida copolimerizados con los sustratos mencionados anteriormente usando como control proteínas del sobrenadante de *M. haemolytica* A2. Se observó actividad proteolítica con pesos de 35, 54, 60, 76, 80, 160, 200 y una mayor que 250 kDa, denotando que dentro de las MVs acarrear proteasas de secreción biológicamente activas ya que las MVs se corren completas. Estableciendo una caracterización parcial de éstas, se estableció que las de alto peso molecular pertenecen a la familia de las cisteín-proteasas neutras y las de bajo peso molecular son metalo-proteasas neutras. Comprobando la existencia de MVs; se realizó Microscopia Electrónica de Transmisión, observándose dichas estructuras con tamaños desde 50 hasta 250 nm, así como también la existencia de MVs alrededor de la bacteria.

INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes generales

Las neumonías son una de las principales causas de pérdidas económicas en nuestro país y, a nivel mundial, estas enfermedades representan aproximadamente el 30% del total de ganado en todo el mundo. Las pérdidas económicas rebasan millones de dólares solamente en Norte América. ¹⁻⁵

A nivel mundial se calcula que aproximadamente el 25% de los animales experimenta al menos un episodio de enfermedad respiratoria durante el primer año de vida. Se estima además, que las neumonías causan aproximadamente 75% de los casos clínicos y su tratamiento llega a representar el 8% del total de los costos de producción. Los microorganismos de la familia *Pasteurellaceae* constituyen el grupo de bacterias más frecuentemente aisladas de los procesos neumónicos en los animales domésticos. ⁶

Particularmente en México, los procesos neumónicos figuran entre las principales enfermedades que originan importantes porcentajes de morbilidad y mortalidad en el ganado ovino. La tasa promedio de incidencia en corderos varía del 10 al 40% y la mortalidad puede rebasar hasta el 20%, lo que se acentúa entre los dos y tres meses de edad. Las pérdidas económicas debidas a estas enfermedades incluyen la cantidad de animales muertos por el proceso, los gastos en medicamentos y la baja conversión alimenticia, ocasionando que aumenten los costos de producción y que disminuya la disponibilidad de alimentos de origen animal. ⁷

Estudios realizados a nivel de rastro en el país indican que el 24% de los ovinos sacrificados y el 28% de los que mueren en centros de producción ovina, presentan lesiones neumónicas. Estos datos se acentúan especialmente en aquellos animales de recién ingreso en el hato. ⁸

La enfermedad neumónica ha sido de mayor estudio en el ganado bovino debido a la mayor producción y explotación de esta especie y del número de animales

existente mundialmente, superando al ganado ovino en un 50% o más. En México existen cifras de producción de ganado ovino de 85,965.2 toneladas anuales totales mientras que en el ganado bovino las cifras son de 1, 654, 533 toneladas.⁹

El principal microorganismo bacteriano patógeno responsable de la lesión neumónica en los rumiantes es *Mannheimia haemolytica*. Este agente se asocia especialmente a rumiantes y rara vez a otras especies animales.^{10,11}

La enfermedad causada por esta bacteria, fue denominada por mucho tiempo Pasteurelosis Neumónica, tanto para ovinos como para bovinos. La Pasteurelosis Neumónica bovina fue descrita por primera vez en los Estados Unidos en 1915 y en el Reino Unido en 1925.¹²

En bovinos, a la enfermedad también se le denominó fiebre de embarque, afectando principalmente a animales menores de un año recientemente transportados, con una mayor incidencia en becerros de 1 a 5 meses de edad, nacidos durante otoño e invierno. La enfermedad, es generalmente fatal y se caracteriza por desarrollar una pleuroneumonía fibrinosa grave.^{1,2}

La Pasteurelosis Neumónica en los ovinos fue descrita por primera vez en 1931, pero no fue sino hasta 1960 cuando la serotipificación y biotipificación del agente ayudaron a definir la epidemiología de la enfermedad.¹³

Actualmente, con la reclasificación de la bacteria (de *Pasteurella haemolytica* cambió a *Mannheimia haemolytica*), la enfermedad ha sido denominada Mannheimiosis Neumónica, por lo que para fines de este documento y para no causar confusión durante el desarrollo de éste, la denominaremos así en el resto del mismo, sin dejar de considerar que dicho proceso se encuentra incluido en el complejo neumónico respiratorio de los rumiantes de producción (bovinos y ovinos).¹⁴

El nombre de *Mannheimia* se otorgó en tributo a Walter Mannheim, biólogo alemán que investigó y mejoró la comprensión de la taxonomía de la familia *Pasteurellaceae*.¹⁵

La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el mundo. En México se le conoce desde inicios del siglo XX. Se presenta en cualquier época del año, pero principalmente cuando hay cambios bruscos de temperatura, como ocurre al principio del verano o del invierno. Es una de las enfermedades más importantes en el ganado, con mayor distribución en el país, apareciendo principalmente en climas templados, subtropicales y tropicales.¹⁶

M. haemolytica es una bacteria Gram negativa, habitante normal de las criptas de las tonsilas de los bovinos y ovinos sanos. Es un importante agente oportunista del tracto respiratorio, debido a que usualmente coloniza la parte alta de éste y bajo ciertas condiciones de inmunosupresión del hospedero, afecta sus mecanismos de defensa, lo cual permite que la bacteria se establezca y se multiplique rápidamente, penetre a los pulmones durante la inhalación, e inicie una infección activa del epitelio alveolar.^{5, 17, 18}

La Mannheimiosis es una enfermedad multifactorial en la que se ven involucrados diversos factores de riesgo que determinan la presentación y severidad de las lesiones neumónicas. Entre estos factores se destacan los relacionados con el manejo que generan estrés en los animales, como cambios bruscos de temperatura, hacinamiento, transporte, confinamiento de animales de diferentes edades y las condiciones del destete. También influye el nivel de inmunoglobulinas en el calostro, además de que intervienen otros agentes infecciosos de origen bacteriano y particularmente agentes primarios de tipo viral.^{19 - 21}

El sinergismo que desencadena la interacción virus-bacteria es considerado uno de los factores claves para la colonización de *M. haemolytica* en el pulmón. Entre los principales agentes virales involucrados se encuentran el Herpes Virus Bovino 1 responsable de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, el Virus de Parainfluenza 3, el Virus Respiratorio Sincitial Bovino y ocasionalmente adenovirus. En México se ha identificado la presencia de estos virus en diferentes partes de la República y los exámenes serológicos demuestran una prevalencia del 16% al 70% en ganado de carne.^{22 - 24}

1.2 *Mannheimia haemolytica*

M. haemolytica es una bacteria Gram negativa de forma cocobacilar (1 a 3 μm de diámetro), inmóvil, encapsulada, oxidasa positiva, indol negativa, aerobia y anaerobia facultativa; fermenta glucosa y otros carbohidratos, produciendo ácido pero no gas; es negativa a las pruebas de rojo de metilo, gelatinasa y Voges Proskauer. Crece en agar Mc Conkey, en medios enriquecidos como agar chocolate y en agar sangre produce hemólisis completa y forma colonias de color blanco grisáceo. ²⁵

M. haemolytica en agar sangre crece formando colonias pequeñas, con sólo un pequeño punto central blanquecino. En agar sangre de caballo, de ovejas o de conejo, forma colonias circulares rodeadas por una zona estrecha de β -hemólisis, pero en cultivos de agar hechos con la sangre de corderos muy jóvenes en ocasiones da una doble zona de β -hemólisis. ^{5,26}

Angen y col. en 1999, propusieron al género *Mannheimia* dentro de la familia *Pasteurellaceae* para el complejo negativo a la trealosa de *Pasteurella haemolytica*. Este género comprende 5 especies nuevas basadas en una extensa evaluación cuantitativa de características fenotípicas y genómicas. Según la nueva taxonomía se reconocieron de la siguiente manera:

- *M. haemolytica* (Serotipos 1, 2, 5-9, 12-14 y 16)
- *M. glucosida* (Biotipos 3 A-H y 9, y serotipo 11).
- *M. ruminalis* (taxón 20 y un biotipo 3J)
- *M. granulomatis* (taxón 18 y un biotipo 8D)
- *M. varigena* (biogrupo 6 y taxón 15, 36). ^{26,15}

M. haemolytica se clasifica en dos biotipos: A y T, dependiendo de su capacidad para fermentar arabinosa y trealosa, respectivamente. Sólo las bacterias del biotipo A se asocian con problemas de neumonías en bovinos y ovinos. Las del biotipo T causan Pasteurelosis Septicémica en corderos. Además de la clasificación en biotipos, *M.*

haemolytica se clasifica en 17 diferentes serotipos. Los serotipos 3, 4, 10 y 15 pertenecen al biotipo T, mientras que el resto de éstos, al biotipo A.²⁷

En bovinos el serotipo más común es el A1 y en ovinos es el A2. Sin embargo, se han reconocido los 17 serotipos como potencialmente patógenos y representan el 90% de los aislamientos, el otro 10% permanece como no tipificable y se duda de su patogenicidad.²⁸

Se ha podido comprobar que el serotipo A2 predomina en exudados de becerros enfermos en granja y cuando estos animales fueron trasladados a corrales de subasta y luego a corrales de engorda se encontró que predominaba al aislamiento el A1.^{29, 30}

I.3 Mecanismos de defensa pulmonares Específicos e Inespecíficos.

Cada región anatómica-histológica del aparato respiratorio tiene su propio mecanismo de defensa. Es decir, el sistema de conducción (de nariz a bronquios), sistemas de transición (bronquiolos) y sistemas de intercambio (alveolos), tiene cada uno un mecanismo diferente de defensa.³¹

Los mecanismos de defensa a nivel de las vías aéreas, no sólo desarrollan una respuesta eficaz contra microorganismos invasores, sino que pueden reconocer y eliminar tanto tejidos como partículas inertes exógenas, células neoplásicas y material endógeno, y productos del desarrollo de enfermedades autoinmunes destructivas o degenerativas.³²

En estado de salud, la faringe está colonizada de forma permanente por bacterias potencialmente patógenas, que no alcanzan las vías aéreas inferiores ni el parénquima pulmonar. Ante la contaminación de las vías inferiores, el invasor encuentra una formidable barrera de revestimiento epitelial y espacios aéreos. Debajo de esta pared, la lámina propia y el tejido conectivo alveolar, constituyen los sitios de localización de células plasmáticas productoras de Inmunoglobulina A secretoria (IgA), y macrófagos que captan, procesan, neutralizan, lisan y eliminan organismos ofensores.³³

En el lumen alveolar, los microorganismos son bañados por un material viscoso que contiene lisozima, lactoferrina e interferón, de gran efecto protector. Adheridos a ellas, los gérmenes son deglutidos por células fagocíticas e impulsados hacia el epitelio respiratorio y por acción ciliar hacia el exterior.³³

Cuando sucumbe esta primera línea de defensa, el invasor penetra en los tejidos y se establece firmemente, siguiendo una serie compleja de hechos llamada respuesta inflamatoria.³³

Al inicio de esta respuesta se produce constricción arteriolar, aumento del flujo sanguíneo en los capilares y escape de líquido (edema) hacia el área ocupada por el invasor. De diferentes formas se realiza un esfuerzo concentrado en atraer fagocitos por quimiotaxis hacia la zona de inflamación. Por un lado, se activa el complemento como resultado de la reacción antígeno-anticuerpo. Se agrega a esto la acción de ciertas citocinas (quimiocinas) producidas por las células que intervienen en la respuesta inflamatoria, amplificando la misma. A su vez, estas citocinas atraen más fagocitos a la zona inflamada.³³

Los anticuerpos se combinan con componentes químicos antigénicos (proceso conocido como opsonización), preparándolos para ser fagocitados. Un número creciente de fagocitos, inicialmente neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y luego macrófagos, son atraídos e ingieren el material. Mientras esta respuesta inespecífica se produce, los linfocitos T CD4 vigilan la producción por parte de los linfocitos B de anticuerpos específicos contra el antígeno microbiano y producen mediadores químicos que mantienen a los fagocitos en el sitio de invasión, aumentando la expresión de moléculas de adhesión celular.³³

I.3.1 Mecanismos inespecíficos de defensa pulmonar:

a) Dimensión de partículas inhaladas

Los principales mecanismos por los que se depositan partículas en el sistema respiratorio son tres:

- choque por inercia

- sedimentación gravitatoria
- difusión o movimientos brownianos

Las partículas grandes se impactan en la membrana limitante y son conducidas a la capa mucociliar, donde los cilios atrapan a dichas estructuras de más de 20 μm y hasta el 50% de las que tienen un diámetro de hasta 5 μm .³⁴

Incluso en la respiración por la boca, las partículas de 10 μm y más se depositan por completo en la tráquea, sedimentándose en la mucosa y dirigiéndose hacia el centro por el movimiento ciliar ascendente. La acción ciliar coordinada, junto a la expulsión explosiva de la tos, eliminan partículas mayores. Las más pequeñas, tienden a alojarse fuera del árbol traqueobronquial y su eliminación dependerá de la normalidad ciliar.³⁴

Las partículas depositadas en el aparato mucociliar son eliminadas por completo en 24 horas. Las que miden entre 0.2 y 0.3 μm no se establecen en la vía respiratoria, a menos que lleguen a los alvéolos por difusión. Las de 1 a 2 μm poseen el tamaño ideal para alojarse en los alvéolos, sitio del intercambio gaseoso, donde el macrófago alveolar cumple la función de eliminarlas por completo.³⁴

Ante la inhalación de gases irritantes o nocivos, la respuesta es diferente. La primera línea de defensa es el cese de ventilación. Los gases que se encuentran en el sistema de conducción, son absorbidos por la superficie húmeda de las vías aéreas altas, o desintoxicados por una combinación química de sustancias en el interior de la capa mucosa.³⁴

b) Producción de tos:

Los receptores superficiales de la tos o irritativos de la mucosa laríngea y árbol traqueobronquial son sensibles a la deformación mecánica y a la irritación química. Sus estímulos viajan en dirección central por las ramas aferentes de los nervios glossofaríngeo, neumogástrico, y faríngeo superior. La vía eferente corre por los nervios frénicos, hasta el diafragma, por los intercostales hasta los músculos intercostales y por los laríngeos recurrentes.³⁴

Al estimularse el reflejo tusígeno, sobreviene una fase inspiratoria, una enérgica contracción de los músculos abdominales e intercostales, seguida por una rápida apertura de la glotis. En ese instante, la gran presión intrapulmonar produce una rápida expulsión de aire que arrastra el moco hacia los bronquios más grandes, la tráquea y estructuras laríngeas.³⁴

Junto con el efecto de la epiglotis, en la distribución de materiales durante el proceso de la deglución, se evita que se contamine el tracto inferior.³⁴

c) Secreciones bronquiales

Las secreciones del árbol traqueobronquial se expectoran en forma de esputo. El esputo consta de moco (proveniente de células mucosas y serosas de las glándulas bronquiales y células caliciformes), líquido trasudado de los tejidos, saliva, material celular, enzimas e inmunoglobulinas.³⁴

El moco posee 95% de agua, 3% elementos orgánicos y 2% minerales. Contiene como elementos orgánicos numerosas proteínas, en particular mucina, albúmina, IgG, enzimas y aminoácidos. Además del agua, los principales componentes son los mucopolisacáridos. La función más evidente de las glicoproteínas es aumentar la viscosidad de estos fluidos, sirviendo de capa protectora y lubricante.³⁴

Se ha demostrado que cuando el ácido siálico es destruido por la neuraminidasa o se altera su carga a pH más bajo, la viscosidad disminuye. La neuraminidasa de ciertos agentes patógenos, puede servir para destruir los residuos de ácido siálico de las mucosas bronquiales y consigue licuar la capa protectora, dejando expuesta la superficie celular que normalmente protege las vías aéreas bajas, de la contaminación con partículas inertes o microorganismos.³⁴

En las secreciones bronquiales expectoradas también se hallan enzimas, Inmunoglobulinas, material celular (células epiteliales descamadas), macrófagos alveolares, y PMN, cuya fragmentación libera pequeñas cantidades de ADN.³⁴

La presencia del ión hidrógeno puede contribuir a las propiedades antimicrobianas de estos componentes y afectar el movimiento ciliar. Los cilios no pueden moverse con eficacia a un pH menor de 6.5. ³⁴

d) Mecanismo mucociliar

En el momento de la excreción, el moco bronquial tiene las características de ser un fluido seroso. El movimiento ciliar y la progresiva deshidratación producida por la corriente aérea, distienden uniformemente el tapete mucoso y convierten la parte más superficial en una zona más consistente y espesa. ³⁵

El aparato mucociliar está formado por innumerables cilios que salen de la superficie de las células epiteliales columnares pseudoestratificadas. Cada célula ciliada contiene alrededor de 200 a 300 cilios que se mueven a una velocidad de 300 a 800 oscilaciones por minuto, disminuyendo progresivamente hacia las partes distales del árbol traqueobronquial. ³⁵

La tasa de velocidad más baja se halla en las vías medias y su alteración a este nivel puede conducir al estancamiento de secreciones y predisposición a padecer infecciones locales, posiblemente contribuyendo al desarrollo de bronquiectasias en esa parte de las vías aéreas. ³⁶

Los cilios se encuentran normalmente en un baño líquido claro seroso, de baja viscosidad, donde se agitan e impulsan al moco. Este sobrenada en la superficie del líquido. Los cambios en la viscosidad, pH y cantidad de secreciones, pueden llevar a reducción o interrupción completa del transporte, a pesar de una motilidad ciliar normal. ^{32, 33}

El defecto en la ultraestructura de los cilios respiratorios que altera o evita la motilidad, predispone a las infecciones crónicas y recurrentes en múltiples sitios a lo largo del tracto respiratorio, así como el desarrollo de bronquiectasias. ^{32, 33}

En las secreciones bronquiales también se encuentran sustancias antimicrobianas específicas y biológicamente activas, necesarias para la protección de la vía aérea contra bacterias y virus, tales como: ^{32, 33}

- **α -1-Antitripsina:**

Es una globulina presente en suero, secreciones bronquiales, orina y leche, cuya migración electroforética está dentro del grupo de las α -proteínas. Su actividad biológica en suero es la inhibición de proteasas específicas de origen leucocitario y bacteriano.³⁷

La actividad antiproteolítica de la α -1-antitripsina, también inactiva quimiotripsina, calicreína, plasmina, elastasas y otras proteínas celulares y bacterianas.

³⁷

- **Lactoferrina**

Lactoferrina (LF) es una proteína presente en el moco, leche, saliva, vesícula seminal, mucosa endometrial, y en otras secreciones. En el suero está en muy baja concentración. Posee la capacidad de quelar al hierro férrico. Ejerce un efecto bacteriostático (al quelar el Fe) sobre los microorganismos dependientes del Fe para su crecimiento, como *Staphylococcus aureus* y otras especies bacterianas. También inhibe el crecimiento de algunos hongos y protozoarios. Es interesante el hallazgo de LF en el interior de los gránulos de los PMN, en los estadios de promielocito, junto a lisozima, fosfatasa alcalina y algunas proteínas catiónicas con propiedades bactericidas.³⁷

Lactoferrina pertenece a la familia de las Transferrinas. La diferencia con transferrina (TF) radica en que el complejo LF-Fe es más estable que el TF-Fe a pH ácido. Esto es de poca importancia en condiciones fisiológicas, pero sí de gran valor ante la inflamación, donde el pH del tejido disminuye. TF interviene en el metabolismo del hierro con funciones de transporte, participando en la absorción del metal a nivel de la mucosa intestinal y su conducción a la célula eritropoyética.³⁷

- **Lisozima**

Esta proteína se encuentra en escasa cantidad en plasma y otras secreciones como leche (500 mg %), lágrimas (7 mg %), saliva (200 mg %), orina de pacientes con leucemia monocítica, leucocitos neutrófilos y macrófagos alveolares (2-4g/10⁶ células).³⁷

La lisozima encontrada en las secreciones bronquiales posee dos orígenes: el macrófago alveolar y el acin glandular. Su acción sólo se manifiesta sobre bacterias fagocitadas. Posterior de la fusión del fagosoma con el lisosoma (fagolisosoma), la lisozima crea un ambiente rico en hidrolasas, para su posterior degradación y absorción del substrato específico. La lisozima no solo hidroliza a los mucopolisacáridos de las paredes de las células bacterianas (Gram+) sino que también apoya a la acción lítica del complemento.³⁷

La lisozima se suma a la acción del anticuerpo sIgA y el macrófago alveolar inactivo también la produce de forma continua y constante, independientemente de estimulación.³⁷

- **Calicreínas**

Son importantes mediadores químicos de todo proceso inflamatorio, por sus propiedades vasoactivas, que producen vasodilatación, exudación y leucocitosis. Este mecanismo sobre la musculatura lisa bronquial lleva a la broncoconstricción.³⁷

La cinina presente en el plasma, como su precursor inactivo se divide en dos tipos:

- Calicreína I (Bradicidina)
- Calicreína II

La bradicidina es un mediador importante en la inflamación, provocando vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y diapédesis leucocitaria. Su liberación es posible gracias a la intervención de la calicreína, enzima proteolítica presente en plasma, leucocitos neutrófilos y tejido bronquial.³⁷

La calicreína, a nivel de la mucosa bronquial, ante el arribo de sustancias extrañas, determina la activación del factor XII de la coagulación, sensible a este tipo de respuesta. Este factor activado actúa sobre el factor XI y sobre el mismo plasminógeno, provocando estimulación de la plasmina, que lleva a la liberación de

pequeños fragmentos polipeptídicos de bajo peso molecular, eficaces en la activación de la calicreína.³⁷

I.3.2 Mecanismos específicos de defensa pulmonar

Cuando los agentes infecciosos, en particular las bacterias, eluden las barreras físicas o mecánicas de defensa pulmonar y son depositadas en vías aéreas terminales y alvéolos (partículas con tamaño entre 0.5 y 0.3 μm), se ponen en juego otro grupo de factores. Ellos incluyen los fosfolípidos del surfactante y proteínas (inmunoglobulinas y factores del complemento) del revestimiento alveolar y células fagocíticas como el macrófago alveolar y los neutrófilos PMN.³⁷⁻³⁹

Cerca del 7% de los linfocitos T (LT) totales corresponden a las células NK y el 5% a linfocitos B o células plasmáticas. Si una bacteria de pequeño tamaño se deposita en el alvéolo, puede encontrarse con tres componentes que tratarán de inactivarlo y fagocitarlo: Primero el surfactante, secretado por los neumocitos tipo II, con capacidad antibacteriana contra bacterias Gram negativas.⁴⁰ Segundo, las inmunoglobulinas, especialmente de tipo IgG y en menor concentración, formas monoméricas y secretorias de IgA con actividad opsonizante. Tercero, los componentes del complemento, especialmente el Factor B o properdina, que interactúa con la bacteria y desencadena la vía alterna del complemento. Una o todas estas posibilidades pueden preparar a la bacteria para su posterior ingestión por el macrófago alveolar o en algunos casos, el complemento activado logra lizarla directamente. Cuando la bacteria es opsonizada, la fagocitosis es diez veces superior. Sin embargo, la IgG parece ser la única sustancia capaz de mejorar selectivamente la fagocitosis macrofágica, aunque hay evidencias de que el complemento pueda actuar coordinado con la IgG, mejorando o amplificando el proceso. Una vez que la fagocitosis ha ocurrido, el macrófago alveolar está en condiciones de inactivar al microorganismo.⁴¹

Los macrófagos pueden ganar terreno, llegando a los nódulos linfáticos pulmonares y nódulos linfáticos regionales. Esta llegada al sistema linfático es importante para iniciar la respuesta inmune celular. Indudablemente los macrófagos

son el instrumento para degradar el material antigénico y presentarlo a los linfocitos T específicos en estos nódulos. De esta forma se hace evidente el papel inmune efector de los macrófagos que va más allá de la tradicional función fagocitaria.⁴¹

El macrófago normalmente inactiva microorganismos, desarrollando el hospedero un excepcional método de vigilancia. Sin embargo, si importantes inóculos bacterianos alcanzan el tracto respiratorio inferior, o si ciertos microorganismos virulentos son inhalados, el sistema macrofágico puede sucumbir agobiado. En tales situaciones, el parénquima pulmonar monta una extensiva respuesta inflamatoria que se percibe como enfermedad clínica.⁴²

El macrófago alveolar es la única célula fagocítica residente normalmente en el alvéolo, siendo la primera línea de defensa del tracto respiratorio inferior. Las células de reserva, los neutrófilos, están muy cerca pero localizados en el compartimento intravascular. A pesar de localizarse próximos a los espacios alveolares, los separan varios planos de tejido: el endotelio capilar, el espacio intersticial y el epitelio alveolar. Por lo tanto, el movimiento de los granulocitos hacia el alvéolo debe ser siempre una reacción dirigida desde el lado alveolar. Este es el denominado mecanismo de “migración o quimiotaxis”.⁴²

Finalmente, dos mecanismos de actividad quimiotáctica se ponen en juego durante la respuesta inflamatoria alveolar: la generación directa de factores quimiotácticos producidos por los microorganismos una vez que ingresan al alvéolo y la liberación de factores quimiotácticos producidos por el macrófago alveolar luego de la fagocitosis, amplificando la respuesta.⁴² Estos mecanismos permiten reclutar fagocitos de forma secundaria, para colaborar en la contención microbiana. Una vez que los PMN y otros componentes del fluido edematoso han llenado el espacio alveolar, se produce en el pulmón la respuesta inflamatoria exudativa y la neumonía. Luego de una neumonía y dependiendo del éxito en la contención infecciosa, se produce la consolidación y resolución del proceso. Sin embargo, menos se conoce acerca del proceso que pone fin a la respuesta inflamatoria e inicia la recuperación de una neumonía.⁴³

Aunque diferentes clases de células fagocíticas participan, el neutrófilo es el más numeroso y tal vez el más importante factor del hospedero una vez que la respuesta inflamatoria se ha desencadenado. Normalmente el pulmón contiene PMN secuestrados en áreas intersticiales y marginales de los capilares. Considerando que varios estímulos y factores quimiotácticos pueden atraer a los neutrófilos al alvéolo y vías aéreas, se asume que un suplemento de neutrófilos existe para soportar los requerimientos de una reacción inflamatoria local. Si bien la marginación es un estado de reposo de estos fagocitos de vida corta, las células marginales permanecen en constante equilibrio con células circulantes. La adherencia parece ser imprescindible previa a la diapédesis o ingreso al tejido, y es un paso vulnerable que puede interferir con la respuesta inflamatoria.⁴³

a) IgA

Luego de la identificación de diferentes clases de inmunoglobulinas, se verificó que la principal en las secreciones era la IgA. Por inmunofluorescencia se demostró que las células plasmáticas productoras de IgA son numerosas y están situadas en la lámina propia de las vías respiratorias, alrededor de las glándulas bronquiales. Hay menor número de ellas en porciones distales y rara vez se hallan en las paredes alveolares.⁴⁴

La IgA secretoria (sIgA) que se encuentra en las secreciones posee diferencias estructurales inmunológicas y biológicas que la distinguen de la encontrada en suero. Representa la clase de Ig más frecuente en secreciones bronquiales y se origina por dos mecanismos: una porción (monomérica) que llega a las secreciones por difusión del plasma, y es influenciada por fenómenos de vasodilatación y edema local; la segunda, por mecanismos de síntesis selectiva local, ligados a la actividad de la célula plasmática y de los islotes linfoplasmocitarios presentes en la submucosa bronquial. La sIgA presenta una actividad demostrable contra bacterias, virus y toxinas.⁴⁴

La IgA es un anticuerpo opsonizante de menor eficacia que la IgG. No activa el complemento por la vía clásica. Sin embargo, los agregados de IgA activarían la vía

alterna. No obstante, la sIgA en presencia de lisozima y complemento produce bacteriolisis.⁴⁴

Su principal acción es bloquear la adherencia bacteriana a las mucosas e impedir la colonización. El antígeno ligado a la IgA es transportado con menor facilidad a través de la mucosa. Esto explicaría parte de las discrepancias entre la falta de efectos antimicrobianos *in vitro* y su manifiesta importancia *in vivo*. Su papel biológico en vías aéreas superiores es de gran importancia, actuando en:

- 1) Infecciones virales: aumentando sus niveles en caso de infección viral de las vías aéreas respiratorias. La IgA limita la infección viral, en la puerta de entrada de ingreso del virus (mucosa respiratoria), impidiendo la difusión hemática.
- 2) Infecciones bacterianas: la inmunidad de superficie potenciaría el mecanismo de defensa del organismo. La IgA inhibe la adhesividad bacteriana a la superficie mucosa y facilita la fagocitosis por los macrófagos.
- 3) Organización fibrilar del moco: En las vías respiratorias, la integridad del tapete mucoso y las características viscoelásticas de la secreción, son indispensables para la eficacia de la depuración mecánica de la partícula inhalada. Alteraciones físico-químicas del moco, y la obstrucción del bronquio y del bronquiolo contribuyen a la sobreinfección bacteriana y viral.
- 4) Neutralización de Ag exógenos: Una de las actividades biológicas de mayor relieve de la sIgA consiste en limitar la absorción de sustancias con propiedades antigénicas a nivel de la mucosa.⁴⁴

b) Macrófago alveolar

Tradicionalmente, el macrófago ha sido considerado la única célula eficientemente fagocítica que barre la superficie alveolar, creando un frente de defensa contra partículas inhaladas y microbios; al macrófago alveolar últimamente se le ha agregado un papel como célula efectora.⁴⁵

El macrófago puede modular la actividad de otras respuestas inflamatorias e inmunes a través de la presentación del antígeno a los linfocitos T y la consecuente

liberación de citocinas. Estas acciones efectoras pueden resumirse diciendo que el macrófago produce una gran variedad de sustancias (más de 60) las cuales incluyen fracciones del complemento, factores quimiotácticos que promueven el movimiento de los PMN y quimiotaxis de linfocitos, factores activadores de plaquetas, factores de crecimiento para fibroblastos y leucotrienos provenientes del mecanismo de la lipooxigenasa y productos del metabolismo del ácido araquidónico.⁴⁵

Por lo tanto, es posible que el macrófago alveolar posea doble función: en la fagocitosis y como célula inmune efectora. Los macrófagos son de vida prolongada (meses o años) y pueden responder a diferentes tipos de antígenos que son ingeridos y degradados de forma intracelular, en contraste con los PMN, que son de vida corta.⁴⁵

I.4 Factores predisponentes para la Mannheimiosis Neumónica

I.4.1 Estrés

El estrés es una condición intrínseca que se presenta en el hombre y en los animales y que aumenta la susceptibilidad a diversos tipos de enfermedades infecciosas. Sin embargo, el efecto de la tensión es más evidente con infecciones del tracto respiratorio como es el caso de la Mannheimiosis. El estrés puede ser psicológico inducido por el miedo y el confinamiento, o por factores físicos como hambre, sed, cansancio, o temperaturas ambientales extremas.⁴⁶

La tensión no se puede medir en un animal, sin embargo, parámetros tales como la temperatura corporal elevada, el aumento de la frecuencia cardiaca, la disminución del peso corporal y el aumento de los niveles de cortisol en plasma, y de glucosa, ácidos grasos libres y urea, se consideran en general como indicadores útiles. La reacción de los animales es bastante variable, incluso dentro de los de la misma especie. El papel del estrés en la incidencia natural de la Mannheimiosis es claramente evidente, por el hecho de que la aparición de la enfermedad se asocia principalmente con la exposición repentina a situaciones de estrés creadas por las condiciones físicas adversas, ambientales o climáticas. Los ejemplos más comunes de estos últimos incluyen un clima demasiado caliente o frío con altos niveles de humedad, el hacinamiento en un espacio limitado, la mala ventilación, el manejo brusco y el

transporte distante. El transporte es el principal factor predisponente reconocible comúnmente asociado a los brotes de campo en el ganado. ⁴⁶

Otras situaciones estresantes han sido reportadas, como exceso de polvo en corrales de engorda, alta carga de parásitos internos o externos y mezcla de animales de distinta procedencia. ⁴⁷

Los factores predisponentes pueden actuar solos o en combinación y su importante papel en el establecimiento de la enfermedad ha sido demostrado repetidamente por medios experimentales en ovejas y cabras. El estrés también puede inducirse artificialmente por administración de ciertos fármacos y compuestos químicos (por ejemplo, dexametasona). Se ha reportado que el efecto del estrés inducido químicamente en la Mannheimiosis es similar a la obtenida en circunstancias naturales. La razón para el aumento en la susceptibilidad a Mannheimiosis en animales estresados se atribuyó principalmente a la ruptura de las barreras inmunitarias innatas pulmonares. ⁴⁷

I.4.2 Interacción virus-bacteria

El efecto de la primoinfección viral en el hospedero afecta directamente la eliminación de moco con microorganismos patógenos realizada por el aparato mucociliar. Una vez deprimidos los mecanismos de defensa, las bacterias presentes en la flora nasal o en el medio ambiente fácilmente colonizan el pulmón. Las infecciones mixtas virales y bacterianas se presentan frecuentemente como resultado del llamado sinergismo virus-bacteria. Las lesiones inducidas por los virus al epitelio respiratorio incluyen el aumento de colonización bacteriana en el tejido pulmonar. La función fagocítica de los macrófagos alveolares se altera por la infección viral de los mismos. Por consiguiente, los macrófagos infectados pierden su capacidad fagocítica y fallan en liberar factores quimiotácticos para otras células. ⁴⁸

M. haemolytica es en sí la principal especie bacteriana responsable del daño pulmonar. Sin embargo, eventualmente pueden identificarse algunas evidencias de participación viral en la lesión. Una infección previa o combinada con ciertos virus respiratorios aumenta la sensibilidad de los ovinos y bovinos a neumonías bacterianas

secundarias; algunos ejemplos de los virus más importantes asociados a las infecciones de vías respiratorias agudas incluyen: Virus de Parainfluenza 3 (PI- 3), Herpes Virus Bovino tipo 1 (BHV-1), Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB), Adenovirus (ADV) y Reovirus. La mayoría de estos virus aumentan la sensibilidad hacia el desarrollo de neumonía bacteriana secundaria causada principalmente por *M. haemolytica* en animales susceptibles. ⁴⁸

La participación viral corresponde a la formación de cuerpos de inclusión que se presentan en el citoplasma de las células del epitelio bronquial y bronquiolar, así como en macrófagos, lo que resulta compatible con infecciones por Adenovirus. Además, en estos casos también se aprecia a nivel alveolar la coalescencia de células del epitelio o de macrófagos, a los que se les denomina sincitios, muy posiblemente asociados a VRSB o PI-3. Los agentes virales como el Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (BHV-1), PI-3, Diarrea Viral Bovina (DVB) y el VRSB, además de causar un efecto citopático directo en el aparato respiratorio, reducen la remoción bacteriana y la capacidad fagocítica del macrófago alveolar, con lo cual se facilita la colonización pulmonar por *Mannheimia*. ⁴⁸

Además, la infección experimental con Adenovirus-Ovino-6 seguido por una infección por *M. haemolytica*, induce lesiones más severas en corderos que aquellas lesiones producidas sin infección virus-bacteria. La inoculación combinada en corderos con el virus y la bacteria causa neumonía fibrinopurulenta con edema, necrosis multifocal y pleuritis. ⁴⁸

I.4.3. *Mycoplasma* y otros microorganismos

El efecto nocivo de ciertas especies de *Mycoplasma* en el sistema respiratorio de los animales rumiantes ha sido reconocido. Los ejemplos más importantes de estos patógenos incluyen *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. bovis*, *M. ovipneumoniae* y *M. dispar*. La mayoría de estas especies de *Mycoplasma* son conocidos por contribuir a la aparición de graves lesiones neumónicas, ya sea solos o en asociación con Mannheimiosis. ⁴⁹

El papel sinérgico de algunos otros organismos bacterianos en esta conexión también es evidente. Por ejemplo, se encontró que *Bordetella parapertussis* aumenta secundariamente la susceptibilidad a la neumonía por *M. haemolytica* A2 en ratones y en ovejas. Se han aislado frecuentemente de pulmones neumónicos de ganado vacuno, ovino y caprino un gran número de otras diferentes especies de bacterias, tales como *Pasteurella multocida*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Histophilus somni* y *Chlamydia spp.*; en todos los casos las lesiones primarias se atribuyen principalmente a infecciones por *M. haemolytica*.⁵⁰

I.5 Signología clínica

En algunos casos los signos clínicos no se manifiestan y el animal aparece muerto. Los signos clínicos de la forma aguda de la Mannheimiosis son apatía, anorexia, pirexia superior a 40.6 °C y varios grados de hiperpnea y disnea. No se aprecian claramente los sonidos normales en la auscultación, y los sonidos respiratorios son bajos y prolongados. Frecuentemente se observan descargas serosas nasal y ocular, y es frecuente encontrar en estados terminales salida de fluido espumoso por la boca. En casos subagudos o crónicos los signos clínicos pueden ser transitorios y menos evidentes que en la enfermedad aguda.¹³

Los periodos de incubación reportados son muy variables fluctuando desde 2 hasta 14 días después de llegar a la explotación, o después de la presentación del agente estresante. Los animales afectados severamente, por lo general mueren en los primeros 25 días del arribo a la explotación; o bien, pueden recuperarse en una semana, o bien desarrollar un proceso crónico. Aunque la signología varía según el grado de enfermedad, probablemente debido a los diferentes virus que pueden estar involucrados y a las condiciones de manejo. Una vez que *M. haemolytica* coloniza al pulmón e inicia la infección, el proceso neumónico se acelera, los signos clínicos se exacerban y los casos de mortalidad principian.²¹

I.6 Patogenia de la Mannheimiosis

En la patogénesis de la Mannheimiosis existen múltiples interacciones hospedero-bacteria, que se inician con la inhalación del agente, la colonización nasofaríngea, la llegada al alvéolo, la respuesta a la colonización y por último culmina con la evasión bacteriana a las defensas del hospedero.²⁸

Actualmente, la patogénesis de la enfermedad es poco clara, ya que los mecanismos que permiten a la bacteria establecerse y diseminarse durante una infección no están completamente estudiados. Varios componentes asociados a la pared celular como el lipopolisacárido (LPS), algunas proteínas de membrana externa (PME), el material capsular, la leucotoxina (LKT), entre otros factores de virulencia involucrados en la colonización, así como los mencionados anteriormente relacionados con el hospedero y su medio ambiente, pueden contribuir a la presentación de la enfermedad.²⁸

I.7 Factores de virulencia de *Mannheimia haemolytica*

M. haemolytica produce varias proteínas y polisacáridos que son importantes para su virulencia. Estos factores han sido identificados inmunológicamente y caracterizados bioquímicamente a partir de productos genéticos de *M. haemolytica*, con un énfasis en el análisis de moléculas secretadas en su superficie.⁴

En las cepas de *M. haemolytica* que afectan a los rumiantes se han identificado diversos mecanismos de expresión de factores de patogenicidad a través de potentes antígenos, los cuales incluyen: La LKT con actividad específica contra leucocitos; el LPS, las PME, algunas proteínas reguladas por hierro (PRH), fimbrias, enzimas (neuraminidasa, proteasas, metaloglicoproteasas), antígenos aglutinantes serotipo-específico y adhesinas; además de la cápsula y plásmidos de resistencia a antibióticos.^{2, 51 - 55} Todos estos mecanismos juegan un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, solo la LKT es considerada como el factor de patogenicidad primario más importante.^{17, 53 - 56}

I.7.1 Cápsula

La cápsula de *M. haemolytica* A2 fue identificada como una estructura básica de polisacárido producido durante la fase logarítmica de crecimiento, y se puede visualizar en organismos crecidos *in vitro* e *in vivo*.⁵⁷ Se compone de ácido siálico, o colomínico y es idéntica a la cápsula de polisacáridos de *Neisseria meningitidis* y *Escherichia coli*.⁵⁸ Este polisacárido no es inmunogénico ya que el ácido siálico es un componente normal encontrado en las membranas del hospedero.⁵⁹

Los polisacáridos capsulares se han implicado en la patogénesis de la Mannheimiosis, denominándolos indispensables factores de virulencia, participando en la adherencia, prevención de la deshidratación y resistencia a la respuesta inmune del hospedero.⁶⁰⁻⁶² La cápsula afecta negativa y severamente la interacción entre este microorganismo y los macrófagos alveolares. Además, está reportado que el material capsular puede interactuar con la sustancia surfactante pulmonar, de tal modo que facilita la adherencia local de los organismos en las diferentes células del hospedero.⁵⁷

La expresión genómica capsular en *M. haemolytica* no ha recibido mucha atención, aunque un estudio ha indicado que las actividades enzimáticas involucradas en la biosíntesis capsular de ácido siálico están intensamente inhibidas a 42 °C en el serotipo A2.⁶³

I.7.2 Adhesina

Se sabe de manera general que las bacterias se pueden adherir a las superficies epiteliales a través de receptores específicos, de tal manera que los factores bacterianos involucrados en la interacción bacteria-célula son muy diversos. Entre algunas de las estructuras bacterianas que pudieran participar en la adherencia se reconocen las fimbrias, las adhesinas no fimbriales, las adhesinas proteínicas, el glicocálix, el LPS, algunas PME y la cápsula.⁶⁴ Se sabe que existen dos tipos de fimbrias en *M. haemolytica*, unas largas y rígidas de 12 nm de longitud, y otras cortas y flexibles de 5 nm, las cuales han sido evidenciadas especialmente cuando las bacterias fueron recuperadas de lavados traqueales de becerros infectados, experimental o naturalmente.⁵⁷

El papel funcional de las adhesinas de *M. haemolytica* en la patogénesis debe ser estudiado con más detalle, no obstante es muy posible que estas adhesinas participen en un proceso secuencial de reconocimiento de la célula hospedera, que precede a la liberación de exoproteínas con actividad catalítica, como la endopeptidasa o neuraminidasa, o ambas.⁶⁵

Jaramillo y col. (2000) lograron la purificación por afinidad de una adhesina de 68 kDa que fue capaz de aglutinar específicamente eritrocitos de conejo, concluyendo que las adhesinas de *M. haemolytica* juegan un importante papel en la infección.⁶⁵

I.7.3 Proteínas de Membrana Externa (PME)

Los resultados de diversos estudios resaltan que las PME de *M. haemolytica* constituyen algunos de los más importantes antígenos para la estimulación de la respuesta inmune en contra de la Mannheimiosis. Se ha podido comprobar una correlación estadísticamente significativa entre la resistencia a la enfermedad y la presencia de anticuerpos séricos dirigidos contra una gran cantidad de proteínas presentes en extractos salinos de la célula bacteriana íntegra.⁶⁶⁻⁶⁸

Las PME de las bacterias Gram negativas tienen un importante papel en el proceso de infección. Algunas PME tienen función de porinas que permiten el paso de sustancias a través de la membrana externa, mientras que la fosfolipasa A, una PME de las bacterias Gram negativas, es esencial en ciertos patógenos para la invasión a las células del hospedero. Otras PME pueden actuar como receptores de alta afinidad para obtener hierro del hospedero.⁶⁹

Una bacteria en diferentes condiciones expresa diferentes fenotipos para adaptarse al nuevo medio. Cultivada en ausencia de hierro, la bacteria expresa en su superficie proteínas especialmente dedicadas a captarlo. Estas proteínas han recibido mucho interés por parte de diversos grupos de investigación. Sin embargo, actualmente no se conoce mucho acerca de éstas y de sus mecanismos de patogenicidad, aunque inmunológicamente tienen un importante significado en la inmunidad protectora contra la Mannheimiosis neumónica causada por el serotipo A2.

⁷⁰ Se sabe además que las PME aisladas de *M. haemolytica* inducen alteraciones en la actividad biológica de los leucocitos PMN. ⁷¹

I.7.4 Lipopolisacárido (LPS)

La endotoxina bacteriana o LPS, es mencionada como un factor potencial de daño vascular. ⁷² El LPS está formado por glucolípidos que se encuentran sobre la superficie bacteriana de las bacterias Gram negativas; a su vez estos glucolípidos son componentes de la membrana externa. La porción lipídica es también llamada Lípido A, mitad que le confiere endotoxicidad hacia el LPS, significando un reconocimiento por el receptor Toll-like 4/CD14/MD-2, complejo encontrado en algunas células hospederas. El lípido A es un componente lipídico abundante de la membrana externa y es responsable de la actividad biológica de la endotoxina, tal como la inducción de citocinas e inflamación. ⁷³

El LPS tiene un importante papel en la colonización y capacidad de diseminación sistémica de la enfermedad. Contribuye a inducir el proceso inflamatorio, por lo tanto la bacteria es protegida contra los mecanismos de defensa del hospedero y esto la hace más resistente a la fagocitosis y al complemento. ⁷⁴

Se ha demostrado que el LPS es directamente citotóxico hacia las células endoteliales bovinas. Causa apoptosis de las mismas en pulmón, disminuyendo la unión intercelular. Estos cambios dan como resultado la extravasación de productos vasculares al intersticio durante el desarrollo de la enfermedad. No daña directamente al epitelio pulmonar, pero McClenahan y col. en el 2008, demostraron que en presencia de neutrófilos, el LPS causa una disminución de la unión intercelular epitelial, provocando así la salida de exudado inflamatorio al intersticio. ⁷⁵

I.7.5 Leucotoxina (LKT)

La LKT es una proteína de 104 kDa que pertenece a la familia de toxinas RTX, llamadas así debido a las características en común de repeticiones de secuencias ricas en glicina dentro de la proteína. ²⁶ La LKT se considera el principal factor de virulencia de *M. haemolytica*. Es una toxina dependiente de calcio. En general, estas toxinas

tienen como célula blanco principalmente a los leucocitos, por lo que pueden llegar a destruir neutrófilos, macrófagos alveolares y linfocitos. La LKT se une a leucocitos y, a bajas concentraciones, induce su apoptosis por la vía intrínseca, mientras que a una concentración elevada genera la aparición de poros transmembranales y la necrosis celular.^{76,77}

La mitad de la cadena N-terminal de la toxina consiste en cuatro dominios hidrofóbicos, que se cree están implicados en esta formación de poros en la membrana de las células blanco. Así mismo, un tercio de la cadena C-terminal de la toxina contiene un número de repeticiones de nanopéptidos ricos en glicina, este dominio está involucrado en el acarreamiento de Ca^{2+} que es necesario para la actividad biológica de la toxina. Un dominio compuesto por aproximadamente 50-60 aminoácidos del extremo C-terminal también está involucrado en el transporte de la toxina a través de la envoltura bacteriana (cápsula).⁷⁸

La LKT puede provocar una respuesta inflamatoria, causando la formación de un intenso edema y necrosis pulmonar.⁴ A pesar de la importancia de la LKT, si en determinado momento se produjera en forma defectuosa o disfuncional, sólo atenuaría parcialmente la enfermedad, sugiriendo así que hay otros factores de virulencia que son importantes en el desarrollo de la patogénesis de la enfermedad.³⁴

McClenahan y col. en el 2008, asumieron que la LKT de *M. haemolytica* no daña directamente el endotelio y las células epiteliales del pulmón, adjudicando esto en parte a la carencia de expresión de receptores CD11a/CD18. Por lo tanto, es probable que en combinación con el LPS y los neutrófilos, en la patogénesis pulmonar la LKT pueda favorecer la extensa salida de productos vasculares en conductos aéreos, tan comúnmente asociada con esta enfermedad.⁷⁹

I.7.6 Proteasas de secreción

Las enzimas proteolíticas o proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis específica de uno o varios enlaces peptídicos dentro de una proteína, por lo que son también llamadas peptidasas. Las proteasas intervienen en las funciones orgánicas de todos los seres vivos (virus, bacterias, arqueas, protozoos, metazoos, hongos, plantas y

animales). En el metabolismo, las enzimas proteolíticas intervienen en procesos como crecimiento, diferenciación celular, recambio de proteínas, maduración de enzimas y hormonas, coagulación de la sangre y lisis de coágulos de fibrina; también poseen un papel importante en la secreción de compuestos a través de las membranas celulares, entre otros más.^{80, 81}

Por mucho tiempo la función de las proteasas fue adjudicada únicamente a la hidrólisis o digestión de proteínas como una fuente de alimento. Cada vez, se hace más claro que la hidrólisis de un enlace peptídico de una proteína puede tener una amplia gama de funciones biológicas que pueden ser muy sutiles y específicas.⁸²

Las proteasas pueden dividirse en 6 diferentes tipos catalíticos: aspartato-proteasas, metalo-proteasas, serín-proteasas, cisteín-proteasas, treonín-proteasas y glutamato-proteasas, según los residuos activos que están implicados en la catálisis. Las aspartato-, metalo- y serín-proteasas son definitivamente los grupos de proteasas más abundantes.⁸²

Las proteasas microbianas pueden causar diferentes efectos patológicos, como destrucción de tejidos, inactivación de inmunoglobulinas y factores del complemento y promover la liberación de factores quimiotácticos de inflamación.⁸³

La mayoría de los miembros de la familia *Pasteurellaceae* producen y secretan proteasas que degradan inmunoglobulinas al medio extracelular. La enzima más estudiada de este tipo es la proteasa que corta IgA1, producida por *Haemophilus influenzae*.⁸⁴ Dicha proteasa es una enzima bacteriana extracelular perteneciente a la familia de las serín-proteasas, teniendo como blanco a la IgA1 humana, la cual es una clase de inmunoglobulina predominante en las superficies de las mucosas del ser humano y de los animales. Por lo tanto, la producción de esta proteasa le da la capacidad a la bacteria de invadir e infectar las mucosas.⁸⁵

Se ha reportado que otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* son capaces de secretar proteasas. Sin embargo, no han sido del todo caracterizadas. Aislamientos de cepas de *P. multocida* producen proteasas que se anclan en IgA1, IgA2 e IgG humana.⁸⁶

Actinobacillus pleuropneumoniae libera al medio de cultivo metaloproteasas que hidrolizan IgA e IgG porcina.⁸⁷ *Actinobacillus suis* secreta una metaloproteasa que degrada IgG teniendo como blanco a la IgG porcina y bovina.⁸⁸

Avibacterium paragallinarum, agente causal de la coriza infecciosa, secreta metaloproteasas que degradan IgG de ave.⁸⁹

La mayoría de los serotipos de *M. haemolytica* secretan una neuraminidasa y una sialoglicoproteasa.²

1.7.6.1 Neuraminidasa

Hirst, en 1941; describió por primera vez la actividad de sialidasa mientras estudiaba la hemoaglutinación en presencia del virus de la influenza.⁹⁰ Posteriormente, Burnet y col. en 1946 identificaron una sialidasa bacteriana como enzima destructora de receptores celulares.⁹¹ Los términos “sialidasa” y “neuraminidasa” fueron propuestos por Heimer y Meyer en 1956 y Gottschalk en 1957, respectivamente.^{92, 93} El término “sialidasa” fue incluido en la nomenclatura IUB (Unión Internacional de Bioquímica) en el primer informe de la Comisión de Enzimas en 1961, con el nombre de “neuraminidasa”. Cabezas y col. en 1983 propusieron el término “sialidasa” para las enzimas de eucariontes y el término “neuraminidasa” para las enzimas de procariontes.⁹⁴

Las neuraminidasas se encuentran frecuentemente en bacterias que tienen contacto estrecho con un hospedero animal, donde la enzima sirve como factor de colonización y virulencia,⁹⁵ además de posibilitar la utilización de los ácidos siálicos como fuente de carbono y energía. Han sido detectadas en especies de *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Pasteurella*, además de *Bacteroides fragilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica serovar* Typhimurium, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Bifidobacterium bifidus*, *Haemophilus parasuis* y *Actinomyces pyogenes*.⁹⁶

Algunas neuraminidasas son secretadas como proteínas solubles, en cambio, otras están asociadas a fracciones de membrana, como la neuraminidasa de *H. parasuis*.⁹⁷

En algunas bacterias se han identificado varias neuraminidasas, por ejemplo, *Clostridium perfringens* tiene dos neuraminidasas, una de las cuales tiene un peso molecular de 71 kDa y es secretada, y la otra de 43 kDa permanece en la célula.⁹⁸

Straus y col. En 1993 reportaron que todos los serotipos de *M. haemolytica* producen neuraminidasa, excepto el serotipo 11. Los pesos moleculares de dicha enzima varían entre los diferentes serotipos y comprenden moléculas de 150 a 200 kDa, que presentan especificidad hacia substratos similares como: *N*-acetilneuraminil-lactosa, fetuina y ácido colomínico, y son menos activas hacia la mucina submaxilar bovina. El papel sugerido para la enzima es la remoción de ácido siálico de las glicoproteínas de la superficie celular o del moco, facilitando la adherencia de dichos microorganismos.^{99, 100}

M. haemolytica A2 produce una neuraminidasa con un peso molecular aproximado de 200 kDa.⁹⁹

I.8.2 Sialoglicoproteasa

Todos los serotipos de *M. haemolytica* producen una metaloglicoproteasa dependiente de zinc con un peso molecular de 35 kDa, que tiene actividad contra O-sialoglicoproteínas.^{101, 102} En *M. haemolytica* A1 destaca una O-sialoglicoproteasa (Gcp), clasificada como una metaloproteasa neutra, con actividad de endopeptidasa y neuraminidasa, que tiene la capacidad de fraccionar glicoproteína A tipo mucina en diferentes sitios.^{65, 103 - 107}

La presencia de anticuerpos (IgG1 e IgG2) contra la Gcp se pudo comprobar mediante el uso de sobrenadante (SN) de cultivo de *M. haemolytica* A1 en fase de crecimiento logarítmico, rico en la enzima proteolítica específica (Gcp). Con dicho SN se vacunaron becerros y posteriormente se desafiaron con la cepa virulenta. En muchos de los sueros recuperados a partir de estos animales, se comprobó que

contenían IgG1 e IgG2 contra *M. haemolytica* A1. Aquellos animales que presentaron anticuerpos anti-Gcp, a la necropsia se observó que desarrollaron una neumonía más leve; estos resultados demostraron que la Gcp es inmunogénica y la bacteria produce dicha enzima *in vivo*.¹⁰⁴ El suero de bovinos convalecientes presentó actividad anti-Gcp, lo cual sugiere que esta proteína es inmunogénica en los animales.¹⁰⁸ Las moléculas que actúan como blanco para la Gcp aún no han sido bien definidas, pero probablemente son sialoglicoproteínas presentes en la superficie de las células de la mucosa del tracto respiratorio y de macrófagos alveolares, neutrófilos alveolares y otros leucocitos.¹⁰⁸

La actividad de la Gcp en condiciones *in vitro*, puede ser potenciada por la co-incubación con la LKT. Una consecuencia de esta actividad es la agregación de plaquetas, que lleva a su deposición en los alvéolos pulmonares.¹⁰⁷ La Gcp también rompe la glicosilación de las glicoproteínas CD34, CD43, CD44 y CD45, generando epítopes reactivos que generan daño en las células.¹⁰⁹

No obstante, el papel de las O-sialoglicoproteasas en la patogénesis no ha sido demostrado convincentemente. Las O-sialoglicoproteasas pueden interferir con la respuesta inmune del hospedero por rompimiento de IgG séricas, o quizá contribuyan en la colonización bacteriana.^{108, 110}

I.8 Microvesículas (MVs)

La secreción de los factores de virulencia de los patógenos Gram-negativos es complicada, por el hecho de que la envoltura bacteriana consiste en dos bicapas de lípidos que corresponden a la membrana externa y la membrana interna, y el periplasma y el péptidoglicano o pared celular entre ellas.¹¹¹

Los patógenos Gram-negativos han desarrollado estrategias, algunas específicas de cada patógeno, capaces de permitir la activación de los diversos factores de virulencia los cuales ganan acceso al espacio extracelular, principalmente a tejidos o corriente sanguínea del organismo hospedero.¹¹¹

La secreción de moléculas tales como proteínas o ácidos nucleicos es un aspecto de la fisiología de los microorganismos, ya que sirve a la bacteria para llevar a cabo procesos biológicos importantes, tales como: adhesión e invasión de tejidos, transferencia de información genética, comunicación intercelular bacteria-bacteria y bacteria-hospedero, así como la obtención de nutrientes esenciales.¹¹²

La secreción de proteínas en bacterias es un área de investigación que ha sido extensamente estudiada en las últimas dos décadas. La mayor parte del trabajo se ha desarrollado en las bacterias Gram-negativas, en las que las proteínas a translocarse tienen que atravesar las dos barreras lipídicas mencionadas. La membrana externa es una bicapa asimétrica cuya cara exterior está compuesta principalmente por lipopolisacáridos.^{113 - 115}

Hasta el momento, se han descrito seis sistemas distintos que utilizan las bacterias Gram-negativas para la secreción de productos bacterianos, clasificados en tipo I, II, III, IV, V (autotransportadores) y tipo VI.¹¹⁶ Sin embargo, estos grupos se pueden aún subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática: las vías Sec-dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal; y las Sec-independientes, en las que los substratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal.^{112, 113}

Otro sistema de secreción de diversos productos que se ha estado investigando en los últimos años y al cual se le ha conferido una gran importancia, es por medio de la formación y liberación de microvesículas de membrana externa.¹¹⁷ Este es un proceso que ha sido observado sólo en bacterias Gram-negativas. Este mecanismo de secreción fue descrito inicialmente por Devoe en 1973, cuando observó que el meningococo liberaba vesículas durante su crecimiento *in vitro*.¹¹⁸

Las MVs son partículas esféricas de un tamaño heterogéneo (10 a 300 nm de diámetro) liberadas por bacterias Gram-negativas durante cualquier fase de

crecimiento. ^{119, 120} Se liberan al medio de cultivo sólido o líquido. ¹²¹ Morfológicamente, las MVs se caracterizan por ser estructuras membranosas y principalmente de forma esférica. Se ha comprobado que dichas estructuras pueden llegar a coalescer entre sí. ¹²² (Fig. 1)

Cuando la bacteria es crecida en condiciones estresantes, es común observar que la cantidad de MVs que se están liberando aumenta considerablemente, y su tamaño varía con respecto a las liberadas por bacterias que son crecidas en condiciones normales. ¹²³ Por ejemplo, los antibióticos aminoglucósidos perturban la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, lo que ocasiona que se incremente de tres a cinco veces la cantidad de MVs y que el tamaño de ellas aumente de 50 nm (que es el tamaño de las MVs en cultivos bacterianos en condiciones normales) hasta 200 nm. ¹²⁴ (Fig. 2).

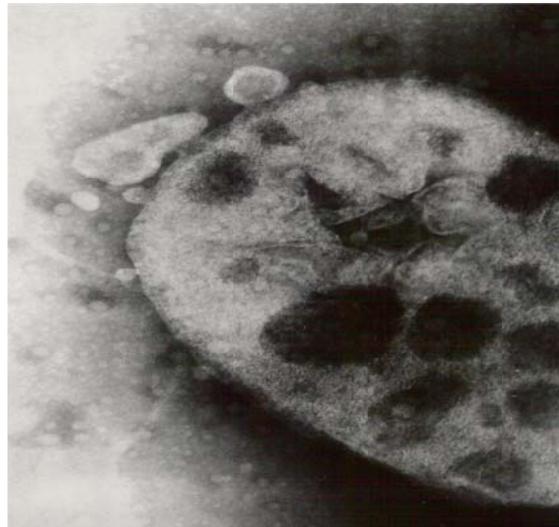


Figura 1. Bacteria *M. haemolytica* liberando múltiples estructuras esféricas (MV) de aproximadamente 100 nm de diámetro. Estas estructuras tienden a coalescer para formar estructuras más grandes. ¹²² Tomado de: **Journal of Animal and Veterinary Advance 6 1172-1182.**

En general, las MVs reflejan la composición de la membrana externa, conteniendo LPS, glicerofosfolípidos, y PME, así como componentes periplásmicos ¹²⁴ (Fig. 3)

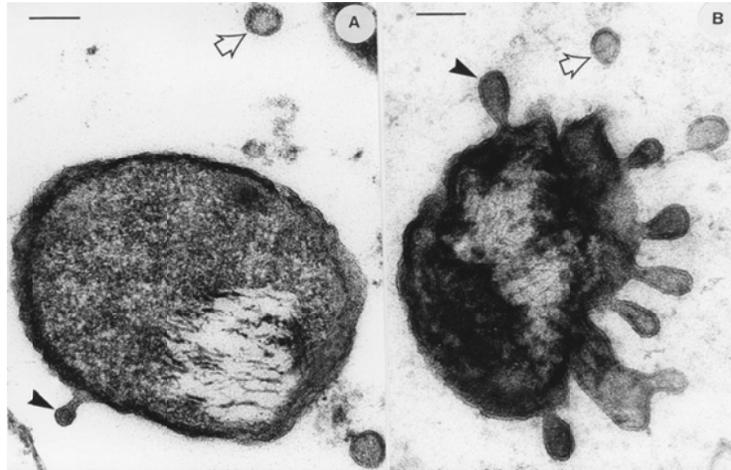


Figura 2. Secciones finas de *Pseudomonas aeruginosa*. Células H103 que muestran la formación de vesículas (puntas de flecha negras) y MVs libres en medio de cultivo (flechas abiertas). (A) Control, (B) Células expuestas a cuatro veces más la concentración mínima inhibitoria de gentamicina. Un número mayor de MVs se forma a partir de la superficie celular de las bacterias expuestas a gentamicina que de las células no tratadas.¹²⁴ Tomado de: J. Bacteriol. 177: 3998-4008.

Es importante destacar que las MVs no son un producto de la muerte bacteriana, ya que contienen proteínas recién sintetizadas y se producen sin lisis celular.¹²⁵

Un mecanismo exacto por medio del cual se explique la formación y liberación de las MVs no ha sido confirmado, hasta la fecha existen diferentes teorías que tratan de dar explicación a este proceso. Estudios con microscopía electrónica revelan que las MVs se forman a partir de una protuberancia de la membrana externa y una posterior fusión.¹²⁶ Kadurugamuwa y Beveridge en 1997 sugirieron que la formación de MVs inicia con una prominencia de la membrana externa, y, conforme se va expandiendo en tamaño, el periplasma y todo su contenido se introduce en la MVs. La formación se completa cuando la vesícula se libera de la membrana hacia el medio externo.¹²³

Zhou y col. En 1998 han señalado que la formación de MVs es una consecuencia de que las bacterias Gram-negativas realizan una “reorganización” de la pared celular (recambio). Esta reorganización es definida como la escisión de fragmentos de

péptidoglicano de la pared celular preexistente. Estos productos, que usualmente se encuentran en forma de péptidos murámicos de bajo peso molecular, no pueden penetrar la membrana externa y se sugiere que ejercen una presión de turgencia en la membrana externa, ocasionando que ésta se empuje y se forme una ampolla, la cual posteriormente se liberará y constituirá la microvesícula.¹²¹

Tanto los patógenos como los no patógenos Gram-negativos liberan MVs incluyendo *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Neisseria spp.*, *Bacteroides (Porphyromonas) spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio spp.*, *Salmonella spp.*, *Brucella melitensis*, *Campylobacter jejuni*, *Actinobacillus seminis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.¹²²

Se ha descrito la presencia de una gran cantidad de factores de virulencia que incluyen proteasas, fosfolipasa C, péptidoglicano-hidrolasas y pro-elastasa en el interior de MVs liberadas por *P. aeruginosa*, crecida sin condiciones estresantes.¹²⁴

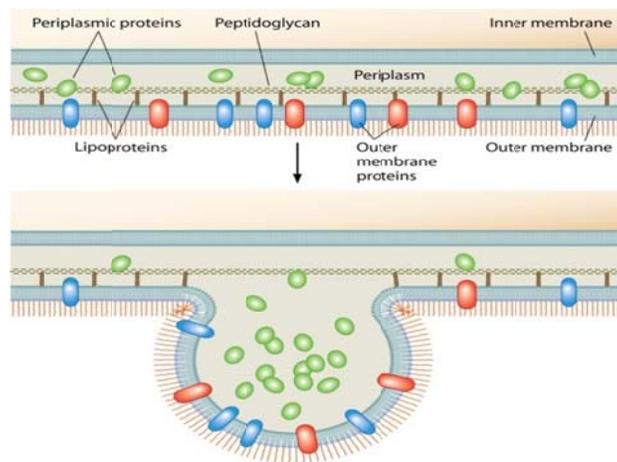


Figura 3. Modelo de producción de las MVs. Se muestra el plegamiento de la membrana externa en bacterias Gram-negativas, liberando MVs que contienen material periplásmico, proteínas de membrana externa y lípidos, incluyendo Patrones moleculares asociados a patógenos y otros factores de virulencia. Aunque los detalles del mecanismo siguen sin estar claros, se cree que la formación de MVs ocurre en lugares donde los vínculos entre la lipoproteína de la membrana externa y el péptidoglicano están rotos o desaparecidos.¹²⁴

Tomado de: MICROBIOL MOL BIOL REV, 74: 81–94 2010

Li y col. en 1998 identificaron péptidoglicano-hidrolasas en MVs liberadas por diferentes bacterias, las cuales fueron capaces de lisar otras bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Estos investigadores propusieron que las enzimas presentes en las MVs podrían ayudarles a estas bacterias a obtener nutrientes e incrementar el espacio disponible, facilitando su colonización.¹²⁷

Porphyromonas gingivalis es una bacteria causante de enfermedades periodontales, que participa en la formación de la placa dentobacteriana, un complejo multibacteriano (biofilm) que favorece el desarrollo de caries y gingivitis. Esta bacteria o sus MVs, pueden mediar la adhesión de bacterias que originalmente no pueden adherirse, facilitando o promoviendo la formación de esta placa.¹²⁸

Nuestro grupo de investigación describió que *A. pleuropneumoniae* secreta proteasas que están implicadas en la patogénesis de la pleuroneumonía contagiosa porcina. Estas proteasas degradan IgA, IgG, y hemoglobina porcinas.⁸⁷ También se ha purificado y caracterizado una metaloproteasa de 200 kDa, que es un antígeno común en todos los serotipos. Esta proteasa se pudo observar en MVs de esta bacteria y alrededor de ella.¹²⁹

I.9 Interacción y respuesta inmune de las MVs con el hospedero

La unión de MVs a células del hospedero ha sido observada para una gran variedad de patógenos. Proteasas y toxinas contenidas en MVs de *E. coli*, *Shigella*, *Actinobacillus* y *Borrelia*, interactúan con células bacterianas así como de mamíferos.^{130 - 132} Las MVs se adhieren a las células del hospedero no sólo en cultivo de tejidos, sino también en el complejo entorno de un tejido del hospedero infectado. Por ejemplo, las MVs de *Helicobacter pylori* se unen a las células intestinales, en las muestras de biopsia de pacientes infectados.^{133, 134} Las MVs de *Bacteroides fragilis* tienen actividad hemoaglutinante, lo que indica que son capaces de actuar como enlace entre las células de mamíferos.¹³⁵

El Tropismo hacia la célula hospedera depende de factores bacterianos específicos de cada cepa. Las MVs y las bacterias de donde derivan pueden utilizar idénticos receptores de la célula hospedera. Las MVs de *Borrelia burgdorferi* se

adhieren a las células endoteliales de la vena umbilical en seres humanos, de manera que compiten con células completas de *Borrelia*.¹³⁶ La entrada de las MVs hacia las células hospederas se ha observado en muchos casos, ya que después de adherirse, las MVs pueden ser internalizadas. Las toxinas pueden actuar como adhesinas de las MVs, esto permite que éstas puedan endocitarse vía receptor, mecanismo también usado por la toxina soluble.¹³⁶

Se han investigado otros ejemplos de adherencia de MVs mediada por toxina. Por ejemplo, la toxina VacA de *H. pylori* es absorbida por células epiteliales gástricas tanto como una toxina libre como una toxina asociada a MVs.^{137, 138} Hasta el momento, no se sabe si VacA es el ligando adhesina/entrada para las MVs. Los componentes comunes de las MVs tales como las PME podrían contribuir también a la entrada de las MVs a la célula hospederas. No todas las toxinas presentes en las MVs son necesarias para la adhesión eficaz. En MVs derivadas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, se ha visto que mientras más enriquecidas estén con leucotoxina, no es un factor importante la interacción MVs-células.¹³⁹

La evidencia experimental de varios estudios apoya la hipótesis de que ciertas MVs pueden fusionarse con las membranas plasmáticas de células del hospedero.¹⁴⁰ Las MVs de *Legionella pneumophila*, se etiquetaron con un material fluorescente, observándose el color en la superficie de las células epiteliales alveolares, lo que sugiere que son altamente adherentes o que se pudieron fusionar. Si bien estos datos bioquímicos y visuales son convincentes, aún falta un gran número de pruebas biofísicas y definitivas para aseverar este mecanismo de fusión MVs-membrana celular.¹⁴¹

La composición de las MVs hace posible que actúen como importantes activadores de la respuesta inmune innata y la adquirida. Además del LPS, que actúa como un potente inmunomodulador, las MVs contienen porinas y otros importantes ligandos que despiertan la respuesta inmune innata. Todos estos factores parecen actuar sinérgicamente para modular la respuesta del hospedero en formas que pueden estimular la invasión del patógeno y/o aumentar su virulencia. Además, las propiedades inmunogénicas de las MVs se han enfocado a respuestas protectoras en

las mucosas y anticuerpos sistémicos bactericidas que han sido explotados para fines vacunales.¹⁴¹

Las MVs son un factor clave para efectuar una respuesta inflamatoria hacia los agentes patógenos, estas pueden ser absorbidas por las células epiteliales y macrófagos para desencadenar una respuesta inmediata innata del huésped. La respuesta de las células epiteliales y macrófagos a los productos bacterianos secretados es como un disparador bien establecido hacia la cascada inflamatoria.¹⁴¹

La capacidad de las MVs para desencadenar una respuesta inflamatoria fue investigada a fondo en el 2007 por Alaniz y col. Su análisis demostró que las MVs de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium son potentes estimuladores de citocinas proinflamatorias y la activación de células inmunes. Las MVs de *Salmonella* activan a los macrófagos y a las células dendríticas para aumentar los niveles del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase II, así como la producción de mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa y la interleucina-12. También para activar a los linfocitos T-CD4, lo que indica que los componentes proteínicos antigénicos de las MVs son procesados eficazmente y estimulados por las células presentadoras de antígenos.¹⁴² En estudios basados sobre células epiteliales en respuesta a las MVs producidas por *H. pylori* se observó que son capaces de producir una potente IL-8,¹⁴³ al igual que las MVs de *P. aeruginosa* ocasionan una respuesta similar.¹⁴⁴

La composición proteica de las MVs puede variar sustancialmente con la cepa bacteriana de origen y con el medio ambiente. Proteínas de membrana externa tales como porinas, promueven actividades proinflamatorias causadas por una gran variedad de patógenos Gram-negativos, incluyendo *H. pylori*, *Salmonella*, *Fusobacterium*, y especies de *Yersinia*.^{145 - 148}

Ayalew y col. en el 2012 reportaron que en un análisis inmunoproteómico de las MVs de *M. haemolytica* A1 se lograron identificar y caracterizar 226 proteínas, de las cuales correspondían 28 a PME, 30 periplásmicas, 104 citoplasmáticas, 5 de membrana citoplásmica, 1 extracelular y 58 desconocidas.¹⁴⁹

Nuestro equipo de trabajo identificó y caracterizó MVs de *M. haemolytica* serotipo A1 y A2, encontrando los principales antígenos de la bacteria, tales como: LKT, LPS, PME y una fracción de DNA.¹²² LA LKT está biológicamente activa dentro de las MVs del serotipo A2, demostrado por el efecto citotóxico en células mononucleares sanguíneas de ovino.⁴⁸ De igual manera se demostró que la exposición de MVs de *M. haemolytica* A2, genera cambios morfológicos en linfocitos tisulares, y en macrófagos alveolares se desarrollaron características de activación. En células de tejido pulmonar se observó una destrucción de aproximadamente el 80% de éstas en cultivo celular. Las características observadas mediante microscopía electrónica, incluían: pérdida de la integridad de membranas nucleares y citoplasmáticas, ausencia de organelos, presencia de gran cantidad de vesículas en citoplasma y ausencia de núcleos en la mayoría de las células.¹⁵⁰

II. JUSTIFICACIÓN

M. haemolytica libera MVs que son secretadas de forma normal al medio en cualquier etapa de crecimiento de la bacteria y, bajo ciertas condiciones o en presencia de algunos antibióticos, se exagera su producción. Estas MVs guardan componentes de la superficie bacteriana, tales como proteínas, LPS, ácido murámico, cápsula y fimbrias, entre otros, además de contener en su interior proteínas en tránsito entre los diferentes compartimentos.¹²² En otros agentes causantes de enfermedad, se ha demostrado la importancia de las proteasas en la producción de daño a los tejidos a partir de células bacterianas completas.¹⁵¹ De tal modo que, obtener y caracterizar proteasas de secreción a partir de MVs de *M. haemolytica* A2, permitirá establecer su actividad proteolítica hacia los diferentes substratos a los que éstas se expongan. De esta manera, se evidenciará su efecto en presencia de un sistema biológico y se determinará el papel que juegan éstas en el proceso de colonización de la bacteria, formando nichos propios para la invasión al órgano blanco y distrayendo al sistema inmune. Así mismo, la identificación de proteasas en MVs de este género bacteriano, nos permitirá caracterizar aún más dichas estructuras como componente principal de un biológico vacunal en estudio.

III. HIPÓTESIS

Si las MVs de *M. haemolytica* A2 arrastran durante su proceso de formación una gran cantidad de factores de virulencia, los cuales participan directamente en la patogenia de la enfermedad, entonces es posible que dichas estructuras acarrean proteasas de secreción biológicamente activas, las cuales podrían ser liberadas en estas estructuras y ejercer un efecto directo sobre diferentes substratos.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar y caracterizar proteasas de secreción acarreadas en MVs de *M. haemolytica* A2.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinación de proteasas de secreción a partir de sobrenadante de cultivo de *M. haemolytica* A2.
- b) Obtención de MVs de *M. haemolytica* A2 a partir de sobrenadante de cultivo bacteriano filtrado y ultracentrifugado, estimulando el cultivo con un antibiótico de amplio espectro.
- c) Estandarización de la concentración de proteína y de la presencia de MVs de *M. haemolytica* A2.
- d) Realizar cinética de obtención de proteasas de secreción a partir de sobrenadantes de cultivo de *M. haemolytica* A2 de células completas.
- e) Realizar electroforesis en geles de substrato, para determinar la presencia y efecto de las proteasas a partir de sobrenadante y de MVs sobre dichos substratos.
- f) Caracterizar parcialmente proteasas acarreadas en MVs de *M. haemolytica* A2, utilizando diferentes factores como, temperatura, pH e inhibidores de proteasas.

VI. Materiales y Métodos

Se utilizó una cepa de campo de *M. haemolytica* A2, obtenida en un trabajo previo.¹²² Esta cepa se aisló a partir de tejido pulmonar con lesiones neumónicas características de la enfermedad de un ovino muerto en campo. Se descongeló dicha cepa y se sembró en cultivo puro en placa de agar sangre, incubándose a 37 °C por 24 hrs. Se realizaron la tinción de Gram y un análisis bioquímico para corroborar la morfología e identidad bacteriana, respectivamente.¹⁵⁰

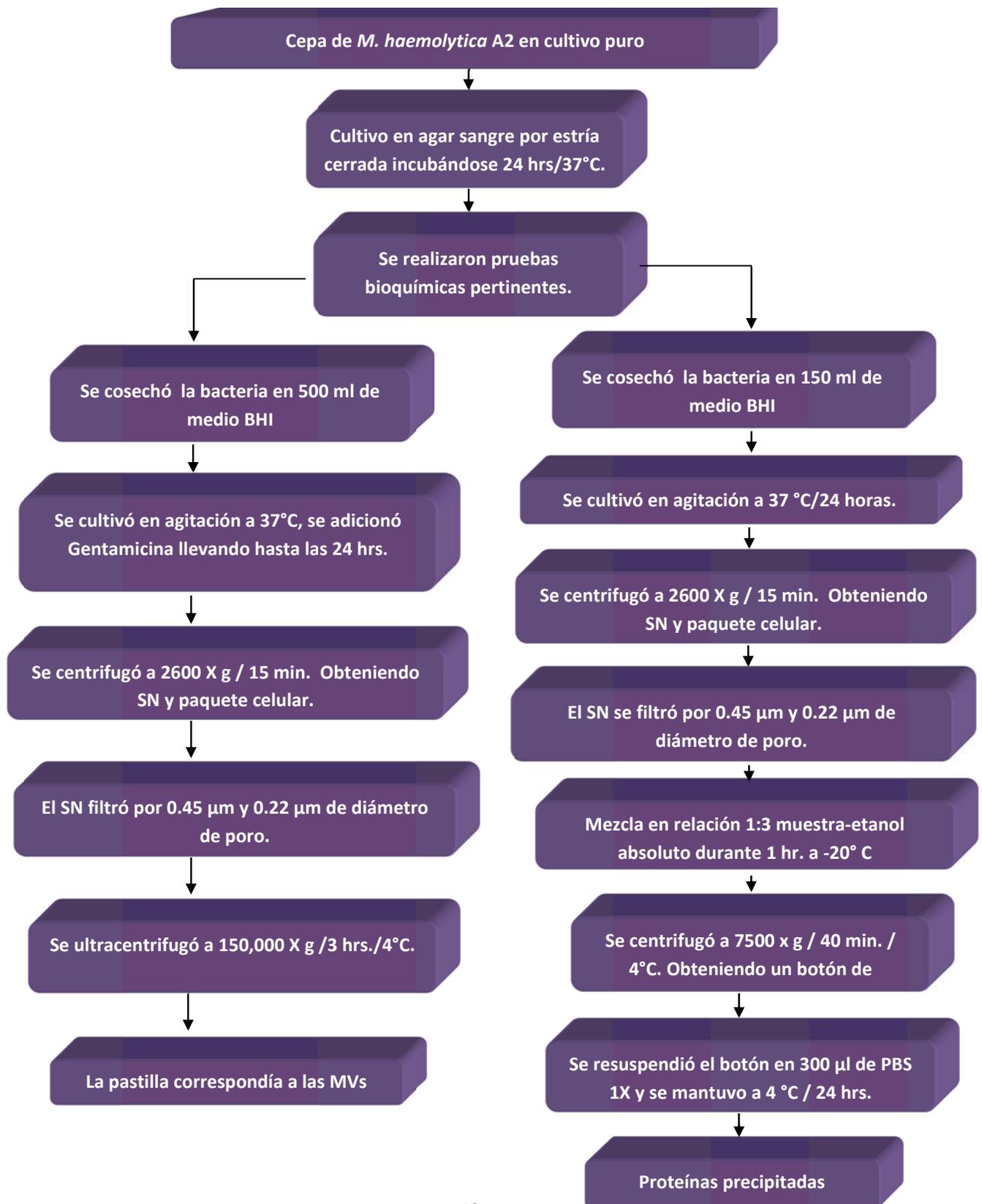
VI.1 Obtención de MVs.

Se realizó el crecimiento bacteriano tomando una colonia del cultivo puro anteriormente mencionado, en 4 placas de agar sangre mediante estría cerrada incubándose a 37 °C por 24 hrs.¹⁵⁰ Una vez realizado lo anterior, se procedió a cosechar las bacterias en 500 ml de infusión de BHI (Infusión Cerebro Corazón), en agitación suave. Se adicionó gentamicina en una concentración de 20 µg/mL de medio de cultivo durante la fase estacionaria de la bacteria.^{122 - 124} Dicho cultivo se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones antes mencionadas, llevándolo a completar 24 hrs. Finalmente se realizó tinción de Gram para evidenciar la pureza del cultivo.⁴⁸

El cultivo anterior se centrifugó a 2600 x g / 20 minutos, en este paso se separó la biomasa y el SN resultante se filtró por membranas Millipore, primero por 0.45 µm y posteriormente por 0.22 µm. El producto de la filtración se ultracentrifugó a 150 000 g / 3 hrs. / 4 °C. Se eliminó el SN y la pastilla resultante se resuspendió en 200 µl de Hepes 10 mM de pH 7. Finalmente la pastilla que contenía las MVs se conservó a -70 °C hasta su uso.⁴⁸ (Esquema 1)

VI.2 Precipitación de proteínas del sobrenadante

Siguiendo la metodología anterior, se incubó la cepa a diferentes tiempos (6, 12, 24, 48 hrs.) se separó la biomasa y se filtró el SN por 0.45 µm y 0.22 µm, con él se realizó una mezcla en relación 1:3 (muestra: etanol absoluto) por 1 hora a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 7500 x g / 40 min. / 4 °C. Se eliminó el SN y la pastilla resultante se resuspendió en 300 µl de PBS 1X. Se dejó en refrigeración, a 4 °C / 24 hrs en un tubo Eppendorf (tubos cónicos de piliestireno), con la tapa abierta. Dicha muestra correspondió a proteínas precipitadas contenidas en el SN.^{152, 153} (Esquema 1).



VI.3 Cinética de crecimiento bacteriano.

Dadas las características de crecimiento *in vitro* de *M. haemolytica* y que se cuenta con pocos estudios de este serotipo, se realizó una cinética de crecimiento de la bacteria. Esto con la finalidad de conocer en qué fase de crecimiento de la bacteria se le podría agregar la gentamicina para una mayor producción de MVs. La cinética se realizó con un cultivo puro en placa de agar sangre incubada por 24 hrs. Se tomó una colonia y se sembró en estría cerrada. Posteriormente se cultivó en un tubo de vidrio con 5 ml de BHI hasta tener una densidad óptica (DO) de 0.05 leída a 600 nm. Se dejó incubar este cultivo durante 16 hrs. / 200 RPM /37 °C. De este cultivo se realizaron diluciones seriadas y se tomaron lecturas cada hora, observando la DO. Se plaqueó en cajas de agar BHI para contar las unidades formadoras de colonia (UFC).^{48, 154}

VI.4 Cuantificación de proteínas

Para corroborar la concentración y presencia de proteínas precipitadas en el SN de cultivo y en las MVs, se realizaron dos metodologías: 1. Por el método descrito por Bradford y 2. Por electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

La concentración de proteínas totales se determinó por colorimetría, utilizando el método de microtitulación de Bradford y un estándar de albúmina sérica bovina (ASB) analizado en una curva con diferentes concentraciones. Posteriormente se colocaron 200 µl del reactivo de Bradford más 10 µl de muestra de las proteínas precipitadas y MVs de *M. haemolytica* A2 en placas de ELISA, determinando la cantidad de proteína en el lector de ELISA a 595 nm y por regresión lineal.¹⁵⁵

VI.5 SDS-PAGE

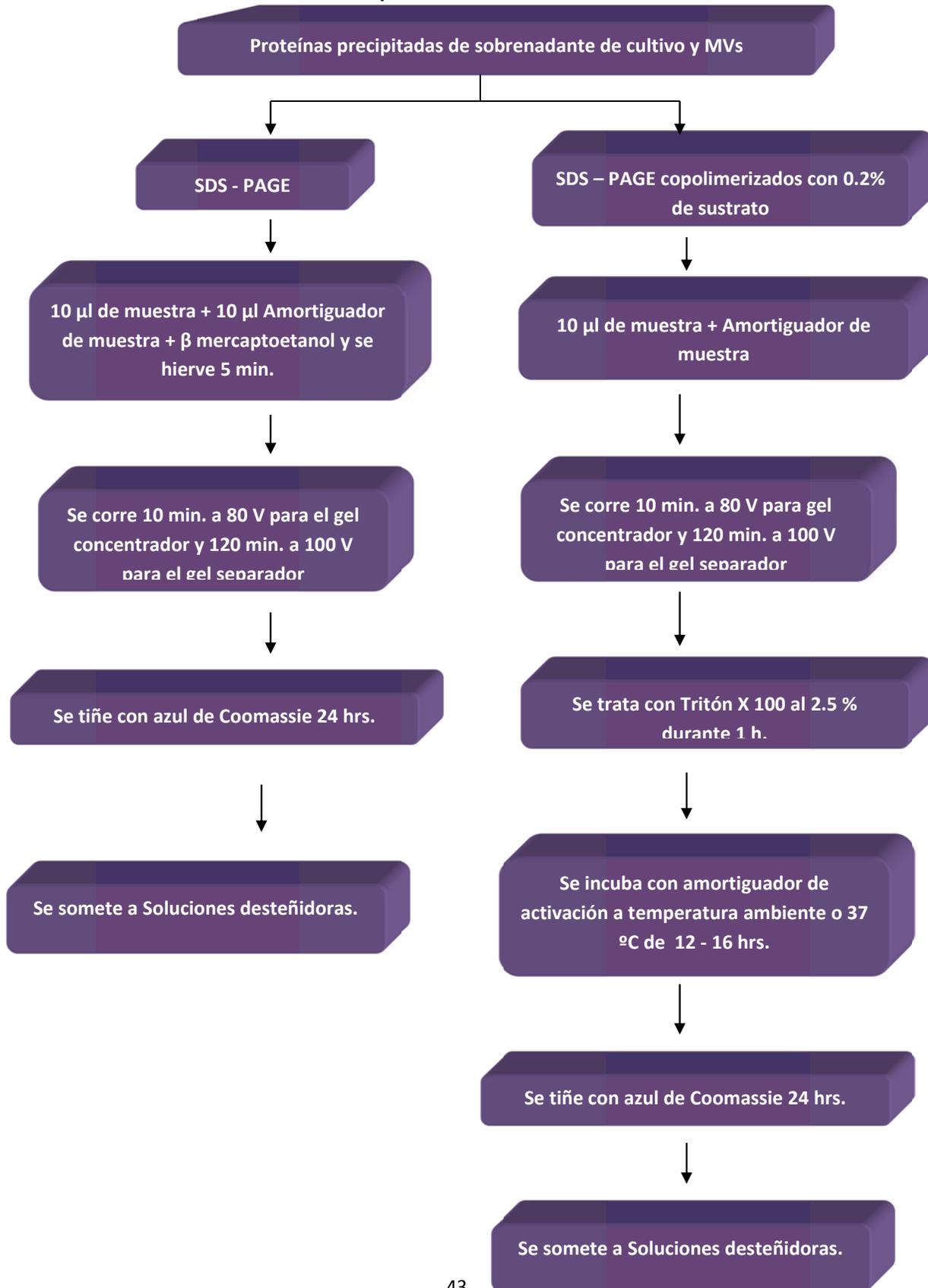
La separación analítica de las proteínas precipitadas del SN de cultivo y de las MVs se hizo en función de sus pesos moleculares, utilizando SDS-PAGE al 12%. Se ajustó la concentración de proteína necesaria a utilizar en el corrimiento electroforético en ambos casos, a 10 µg de proteína por cada 10 µl. Se le agregó 10 µl de amortiguador de muestra más β-mercaptoetanol y se dejó hervir dicha mezcla 5

minutos. Posteriormente se colocó cada mezcla en diferentes carriles, incluyendo un carril con marcadores de peso molecular. Se corrieron a un voltaje de 80 V/10 min. para el gel concentrador y 100 V/2 hrs para el gel separador en una solución amortiguadora de corrida 1X. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie durante 1 hr. a temperatura ambiente y en agitación suave. Posteriormente se destiñeron sometiéndolos a una solución de lavado hasta visualizar las bandas deseadas. Finalmente los geles se conservaron en ácido acético al 10%.^{48, 122, 150} (Esquema 2)

VI.5.1 SDS-PAGE en geles copolimerizados con 0.2% de substrato

Para determinar si los SNs de cultivo y las MVs de *M. haemolytica* A2 contenían proteasas, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 o al 10% copolimerizados con 0.2% de gelatina, hemoglobina, apo-LF u holo-LF. De igual forma, se ajustó la concentración de proteína necesaria a utilizar en el corrimiento electroforético, tanto de las proteínas precipitadas del SN de cultivo como de las MVs, a 10 µg de proteína/10 µl. Se colocó cada muestra en diferente carril y se agregó un carril con marcadores de peso molecular. Las muestras no fueron tratadas con β-mercaptoetanol, ni fueron hervidas. Después de la electroforesis, los geles fueron incubados en amortiguador con Tritón X100 al 2.5% durante 1 hora. En seguida se probaron diferentes amortiguadores de activación proteolítica: Tris – Acetato de sodio pH 4, Tris – CaCl₂ pH 7 y Na₂CO₃ – NaHCO₃ (carbonatos) pH 10, y se incubaron durante 12-16 hrs. a temperatura ambiente y a 37 °C. Posteriormente se procedió a teñir los geles con azul de Coomassie por 24 hrs. Se destiñeron sometiéndolos a una solución de lavado hasta observar el marcador de peso molecular (aproximadamente 30 a 60 min). Finalmente se conservaron en ácido acético al 10%. Como control positivo se empleó una muestra de proteínas precipitadas de SN de cultivo de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, las cuales se muestran en el esquema 2.^{86-89, 129.}

Esquema 2: SDS-PAGE



VI.6 Caracterización parcial de las proteasas acarreadas en MVs.

Como se mencionó anteriormente, se probaron diferentes amortiguadores de activación a varios pHs y temperaturas. Para complementar la caracterización de las proteasa acarreadas en las MVs, se utilizaron diferentes inhibidores de proteasas para determinar qué tipo de proteasa se están secretando o acarreado, respectivamente. Se usó ácido etilen-glicol-tetraacético (EGTA), p-hidroxi-mercuri-benzoato (p-HMB) y Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), en SDS-PAGE al 10% copolimerizado con 0.2% de gelatina.

Se ajustó la concentración de proteína necesaria a utilizar en el corrimiento electroforético, tanto de las proteínas precipitadas del SN de cultivo como de las MVs, a 1 µg de proteína/ 1 µl. En el caso de EGTA y p-HMB se agregaron 2 µl y para PMSF, 1 µl de un stock de 100 mM a las muestras mencionadas anteriormente, incubándose dichas mezclas a temperatura ambiente por 20 min. Se colocó cada muestra en diferentes carriles agregando un marcador de peso molecular. Después de la electroforesis, los geles fueron incubados en amortiguador con Tritón X 100 al 2.5% durante 1 hr. Enseguida se incubaron con el amortiguador de activación Tris – CaCl₂ pH 7 adicionando 10 ml en el caso de EGTA y p-HMB y 5 ml para PMSF por cada 40 ó 45 ml de amortiguador de activación, respectivamente, durante 12-16 hrs. a 37 °C. Posteriormente se procedió a teñir el gel con azul de Coomassie por 24 hrs. Se destiñeron sometiéndolos a una solución de lavado hasta observar el marcador de peso molecular (aproximadamente 30 a 60 min). Finalmente se conservaron en ácido acético al 10%.¹⁵⁶

VI.7 Microscopía Electrónica de Transmisión

Para poder determinar la morfología y tamaño de las MVs liberadas por *M. haemolytica* A2, se colocaron 20 µl de ellas en rejillas de cobre recubiertas con Formvar y se sombrearon con carbón, se dejó reposar la muestra 5 min. Posteriormente se retiró el exceso de muestra con papel filtro y se adicionó finalmente 10 a 15 µl de ácido fosfotúngstico al 1% de pH 5.5, durante 1 min.¹²⁹

VII. Resultados

VII.1 Cinética de crecimiento bacteriano

La cinética de crecimiento bacteriano de *M. haemolytica* A2, permitió establecer la fase de crecimiento de la bacteria en la que se debe adicionar la gentamicina para una mayor producción de MVs. Los valores obtenidos confirman que tanto para DO como en UFC la fase estacionaria se inicia desde las 5 horas de incubación como se muestra en el Cuadro no. 1 y en las Figuras 4 y 5.

Horas	D O	UFC
0	0.05	3.85E+07
1	0.17	1.84E+08
2	0.34	4.10E+08
3	0.40	5.23E+08
4	0.43	7.06E+08
5	0.44	9.00E+08
6	0.45	9.43E+08
7	0.44	9.63E+08
12	0.44	9.82E+08
14	0.44	9.68E+08
16	0.44	9.40E+08

Cuadro 1. Valores en densidad óptica (DO) y en unidades formadoras de colonia (UFC) correspondientes a la cuenta viable, de las cinéticas de crecimiento de *M. haemolytica* A2.

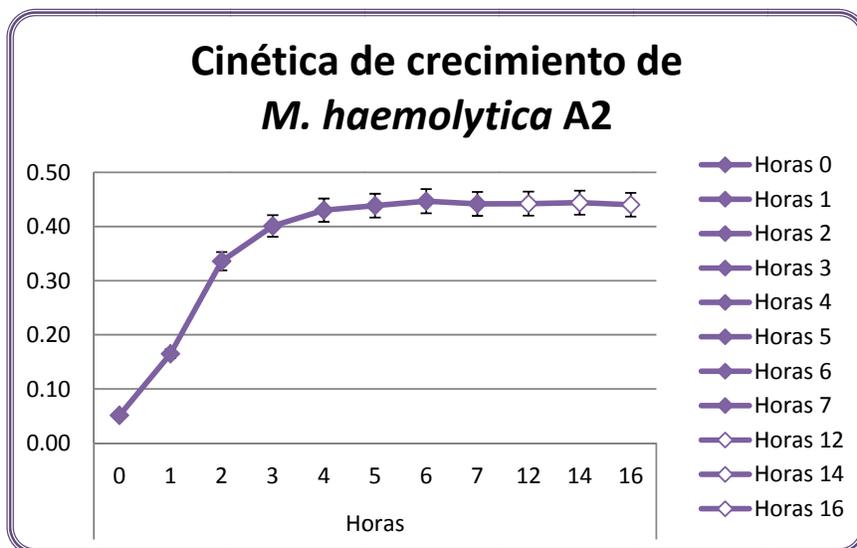


Figura 4. Cinética de crecimiento de *M. haemolytica* A2 (Densidad Óptica). En el eje de las “X”, se muestran las horas de incubación. En el eje de las “Y” se muestran los valores de DO leídos a 600 nm. Como se puede observar, desde la hora 5 la bacteria entra en Fase de crecimiento estacionaria. Se marcaron con blanco las horas en las cuales se le agregó la gentamicina.

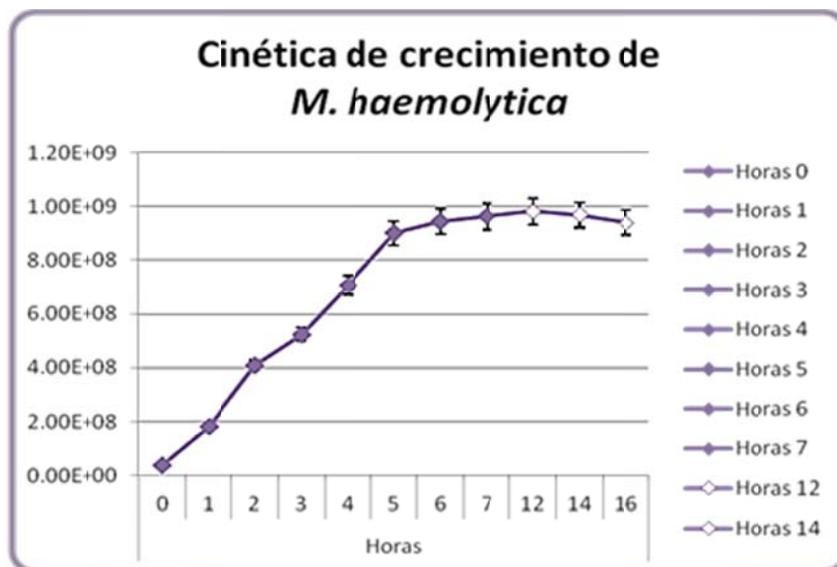


Figura 5. Gráfica de cinética de crecimiento de *M. haemolytica* A2 (Cuenta viable). En el eje de las “X”, se muestran las horas de incubación. En el eje de las “Y” se muestran las UFC. Como se puede observar, desde la hora 5 la bacteria entra en Fase de crecimiento estacionaria. Se marcaron con blanco las horas en las cuales se le agregó la gentamicina.

VII.2 SDS-PAGE de las MVs

Se realizó electroforesis mediante SDS-PAGE al 12% con el fin de evidenciar los perfiles proteínicos de las MVs de *M. haemolytica* A2. El peso molecular de las bandas de las MVs fue estimado según su posición en el gel, comparándolo con un estándar de proteínas de pesos moleculares conocidos, presentes en el mismo gel. En la Figura 6 se muestra un gel teñido con azul de Coomassie, donde se corrieron muestras de MVs con concentraciones de 5 y 10 μg de proteína, respectivamente. De esta manera se observó la presencia de las principales proteínas antigénicas de la bacteria, como son la LKT de 104 kDa, una proteína de 60 kDa que cruza antigénicamente con una adhesina de *A. pleuropneumoniae*, dos proteínas de 45 y 54 kDa identificadas en un trabajo previo como altamente antigénicas¹⁵⁷ y el LPS de 25 kDa.

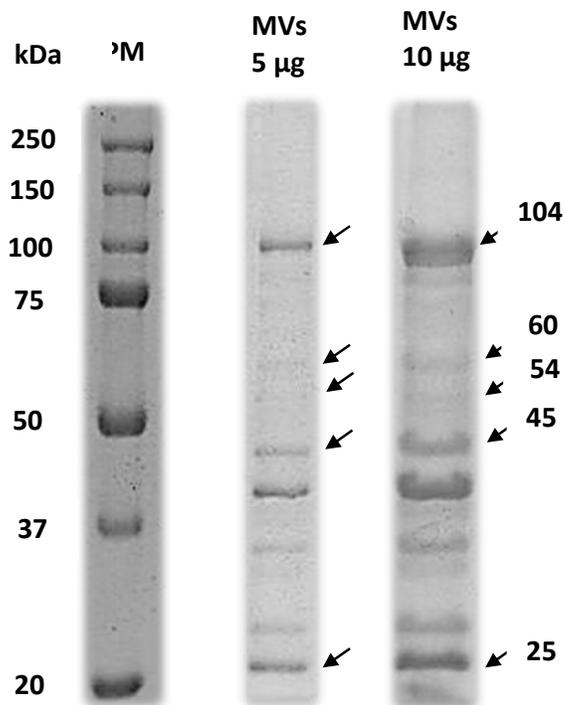


Figura 6. SDS-PAGE al 12% de MVs de *M. haemolytica* A2. En el primer carril se observan los marcadores de peso molecular estándar, en el 2 se corrió una muestra que contenía 5 μg de proteína, en el 3 se muestra un corrimiento con 10 μg de proteína. En ambas muestras se observa claramente el perfil de proteínas que arrastran las MVs de *M. haemolytica* A2. Las flechas indican las principales proteínas antigénicas reportadas, mencionadas anteriormente.

VII.3 SDS-PAGE de las proteínas precipitadas del SN de cultivo a partir de células completas.

Las proteínas del SN de *M. haemolytica* A2 fueron separadas mediante SDS-PAGE al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie. En este procedimiento se utilizó como control a *A. pleuropneumoniae*. Para cada muestra de SN se colocaron 10 µg de proteína en cada carril.

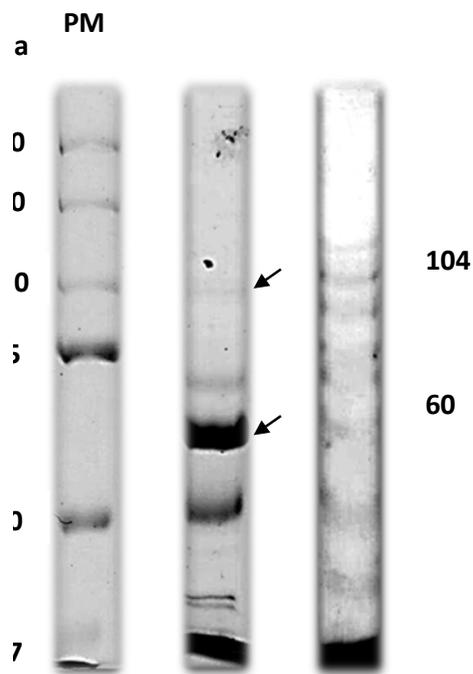


Figura 7. SDS-PAGE al 10% del SN de *M. haemolytica* A2. En el primer carril (PM) se encuentran los marcadores de peso molecular, en el carril 2 se observan las proteínas pertenecientes al SN de cultivo de *M. haemolytica* A2. En este carril se muestran dos bandas señaladas con una flecha, perteneciente a la LKT de 104 kDa y a la proteína de 60 kDa que cruza antigénicamente con la adhesina de *A. pleuropneumoniae*. En el carril 3 se observan las proteínas de la cepa control de *A. pleuropneumoniae*.

VII.4 SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo a partir de células completas copolimerizado con 0.2% de gelatina.

Para determinar si *M. haemolytica* A2 secreta proteasas, se realizaron SDS-PAGE al 10% copolimerizados con 0.2% de diferentes substratos. Primero se estandarizó la actividad proteolítica del SN a diferentes tiempos (6, 16, 24, 48 hrs), con gelatina a 37 °C/pH 7, conteniendo en cada carril 10 µg de proteína, obteniéndose el resultado mostrado en la Figura 8. Posteriormente se usaron dos diferentes variables: temperatura ambiente y pH de 4 ó 10, (Figuras 9 y 10, respectivamente), así como diferentes substratos.

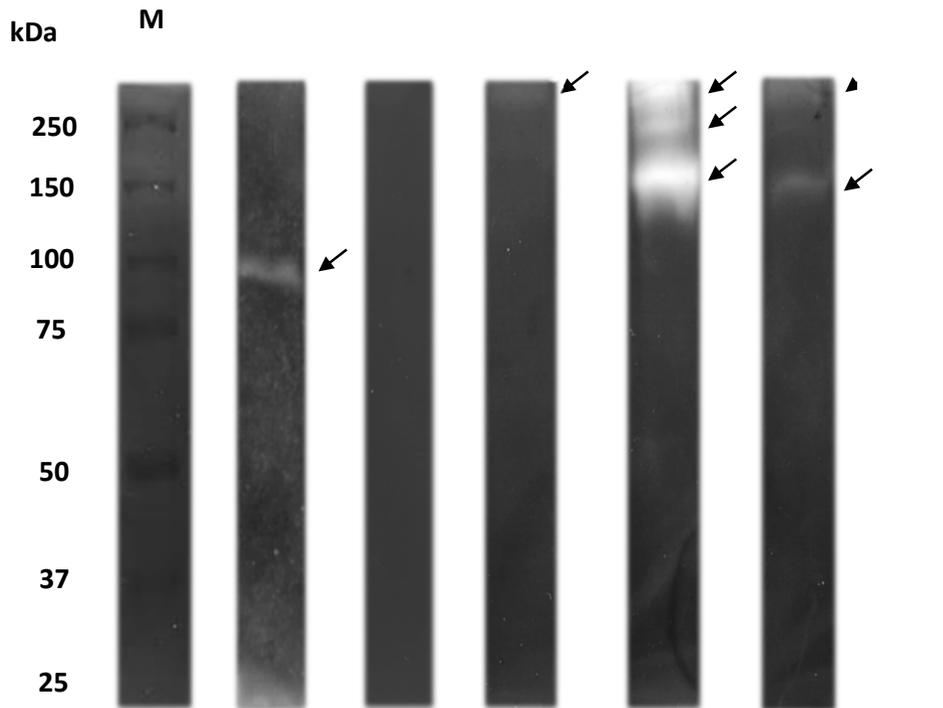


Figura 8. SDS-PAGE al 10% del SN de *M. haemolytica* A2 copolimerizado con 0.2% de gelatina a 37 °C, pH 7. En el primer carril se encuentran los marcadores de peso molecular, en el carril 2 se observa la cepa control de *A. pleuropneumoniae*. En los carriles del 3 al 6 se puede observar proteínas del SN precipitadas de *M. haemolytica* A2 con diferentes tiempos de incubación, (3) 6 h, (4) 16 h, (5) 24 h, (6) 48 h. Las flechas corresponden a los pesos moleculares correspondientes a las bandas de degradación encontradas en este sustrato.

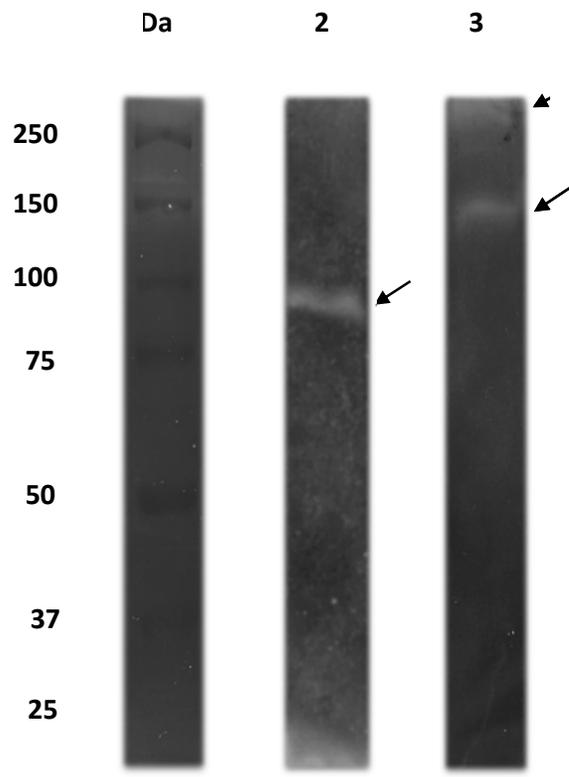


Figura 9. SDS-PAGE al 10% copolimerizado con 0.2% de gelatina a T. ambiente, pH 7. En el primer carril (PM) se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 se observa la cepa control y en el carril 3 proteína del SN de *M. haemolytica* A2. Se observan las misma bandas que el gel incubado a 37 °C pero más tenues, a excepción la de 200 kDa.

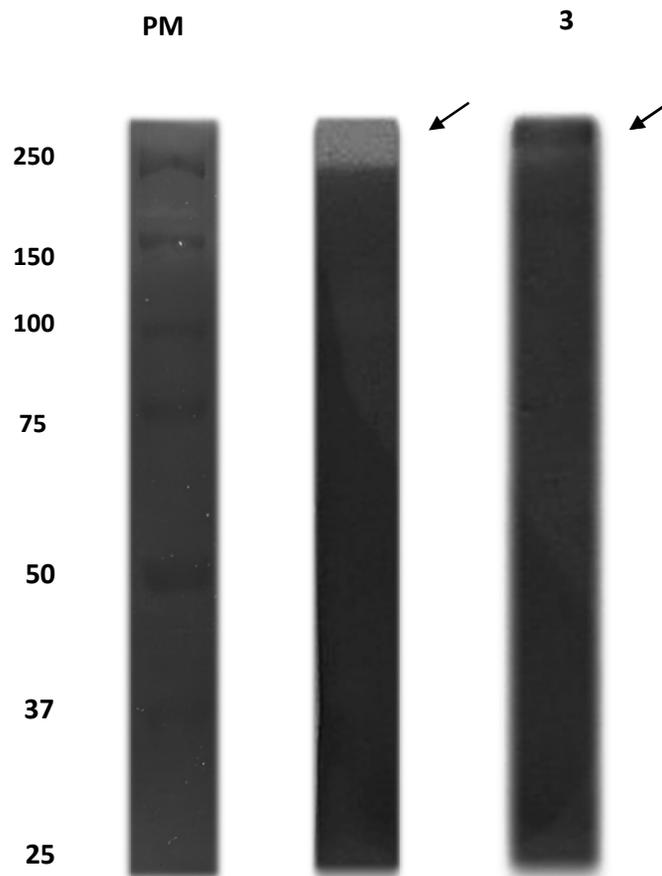


Figura 10. SDS-PAGE al 10% copolimerizado con 0.2% de gelatina a 37°C. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular, en los carriles 2 y 3 se observan las proteínas del SN de *M. haemolytica* A2 a pH 10 y 4, respectivamente. Solo se conservan las bandas de mayor peso molecular, a diferencia de lo encontrado a pH7.

VII.4.1 SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo de cultivo a partir de células completas y de MVs, gel copolimerizado con 0.2% de gelatina.

Conociendo el tiempo y el pH adecuado de incubación de *M. haemolytica* A2 para observar una óptima degradación proteolítica o producción de proteasas, se utilizó el SN como control para determinar si las MVs de dicha bacteria también presentaban actividad proteolítica, para esto se realizó un gel SDS-PAGE al 10% a 37 °C pH 7. (Figura 11).

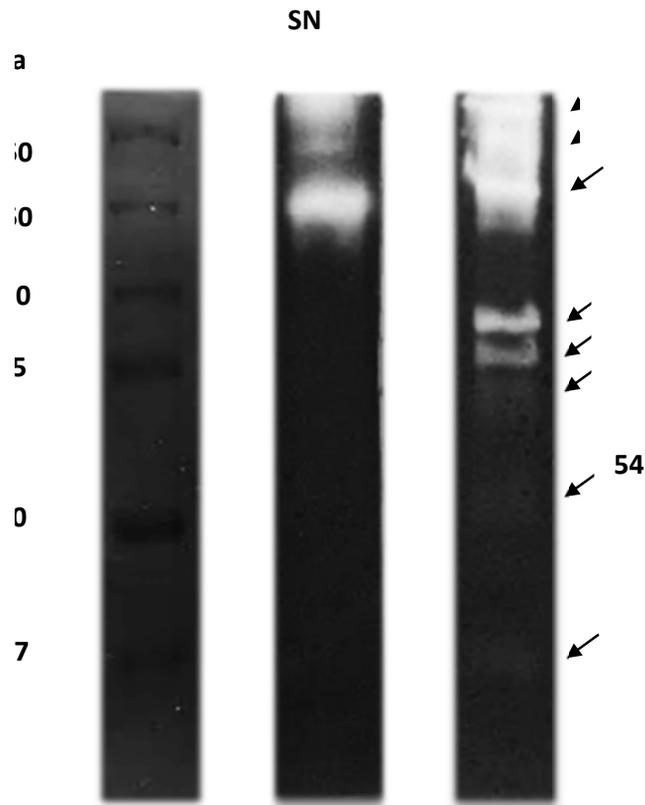


Figura 11. SDS-PAGE al 10% del SN y MVs de *M. haemolytica* A2 copolimerizado con 0.2% de gelatina a 37°C, pH 7. En el primer carril (PM) se encuentran los marcadores de peso molecular, en los carriles 2 y 3 se observa el SN y las MVs de *M. haemolytica* A2, respectivamente. Las flechas corresponden a los pesos moleculares correspondientes a las bandas de degradación encontradas en este sustrato.

VII.5 SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo a partir de células completas copolimerizado con 0.2% de hemoglobina bovina.

Se realizó un gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado al 0.2% con hemoglobina bovina como sustrato para observar la actividad proteolítica de las proteínas del SN de *M. haemolytica* A2, pH 7, a 37 °C (carril 2) y a T. ambiente (carril 3). (Figura 12) Posteriormente se probaron a pH 4 y pH 10. (Figura 13)

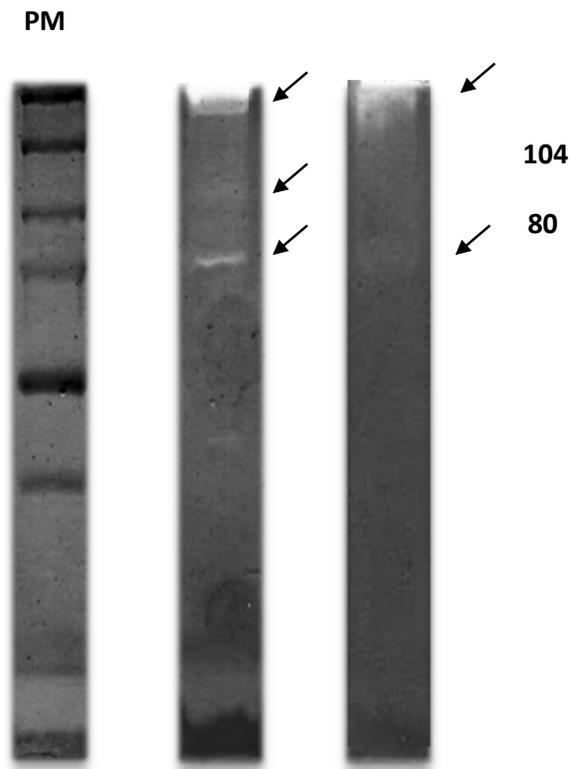


Figura 12. SDS-PAGE al 10% copolimerizado al 0.2% con hemoglobina bovina pH7. En el primer carril (PM) se muestra el marcador de peso molecular. En los carriles 2 y 3 se observan proteínas de SN de *M. haemolytica* A2 a 37 °C y a T. ambiente, respectivamente. Las flechas señalan las bandas de proteasas de diferentes pesos moleculares.

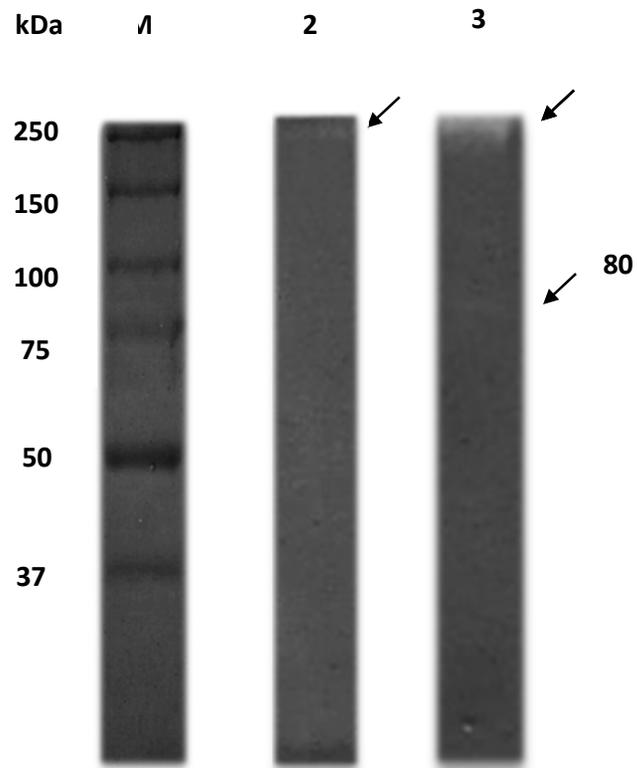


Figura 13. SDS-PAGE al 10% copolimerizado al 0.2% con hemoglobina bovina a 37°C. En el primer carril (PM) se muestran los marcadores de peso molecular. En los carriles 2 y 3 se observan proteínas de SN de *M. haemolytica* A2 a 37 °C, pH 4 y pH 10, respectivamente. Las flechas señalan las bandas de proteasas de diferentes pesos moleculares, predominan las bandas de alto peso molecular.

VII.5.1 SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo a partir de células completas y MVs copolimerizado con 0.2% de hemoglobina bovina.

Al comprobarse que se observan de mejor forma las bandas de proteasas a pH 7 y a 37 °C, se procedió a realizar geles SDS-PAGE al 10% copolimerizados con 0.2% de hemoglobina bovina con MVS de *M. haemolytica* A2 utilizando como control el SN de dicha bacteria. (Figura 14)

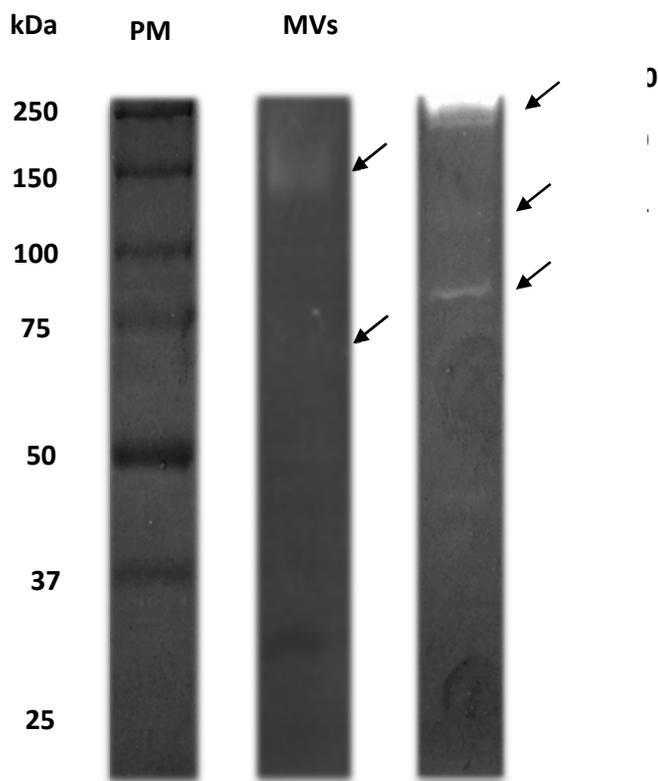


Figura 14. SDS-PAGE al 10% del SN y MVs de *M. haemolytica* A2 copolimerizado con 0.2% de hemoglobina a pH 7. En el primer carril 1 (PM) se encuentran los marcadores de peso molecular y en los carriles 2 y 3 se observan las proteasas del SN y las MVs de *M. haemolytica* A2, respectivamente. Las flechas corresponden a los pesos moleculares correspondientes a las bandas de degradación encontrada en este sustrato.

VII.6 SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo a partir de células completas copolimerizado con 0.2% de apolactoferrina bovina.

Se realizó un gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado al 0.2% con apolactoferrina bovina como sustrato para observar la actividad proteolítica de las proteínas del SN de *M. haemolytica* A2 a 37 °C (carril 2) y a T. ambiente (carril 3). (Figura 15). Al notar que la bandas eran de alto peso molecular se procedió a emplear un SDS-PAGE al 7.5% (figura 16). Posteriormente se probaron a pH 4 y pH 10. (Figura 16).

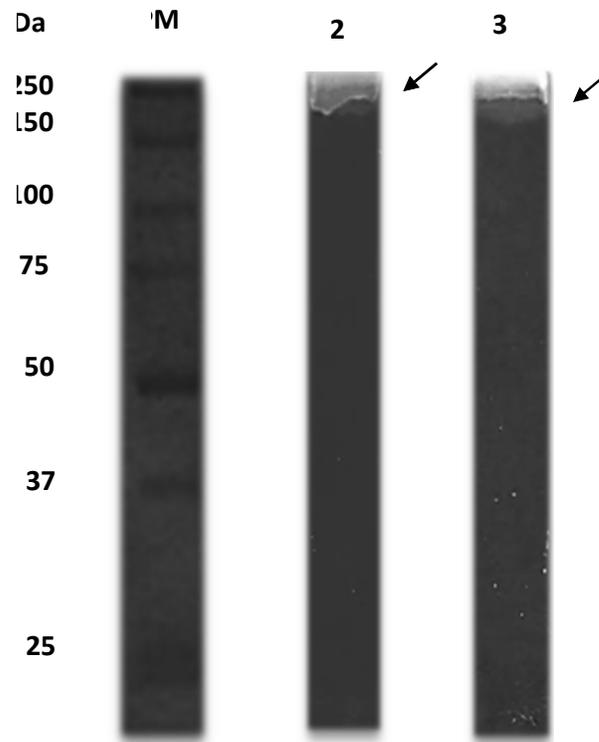


Figura 15. SDS-PAGE al 10% copolimerizado al 0.2% con apolactoferrina bovina. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular. En los carriles 2 y 3 se observan proteínas de SN de *M. haemolytica* A2 a 37°C y a T. ambiente, respectivamente. Las flechas señalan las bandas de proteasas encontradas contra este sustrato.

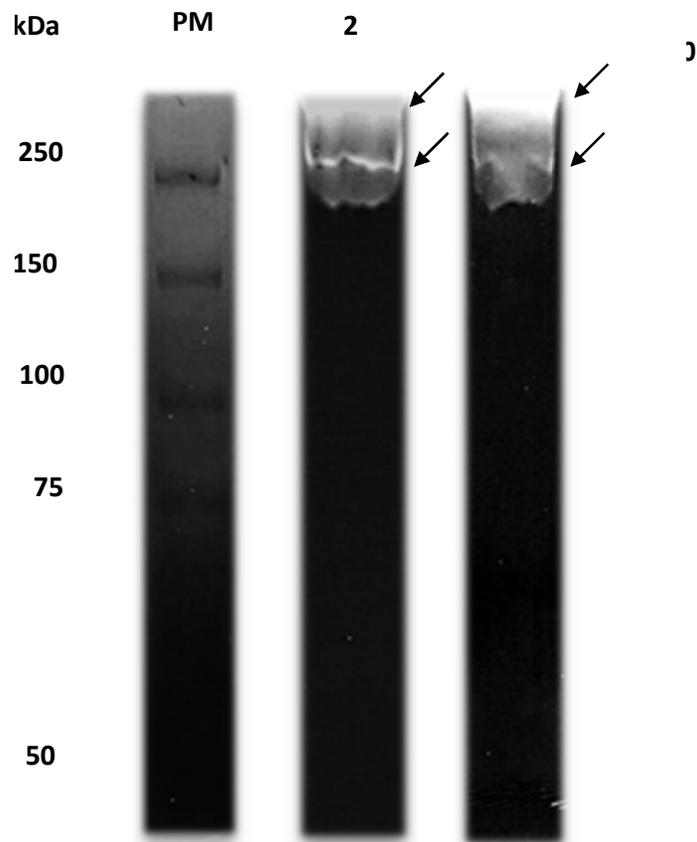


Figura 16. SDS-PAGE al 7.5% copolimerizado al 0.2% con apolactoferrina bovina. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular. En el carril 2 y 3 se observan proteínas de SN de *M. haemolytica* A2 a 37°C y T. ambiente, respectivamente. Las flechas señalan las bandas de proteasas con pesos moleculares señalados a la derecha.

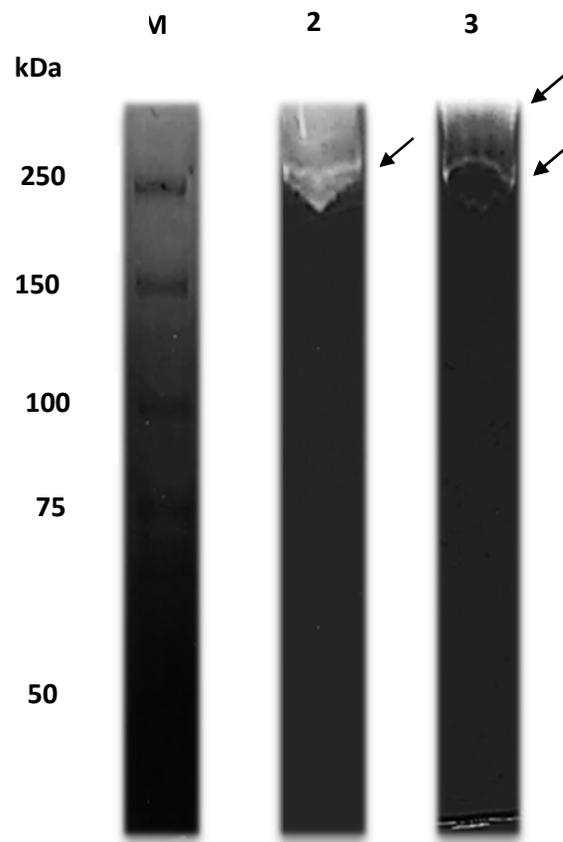


Figura 17. SDS-PAGE al 7.5% copolimerizado al 0.2% con apolactoferrina bovina. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular. En el carril 2 y 3^o se observan proteínas de SN de *M. haemolytica* A2 a 37°C, pH 4 y pH 10, respectivamente. Las flechas señalan las bandas de proteasas de diferentes pesos moleculares, observándose las mismas que a pH 7.

VII.6.1. SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo a partir de células completas y MVs copolimerizado con 0.2% de apolactoferrina bovina.

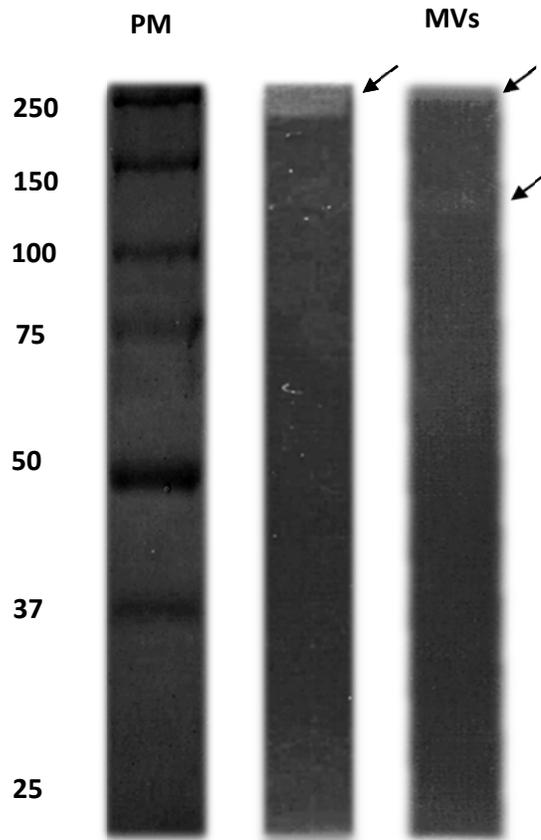


Figura 18. SDS-PAGE al 10% copolimerizado al 0.2% con apolactoferrina bovina a 37°C y pH 7. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 se observa las proteínas del SN de *M. haemolytica* A2 utilizado como control y en el carril 3 se muestra las MVs de dicha bacteria. Las flechas resaltan los pesos moleculares observados en este gel.

VII.7 SDS-PAGE al 7.5% del SN de cultivo a partir de células completas copolimerizado con 0.2% de hololactoferrina bovina.

AL observar que las bandas de apolactoferrina eran alto peso molecular, se empleó un gel SDS-PAGE al 7.5% copolimerizado al 0.2% con hololactoferrina bovina como sustrato para observar la actividad proteolítica de las proteínas del SN de *M. haemolytica* A2 pH 7 a 37°C (carril 2) y a T. ambiente (carril 3). (Figura 19). Posteriormente se probaron a pH 4 y pH 10. (Figura 20)

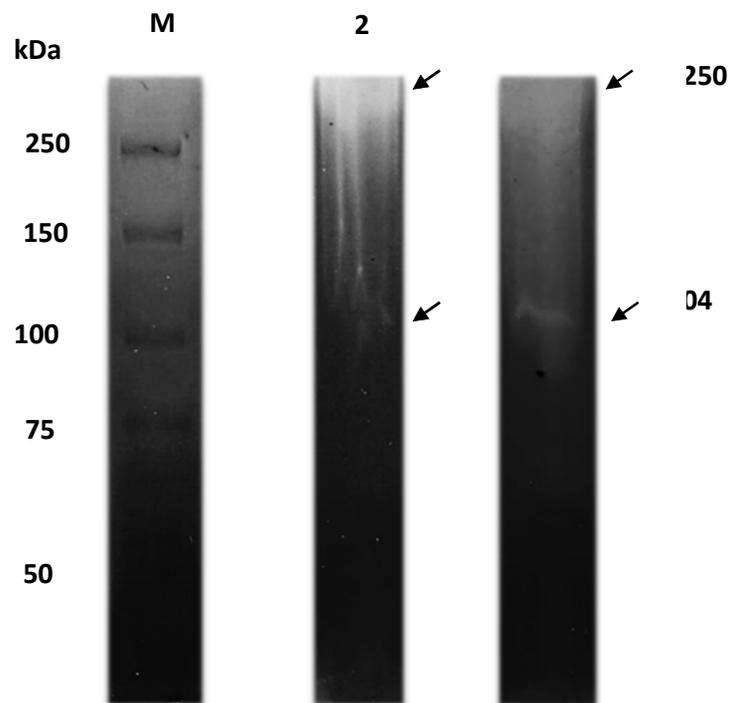


Figura 19. SDS-PAGE al 7.5% copolimerizado con 0.2% de hololactoferrina pH 7. En carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestra proteína del SN de *M. haemolytica* A2 a 37°C y en el carril 3 proteína del SN de dicha bacteria a T. ambiente. Se resaltan con flechas las bandas de degradación sobre dicho sustrato.

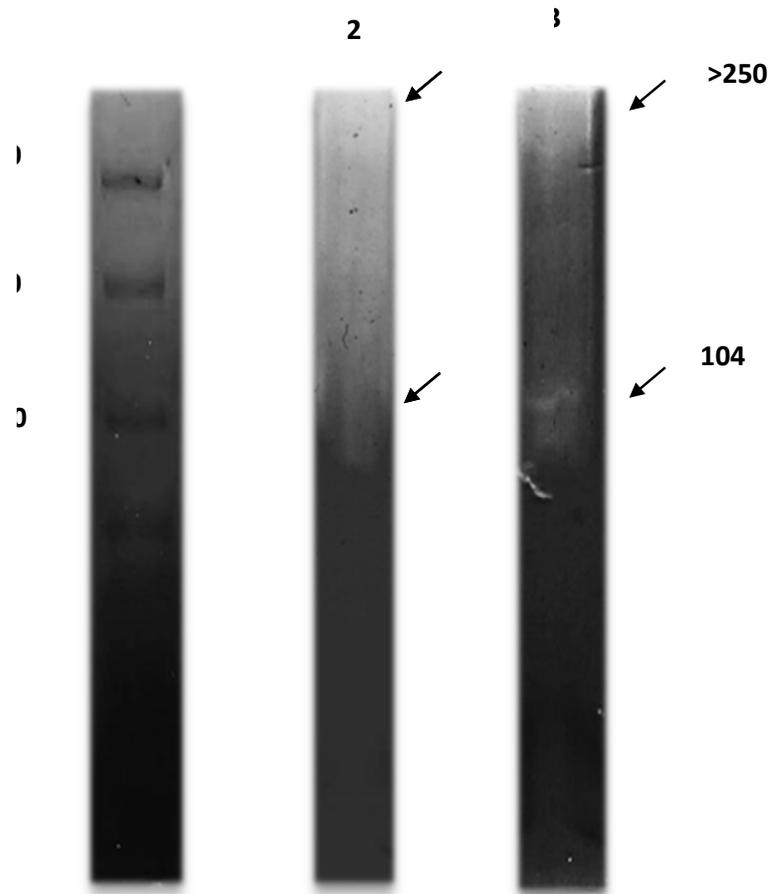


Figura 20. SDS-PAGE al 7.5% copolimerizado al 0.2% con holactoferrina bovina. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular. En el 2^{do} y 3^{er} carril se observan proteínas de SN de *M. haemolytica* A2 T. ambiente, pH 4 y pH 10, respectivamente. Las flechas señalan las bandas de proteasas de diferentes pesos moleculares observándose las mismas que a pH 7.

VII.7.1. SDS-PAGE al 10% del SN de cultivo a partir de células completas y MVs copolimerizado con 0.2% de hololactoferrina bovina.

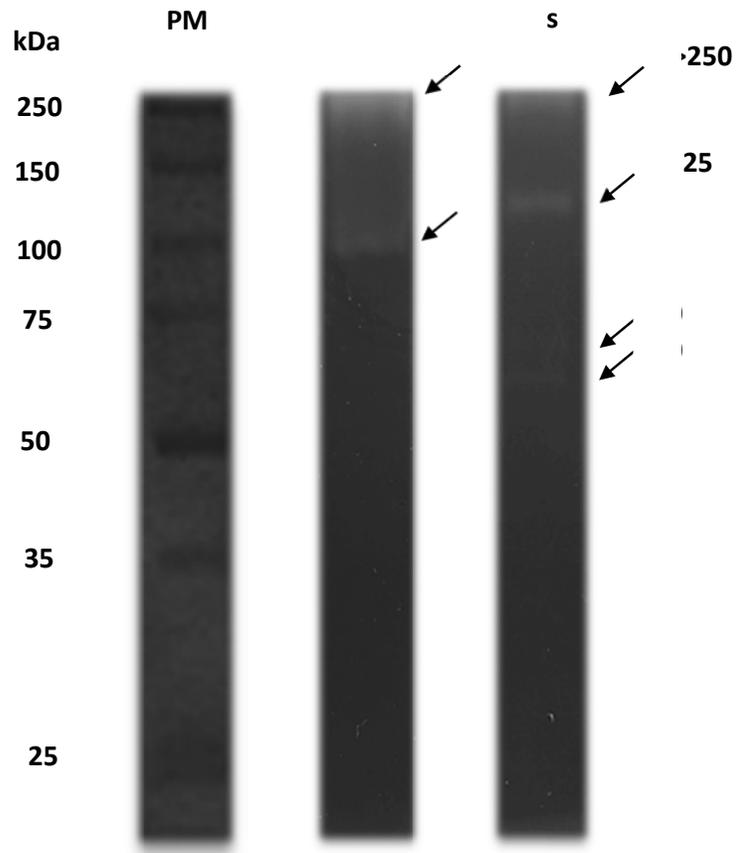


Figura 21. SDS-PAGE al 10% copolimerizado al 0.2% con hololactoferrina bovina a 37°C y pH 7. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 se observa las proteínas del SN de *M. haemolytica* A2 utilizado como control y en el carril 3 se muestra las MVs de dicha bacteria. Las flechas resaltan los pesos moleculares observados en este gel.

VII.8 SDS-PAGE al 10% de las MVs copolimerizado con gelatina utilizando inhibidores de proteasas.

Para caracterizar parcialmente el tipo de proteasas encontradas en *M. haemolytica* capaces de degradar los diferentes sustratos, se procedió a utilizar inhibidores de proteasas. Se probaron tres de los inhibidores mencionados anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente imagen. Fig. 22

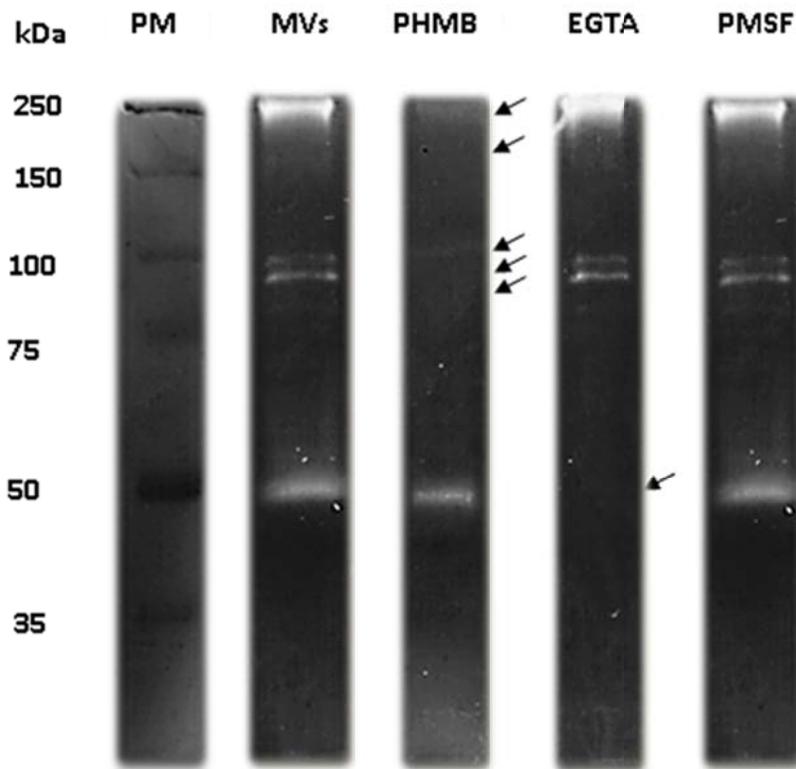


Figura 22. SDS-PAGE al 10% de las MVs copolimerizado con gelatina con inhibidores de proteasas. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, en carril 2 las MVs, en el carril 3 las MVs tratadas con PHMB, en el 4 las MVs con EGTA y en el 5 las MVs con PMSF. Se observa claramente que desaparecen las bandas de bajo peso molecular utilizando EGTA, así como también desaparecen las bandas de alto peso molecular con PHMB. En el caso de las MVs con PMSF no se observa ninguna diferencia en comparación de las MVs sin inhibidor. Las flechas señalan las bandas que se pierden, respectivamente en los geles mencionados anteriormente.

VII.9 Microscopia Electrónica de Transmisión

La observación de las MVs y de las bacterias secretando MVs al microscopio electrónico (Jeol; modelo: JEM2000EX), reveló la presencia de estructuras de tamaño regular y de forma esférica que pudieran sugerir coalescencia de MVs (Fig. 23,24, 25). Es claro a su vez la formación de múltiples MVs emanando de la superficie bacteriana. (Fig. 26 y 27)

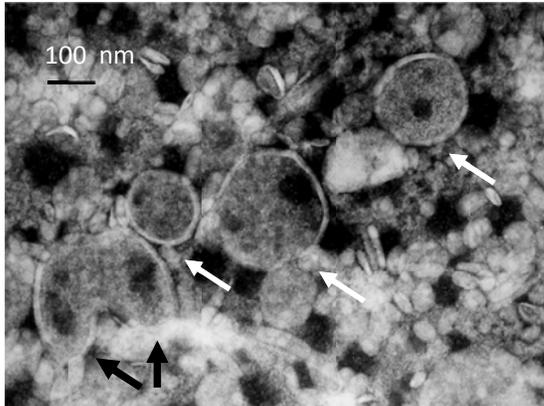


Figura 23

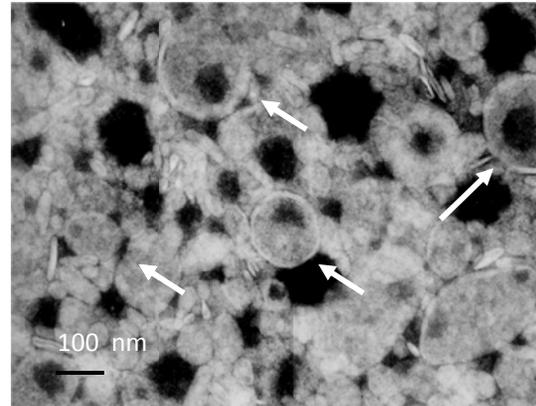


Figura 24

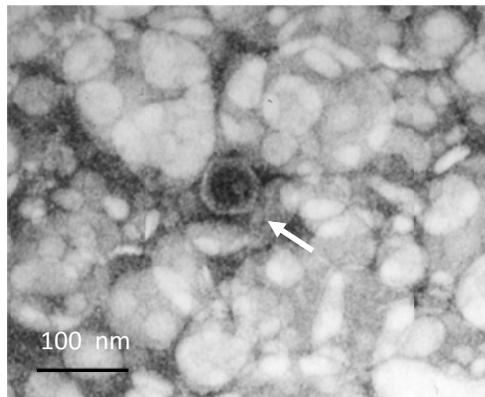


Figura 25

Tinción negativa de MVs de *M. haemolytica* A2.

Figura 23 y 24. En la imagen se aprecian estructuras de forma esférica y de diferentes tamaños (flechas blancas). Dichas estructuras tienden a coalescer para formar estructuras de mayor tamaño (flechas oscuras).

Figura 25. Se observa una estructura esférica con un material electrodensito (oscuro) en su interior de aproximadamente 50 nm de diámetro.

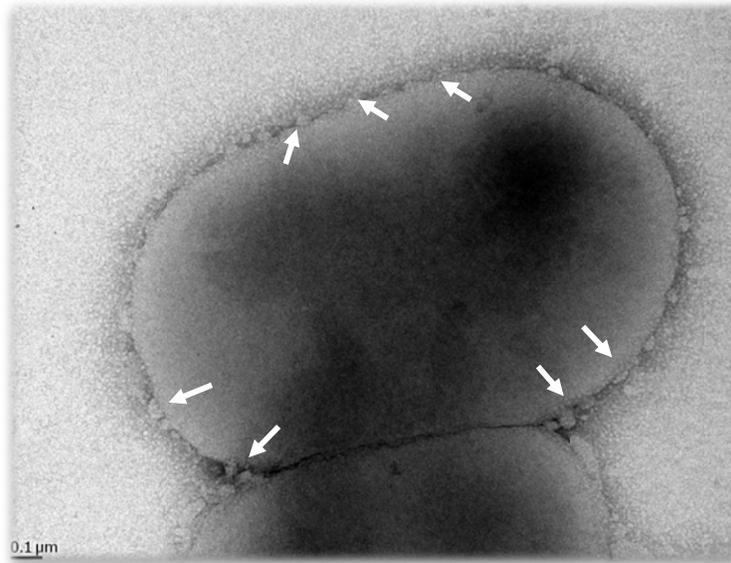


Figura 26

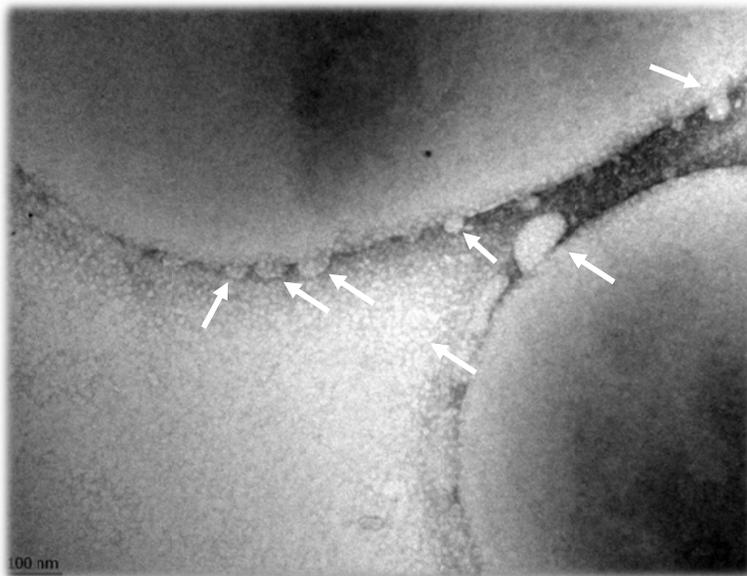


Figura 27

Figura 26 y 27. En las imágenes se aprecia el cuerpo bacteriano de *M. haemolytica* A2 liberando múltiples estructuras esféricas (Flechas blancas).

VIII. DISCUSIÓN

La secreción de los factores de virulencia de los patógenos Gram-negativos es complicada, por el hecho de que la envoltura bacteriana consiste en dos bicapas de lípidos que corresponden a la membrana externa y la membrana interna, y el periplasma y el péptidoglicano o pared celular entre ellas.¹¹¹

La liberación de MVs de la envoltura durante el crecimiento de la bacteria sirve como vehículo para secretar proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA. La producción de estas MVs ocurre en el tejido infectado y está influenciada por factores del medio ambiente. El papel principal que juegan las MVs es establecerse y colonizar en nichos, acarreado y transmitiendo factores de virulencia a los tejidos del hospedero. La liberación de toxinas mediada por MVs es un potente mecanismo de defensa exhibido por diversos patógenos Gram negativos.

Las propiedades bioquímicas y funcionales de las MVs que liberan los patógenos al medio, revelan su potencial de impacto en las enfermedades que producen. Estudios con MVs de diversos orígenes bacterianos soportan una función en común: las MVs son el medio por el cual la bacteria interactúa con las otras células procariotas, eucariotas y con su medio ambiente.¹²²

Cuando las bacterias Gram-negativas son crecidas en condiciones estresantes, es común observar que la cantidad de MVs que se están liberando aumenta considerablemente, y su tamaño varía con respecto a las liberadas por bacterias que son crecidas en condiciones normales.¹²³ Por ejemplo, los antibióticos aminoglucósidos perturban la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, lo que ocasiona que se incremente de tres a cinco veces la cantidad de MVs y que el tamaño de ellas aumente de 50 nm (que es su tamaño en cultivos bacterianos en condiciones normales), hasta 200 nm.¹²⁴

Para poder establecer en qué fase de crecimiento de *M. haemolytica* se debía adicionar gentamicina para aumentar el tamaño y producción de MVs, se realizó una cinética de crecimiento bacteriana a partir de un cultivo puro de 24 hrs. de incubación. Nuestro grupo de trabajo había visto que el momento óptimo para agregar dicho

antibiótico era de 12-16 hrs. de incubación.¹²² Siguiendo esto, se procedió a incubar a *M. haemolytica* A2 hasta estos tiempos. Los resultados obtenidos tanto en DO como en cuenta viable (UFC), mostraron que entre las 12 y 16 hrs. de incubación la bacteria se encuentra en fase de crecimiento estacionaria tardía (Fig 4 y 5), estableciendo que durante esta fase de crecimiento bacteriano es el momento en el cual se debe de agregar el antibiótico para exacerbar el tamaño y producción de MVs, siendo este trabajo el primero en reportar dichos resultados en *M. haemolytica* A2.

Para corroborar la correcta obtención, tamaño y morfología de MVs de *M. haemolytica* A2, se realizó microscopia electrónica de tinción negativa, la cual reveló la presencia de estructuras de tamaño regular, de forma esférica, correspondientes a MVs secretadas por *M. haemolytica*. Es clara la formación de múltiples MVs emanando de la superficie bacteriana e incluso se puede observar la coalescencia de estas entre sí. Este resultado concuerda con lo descrito por nuestro grupo de trabajo en el 2007,¹²² reportando estructuras esféricas de tamaños desde 50 hasta 200 nm de diámetro emanando de la superficie bacteriana.

Kadurugamuwa y Beveridge en 1995 obtuvieron MVs de 100-200 nm al cultivar a *P. aeruginosa* en presencia de gentamicina. Por otro lado, Sabra et. al., en el 2003 señalaron que *P. aeruginosa* crecida bajo estrés de oxígeno ($pO_2 \sim 350\%$) liberaba MVs cuyo tamaño, (24.5 nm) era mucho mayor que el de las liberadas cuando la bacteria crece en condiciones normales. En nuestro trabajo observamos de igual forma que algunas MVs se ven con un material electrodensito (sombreado) dentro de ellas, abarcando una parte o toda la MV, coincidiendo con Kadurugamuwa y Beveridge en 1995, mencionando que pueda deberse a la estimulación de la bacteria por el antibiótico.

Para separar las proteínas encontradas en las MVs, se realizaron geles SDS-PAGE. Los resultados obtenidos (Fig. 6) demuestran un incontable patrón de bandeo proteínico entre las cuales destacan varias proteínas reportadas anteriormente por nuestro grupo de trabajo. Podemos observar una proteína de 104 kDa perteneciente a la LKT, la cual es la endotoxina más importante de este género bacteriano, perteneciente a la familia de las toxinas RTX. Se sabe que la LKT es secretada cuando la

bacteria se encuentra en su fase de crecimiento logarítmico y actúa como una citolisina formadora de poros, insertándose en la membrana de sus células blanco y resultando en un desequilibrio osmótico que genera muerte a la célula del hospedero. La LKT inicia una cascada de eventos que permiten daño al tejido, neumonía y muerte en los animales.¹⁵⁸

Otra proteína observada corresponde al peso de 60 kDa, la cual se menciona que cruza antigénicamente con una adhesina de *A. pleuropneumoniae*, pudiendo ser de la misma naturaleza. Se encontraron también dos proteínas muy importantes de la bacteria que son inmunogénicas, una de 45 y 54 kDa respectivamente. Pandher y col. en 1998, reportó una PME de 45 kDa la cual demostró tener una alta respuesta de anticuerpos al correlacionarla con la resistencia al desafío experimental. Después de purificarla y clonarla comprobó que era una lipoproteína encontrada en la superficie bacteriana y es altamente inmunogénica para el ganado.⁶⁶

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo, en un estudio donde se evaluó la respuesta inmune de borregos mediante Western Blott, tanto de animales muestreados en campo como de animales desafiados experimentalmente, de las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* A2, se observó que un alto porcentaje de los sueros de estos animales reconocía fuertemente sobre las membranas de nitrocelulosa varias proteínas, pero principalmente dos, una de 45 y otra de 54 kDa respectivamente. De igual forma se señala otra banda de 25 kDa perteneciente al LPS de dicha bacteria, que también posee un potente efecto inmunogénico.

Al realizar un SDS-PAGE de las proteínas precipitadas del sobrenadante a partir de células completas (Fig. 7), se puede observar que comparten dos proteínas importantes mencionadas anteriormente, una de 60 kDa y otra de 104 kDa (LKT), demostrando que dichas proteínas se secretan al medio extracelular y que son estructuras presentes en la bacteria¹²² y en las MVs, comparado con los resultados anteriores.

El objetivo del presente trabajo fue determinar y caracterizar proteasas de secreción acarreadas en MVs de *M. haemolytica* A2. Las MVs son estructuras que durante su proceso de formación, arrastran constitutivamente factores de virulencia como PME, LKT, plásmidos y productos en tránsito contenido en el periplasma, tales como proteasas.¹²⁴ Por lo que para comprobar la presencia de dichas enzimas en las MVs, se obtuvieron muestras de proteínas secretadas por dicha bacteria, tanto al SN de cultivo a partir de células completas como de MVs. Se estableció una cinética de producción de proteasas a diferentes tiempos, se comprobó que a las 24 hrs. de incubación, 37 °C y pH 7, se observa una clara y concreta actividad de proteasas, encontrando bandas con pesos moleculares de 150 kDa, 200 kDa y otra mayor a 250 kDa. (Fig. 8). Ya que en otros tiempos de incubación, a temperatura ambiente y a pH 4 y 10, se observó menor degradación de estas, pero el mismo patrón cuando se utilizó como control *A. pleuropneumoniae*. (Fig. 8, 9 y 10).

Habiendo establecido las condiciones óptimas de degradación, se procedió a comparar el SN con las MVs, para comprobar que dichas estructuras acarrean proteasas. Los resultados obtenidos demuestran que las MVs contienen una mayor cantidad de proteasas, así como una clara actividad en bandas de 35, 54, 60, 76, 80, 160, 200 y una mayor que 250 kDa, aunque no se podría afirmar que todas ellas son proteasas diferentes. Así como en el SN, donde estas presentaron una mejor actividad en las mismas condiciones. Demostrando que *M. haemolytica* A2 secreta proteasas neutras.

M. haemolytica A2 produce una neuraminidasa con un peso molecular aproximado de 200 kDa.⁹⁹ En el presente trabajo se encontró una proteasa que coincide con la reportada pudiendo tener más de una actividad, como es el caso de la Gcp, clasificada como una metaloproteasa neutra, con actividad de endopeptidasa y neuraminidasa. Coincidiendo con nuestro grupo de investigación, se describió que *A. pleuropneumoniae* secreta proteasas que están implicadas en la patogénesis de la pleuroneumonía contagiosa porcina. De la cuales, se ha purificado y caracterizado una metaloproteasa de 200-kDa, que es un antígeno común en todos los serotipos. Esta proteasa se pudo observar en microvesículas de esta bacteria y alrededor de ella.¹²⁹

Con dichos antecedentes y perteneciendo también a la familia *Pasteurellaceae*, esta proteasa podría tener la misma actividad y la misma naturaleza que la encontrada en otras especies de esta familia.

Por otro lado, Negrete y col. En el 2000, no observaron actividad proteolítica por parte de proteasas en MVs de *A. pleuropneumoniae*, así como también (tampoco) por Ramon y col. en el 2006 en MVs de *Haemophilus paragallinarum*. Sin embargo, en ambos trabajos la presencia de proteasas se puso en evidencia por métodos inmunológicos, al emplear un anticuerpo dirigido contra las proteasas de *A. pleuropneumoniae* indicando que las proteasas estaban presentes, pero no se encontraban activas.

Posteriormente, en el presente trabajo, decidimos utilizar diferentes sustratos del hospedero, como hemoglobina bovina y lactoferrina bovina en su forma apo y holo, para poder establecer si el SN y las MVs contenían diferentes proteasas capaces de degradar estos sustratos.

Usando SN de *M. haemolytica* A2, en el caso de los geles copolimerizados con hemoglobina se encontraron proteasas con pesos moleculares de 80, 104 y mayor que 250 kDa (Fig. 12), siendo consistentes a pH 7 y a 37°C. (Fig. 12 y 13) y correspondiendo de igual forma a proteasas neutras. Usando como control estas proteasas contenidas en el SN, se corrió un gel con MVs, observándose de igual forma degradación, con bandas de 60 y 160 kDa. Posiblemente la banda de 104 kDa pueda coincidir con la principal exotoxina secretada hacia el medio ya que al momento de translocarse por la membrana externa pueda sufrir un proceso que active a esta toxina y tenga un efecto sobre dicho sustrato. Kadurugamuwa y col. en 1997, señalan que hay enzimas que una vez que translocan la membrana plasmática y llegan al periplasma, se encuentran en un estado de pro-enzima, por lo que carecen de actividad. Podría ser el caso para esa proteasa que se observa en SN pero no en MVs.

A. pleuropneumoniae secreta proteasas que degradan hemoglobina porcina, una de las bandas de degradación tiene un peso molecular aproximado de 105 kDa,⁸⁷ muy parecida a una de las bandas de degradación observada en estos resultados.

Para el caso de los geles copolimerizados con apolactoferrina, se observó una proteasa de 250 kDa y otra mayor que ese peso (Fig. 16 y 17), al usar una muestra de MVs, se puede apreciar que persiste esta proteasa pero se expresa otras con un peso de 110 kDa (Fig. 18). Algo parecido se observó al utilizar a hololactoferrina como sustrato, ya que se notaron proteasas con pesos de 104 y otra mayor que 250 kDa en SN (Fig. 19 y 20), comparado con MVs denotando proteasas de 60, 70 120 y otra de igual forma mayor que 250 kDa. (Fig. 21)

La proteasa de 104 kDa podría ser la misma que degrada hemoglobina, mencionada anteriormente, de igual forma la de 250 kDa podría corresponder a la neuraminidasa que oscila entre ese peso, teniendo múltiples actividades como se mencionó anteriormente.

Al demostrar que *M. haemolytica* A2 produce MVs que acarrean proteasas y que también es capaz de secretarlas, se procedió a establecer de qué tipo son dichas enzimas. Para ello, se utilizaron diferentes inhibidores de proteasas, obteniendo como resultado que las MVs contienen dos tipos de proteasas, las de alto peso molecular, se inhibieron con PHMB, estableciendo que pertenecen a la familia de cisteín-proteasas. Por otro lado las bandas de bajo peso molecular se inhibieron con EGTA, correspondiendo estas últimas a metalo-proteasas.

Estos hallazgos son de gran importancia, ya que los sustratos usados en este trabajo son componentes vitales del hospedero. Por lo tanto *M. haemolytica* A2 secreta proteasas en MVs al medio extracelular, lo que hace posible que la bacteria evada el sistema inmune innato, para colonizar y causar enfermedad. De esta manera se esclarece aún más la patogenia de la enfermedad.

Se ha descrito la presencia de una gran cantidad de factores de virulencia enzimáticos que incluyen proteasas, fosfolipasa C, péptidoglicano-hidrolasas y pro-elastasa en el interior de MVs liberadas por *P. aeruginosa*, crecida sin condiciones estresantes.¹²⁴ Así como también Li y col. en 1998 identificaron péptidoglicano-hidrolasas en MVs liberadas por diferentes bacterias, las cuales fueron capaces de lisar otras bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Estos investigadores

propusieron que las enzimas presentes en las MVs podrían ayudarles a estas bacterias a obtener nutrientes e incrementar el espacio disponible, facilitando su colonización.

127

Destacando de nuevo este estudio, nuestro grupo de investigación describió que *A. pleuropneumoniae* secreta proteasas que están implicadas en la patogénesis de la pleuroneumonía contagiosa porcina. Estas proteasas degradan IgA, IgG, y hemoglobina porcinas.⁸⁷ También se ha purificado y caracterizado una metaloproteasa de 200-kDa, que es un antígeno común en todos los serotipos. Esta proteasa se pudo observar en MVs de esta bacteria y alrededor de ella.¹²⁹

Cabe señalar que este trabajo, es el primer reporte de *M. haemolytica* A2 que libera proteasas capaces de degradar lactoferrina bovina, las cuales son secretadas al medio extracelular en el SN de cultivo así como también arrastradas en MVs. Por otro lado es importante destacar que este estudio contribuye a enriquecer la información del contenido antigénico que arrastran las MVs de esta bacteria al ser utilizadas como un biológico vacunal prometedor en estudio.

IX. CONCLUSIONES

- Se encontraron proteasas de secreción acarreadas en MVs de *M. haemolytica* A2 observándose actividad a los pesos de 35, 54, 60, 76, 80, 160, 200 y una mayor que 250 kDa. También se demostró que estas proteasas son capaces de degradar hemoglobina y lactoferrina en su forma apo y holo.
- Se caracterizaron proteasas de secreción contenidas en MVs de *M. haemolytica* A2 estableciendo que las de alto peso molecular pertenecen a la familia de las cisteín-proteasas neutras y las de bajo peso molecular son metalo-proteasas neutras.
- La optima producción de dichas proteasas *in vitro* de *M. haemolytica* A2 es a las 24 hrs. de incubación a 37° C.
- Se obtuvieron MVs de *M. haemolytica* A2 secretadas al medio extracelular, de 50-200 nm de diámetro.
- Las principales proteínas comunes presentes en las proteínas precipitadas del SN a a partir de células completas y MVs de *M. haemolytica* A2 son las de 60 (posible adhesina) y 104 kDa (posible LKT).

BIBLIOGRAFÍA

1. Trigo, T. 1987. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Cien Vet*; 4:1-36.
2. Lo, R. Y. 2001. Genetics analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet. Microbiol.* 83:23-35.
3. Trigo, F. J. y Romero, M. J. 1986. La relevancia de las neumonías como causa de mortalidad en corderos. *Vet. Mex.* 17:116-119.
4. Highlander, S. K. 2001. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Front. Biosci.* 6:1128-1150.
5. Narayanan, S., Nagaraja, T., Chengappa, M., Stewart, G. 2002. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet. Microbiol.* 84:337-356.
6. Zecchinon, L., Fett, T., Desmecht D. 2005. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defense through a kiss of death mechanism. *Vet. Res.*36:133-156.
7. Murguía, O. M., Rojas, R. O., Morales, A. F. 2006. Inmunógeno para la prevención de neumonías en ovinos. ficha tecnológica por sistema producto, ovinos, INIFAP.
8. Flores C., F. 2003. La salud animal en ovinos como factor de valor agregado en la comercialización de la carne. Memorias del I Simposium Internacional de Ovinos de Carne; Hidalgo, México. P. p.70
9. www.sagarpa.com 2013
10. Miller, M. W. 2001. Infectious diseases of wild mammals. Pasteurellosis. Iowa State University Press, Ames, IA.,P. p. 330–339
11. Mosier, D. A. 1997. Bacterial pneumonia. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 13:483–493.
12. Gibbs, H. A., Allan, E. M., Wiseman, A. 1984. Experimental production of bovine pneumonic pasteurellosis. *Res. Vet. Sci.* 37: 154-166.
13. Donachie, W. 2001. Pasteurellosis Ovina. Moredum Research Institute. Pentlands Science Park Penicuik, Midlothian Scotland. PR. 2:2:36-44.
14. Díaz, A. E., Aguilar, R. F., Vázquez, N. J. 2005. Manual para el diagnóstico de enfermedades en ovinos y caprinos en México.

Comité de Salud y Producción Ovina y Caprina. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Salud Animal. Pag. 120.

15. Angen, O., Muters, R., Caugant, D. A., Olsen, J. E., Bisgaard, M. 1999. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov, Int. J. Syst. Bacteriol;49 Pt 1:67-86.
16. González, G. G. A. 2007. Comprendiendo la neumonía bovina producida por *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Virbac Al Día. Pag. 210-220.
17. Edwards, A. J. 1996. Respiratory diseases of feedlot cattle in the central USA, Bovine Pract. 305-7.
18. Aguilar, T. C. y Tórtora, P. J. 1989. Mortalidad de corderos en dos sistemas de producción ovina en Milpa Alta, D.F. Memorias del III Congreso Nacional de Producción Ovina, Tlaxcala, Tlaxcala, México. Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinos, México. 146-149.
19. Trigo, F. 1991. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. Vet. Méx. 22:131- 134.
20. Filion, L. G., Willson, P. J., Ohmann, H. B., Babiuk L. A. and Thomson, R. G. 1984. The Possible Role of Stress in the Induction of Pneumonic Pasteurellosis. Can. J. Comp. Med; 48: 268-274.
21. Yates, W. D. G. 1982. A review on infectious bovine rhinotracheitis sheeping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can. J. Comp. Med. 46: 225-263.
22. Juárez, B. F., Trigo, T. J. F., Chávez, G. G., Vargas, G. E. R. 2003. Identificación de agentes virales por Inmunohistoquímica en enfermedades respiratorias de bovinos en corral de engorda. Vet. Méx. Vol 34, No 001.
23. Master, L. B.R., Evermann, J. F. and Lemkuhl, H. D. 1987. Identification of ovine adenovirus types five and six in an epizootia of respiratory tract disease in recently weaned lambs. J. Am. Vet. Med. 190: 1545-1547.

24. López, A., Maxie, M. G., Savan, M., Ruhnke, H. L., Thomson, R. G., Barnum, D. A. and Geissinger, H. D. 1982. The pulmonary clearance of *Pasteurella haemolytica* in calves infected with bovine virus diarrhoea or *Mycoplasma bovis*. *Can J. Comp. Med.* 46: 302-306.
25. Dereck, A. M., Simons, K. R., Confer, A. W., Panciera, R. J., Clinkenberd, K. D., 1989. *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. *Infect. Immun.* 57(3):711-6.
26. Tefera, G., Smola, J. 2001. *Pasteurella haemolytica* complex of *Pasteurella* sensu stricto as a new genus *Mannheimia*: changes in taxonomy. *Vet. Med.* 46:119,120.
27. Quiroz, M. M. A., 2006. Neumonías en pequeños rumiantes. Departamento de Producción Animal: Rumiantes, Universidad Nacional Autónoma de México. P.p 230-250.
28. Morales, Á. J. F., 2005. Muerte Súbita Asociada a Pasteurellosis Neumónica en Bovinos. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal. INIFAP. México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
29. Blanco, V. F. J., Trigo, T. F. J., Jaramillo, M. L., Aguilar, R. F., Graciela. T. P. G., Suárez, G. F. 1993. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. *Vet. Méx.* 24 (2): 107-112.
30. Jaramillo, A. C. J., Trigo, T. F. J., Suárez, G. F. 2009. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *Vet. Méx.*, 40 (3) 293-314.
31. Gartner, L. P., Hiatt, J. L. 2002. Texto atlas de histología. Editorial Mcgraw-Hill interamericana. Méx. Pag. 320-330.
32. Reynolds, H. Y. 1991. Immunologic system in the respiratory tract. *Physiol. Rev.* 71: 1117-1133.
33. Reynolds, H. Y. 1994. Normal and Defective Respiratory Host Defense; en Pennington, J. *Respiratory Infections. Diagnosis and Management.* Raven Press, USA, 3ª Ed. Pág. 1-34.

34. Fraser, R. G., Paré, J. A. P., Paré, P. D., Fraser, R. S. and Genereux, G. 2005. Diagnóstico de las enfermedades del Tórax. El Tórax normal. Editorial Médica Panamericana. 3ª Ed. Pág. 2-67.
35. Rutland, J., Griffin, W. M. y Cole, P. J. 1982. Human ciliary beat frequency in epithelium from intrathoracic and extrathoracic airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 125: 100-105.
36. Owen, C. A., Campbell, E. J., Hill, S. L. y Stockley, R. A. 1992. Increased adherence of monocytes to fibronectin in bronchiectasis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146: 626-631.
37. Daniele, R. P., Altose, M. D. y Rowland, D. R. 1975. Immunocompetent cells from the lower respiratory tract of normal human lungs. *J. Clin. Invest.* 59: 986-996.
38. Hunninghake, G. K. y Crystal, R. G. 1981. Pulmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. *N. Engl. J. Med.* 305: 429-434.
39. Hunninghake, G. K., Gadek, J. E., Kawanami, O., Ferrans, V. J. y Crystal, R. G. 1979. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Amer. J. Pathol.* 97: 149-206.
40. Coonrod, J. D. 1986. The role of extracellular bactericidal factors in pulmonary host defense. *Sem. Respir. Infect.* 1: 118-129.
41. Sibille, Y. y Reynolds, H. Y. 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury: state of the art. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 471-501.
42. Shanley, T., Warner, R. y Ward, P. 1995. The role of cytokines and molecules in the development of inflammatory injury. *Molecular Medicine Today.* 40-45.
43. Perlo, S., Jalowayski, A. A., Durand, C. M. y West, J. B. 1975. Distribution of red and white blood cells in alveolar walls. *J. Appl. Physiol.* 38: 117-124.
44. Reynolds, H. Y. 1988. Immunoglobulin G and its function in the human respiratory tract. *Clin. Proc.* 63: 161-174.
45. Nathan, C. F. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326.

46. Radostits O. M., Gay, C. C., Blood, D. C. and Hinchcliff, K. W. 2000. Veterinary Medicine: A Textbook of Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses, W. B. Saunders. Pág. 220.
47. Malazdrewich, C. P., Thumbikat y Maheswaran, S. K. 2004. Protective effect of dexamethasone in experimental bovine pneumonic mannheimiosis. Microb. Pathog. 36:227–236.
48. Riquelme, Z. E. 2011. Evaluación del efecto de la Leucotoxina de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 secretada a partir de Microvesículas en cultivo celular de mononucleares de ovino. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios Superiores Cuautitlán. Pág. 180.
49. Jones, T. C., Hunt, R. D. and King, N. W. 1997. Veterinary Pathology. Williams y Wilkins. Mosby Press. Pág. 110.
50. Ngatia, T. A., Kimberling, C. V., Johnson, L. W., Whiteman, C. E. and Lauermann, L. H. 1986. Pneumonia in goats following administration of live and heat killed *Pasteurella haemolytica*. Journal of Comparative Pathology. 96:557–564.
51. Burrows, L. L., Winfield, O. E, Lo. R.Y. 1993. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. Infect. Immun. 61:5001-5007.
52. Fedorova, N. D., Highlander S. K. 1997. Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin. Infect. Immun. 65:2593-2598.
53. Marciel, A. M., Highlander, S. K. 2001. Use of operon fusions in *Mannheimia haemolytica* to identify environmental and cis-acting regulators of leukotoxin transcription. Infect. Immun. 69:6231-6239.
54. Jeyaseelan, S., Sreevatsan, S., Maheswaran, S. K. 2002. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. Anim. Health Res. Rev. 3:69-82.
55. Leite, F., O'brien, S., Sylte, M. J., Page, T., Atapattu. D., Czuprynski, C. J. 2002. Inflammatory cytokines enhance the interaction of *Mannheimia haemolytica*

- leukotoxin with bovine peripheral blood neutrophils in vitro. *Infect. Immun.* 70:4336-4343.
56. Highlander, S. K., Fedorova, N. D., Dusek, D. M., Panciera, R., Alvarez, L. E., Rinehart, C. 2000. Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect. Immun.* 68:3916-3922.
 57. Sleim, R. S. 2005. Review: Major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) Haemolytica* isolated from animal origin. *BJVM*, 11: 3. 139-160.
 58. Adlam, C., J. M. Knights, A. Mugridge, J. M. Williams, and J. C. Lindon. 1987. Production of colominic acid by *Pasteurella haemolytica* serotype A2 organisms. *FEMS Microbiol.* 42, 23-25.
 59. Chae, C. H., M. J. Gentry, A. W. Confer, and G. A. Anderson. 1990. Resistance to host immune defense mechanisms afforded by capsular material of *Pasteurella haemolytica*, serotype 1. *Vet Microbiol* 25, 241-251.
 60. Costerton, J.W.; Cheng, K.-J.; Geesey, G.G.; Ladd, T.I.; Nickel, J.C.; Dasgupta, M. and Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilm in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:435-464.
 61. Ophir, T. and Gutnick, D. 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:740-745.
 62. Moxon, E. R. and Kroll, J. S. 1990. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* 150:65-85.
 63. Barrallo, S., Reglero, A., Nuin, B. R., Martinez B., H., Rodriguez L. A., and Ferrero, M. A. 1999. Regulation of capsular polysialic acid biosynthesis by temperature in *Pasteurella haemolytica* A2. *FEBS Lett* 445, 325-328.
 64. Jaramillo, M. L., Zenteno, E., Trigo, F. J. 1999. Mechanisms of pathogenicity and adhesion in *Pasteurella haemolytica*. *Rev Lat-Am Microbiol.* 41:105-116.
 65. Jaramillo, L., Díaz, F., Hernández, P., Debray, H., Trigo, F., Mendoza, G., Zenteno, E. 2000. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycob.* 10:31-37.

66. Pandher, K., Murphy, G. L. 1996. Genetic and immunological analyses of a 38 kDa surface-exposed lipoprotein of *Pasteurella haemolytica* A1. Vet. Microbiol. 51:331- 341.
67. Purdy, C. W., Straus, D. C., Struck, D., Foster, G. S. 1993. Efficacy of *Pasteurella haemolytica* subunit antigens in a goat model of pasteurellosis. Am. J. Vet. Res. 54:1637-1647.
68. Morton, R. J., Panciera, R. J., Fulton, R. W., Frank, G. H., Ewing, S. A., Homer, J. T., Confer A. W. 1995. Vaccination of cattle with outer membrane protein-enriched fractions of *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental challenge exposure. Am. J. Vet. Res. 56:875-879.
69. Squire, P. G., Smiley, D. W. And Croskell, R. B. 1984. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. Infec. Immun. 37:82-88.
70. Donachie, W. 1997. Vaccines against *Pasteurella*. World Association of Microbiologists Immunologists and Specilists in Infection Disease. 14th International Symposium, Edinburg Annual Scientific Report. Pág. 215.
71. Iovane, G., Galdiero, M., Vietello, M. And De Martino, L. 1998. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins of bovine neutrophils. FEMS, Immun. Med. Microbiol. 1:29-36.
72. Paulsen, D. B., Confer, A. W., Clinkenbeard, K. D. and Mosier, D. A. 1995. *Pasteurella haemolytica* Lipopolysaccharide-induced cytotoxicity in Bovine pulmonary artery endothelial monolayers: Inhibition by indomethacin. Vet. Pathol. 32: 173.
73. Yoo, H. S., Maheswaran, S. K., LIN, G., Townsend, E. L. and Ames T. R. 1995. Induction of inflammatory cytokines in Bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide. Infection and immunity, 63(2) 381–388.
74. Kuhnert, P., Christensen, H. 2008. Pasteurellaceae Biology, Genomics, and Molecular Aspects. Caister Academic Press. Norfolk UK. Pág. 280.
75. McClenahan, D., Hellenbrand, K., Atapattu, D., Aulik, N., Carlton, D., Kapur, A., and Czuprynski, C. 2008. Effects of lipopolysaccharide and *Mannheimia*

- haemolytica* leukotoxin on bovine lung microvascular endothelial cells and alveolar epithelial cells. Clin Vacc Immun. 15(2) 338–347.
76. Tizard, I. R. 2009. Introducción a la inmunología veterinaria. Octava edición. Ed. Elsevier. Barcelona España. Pag. 292.
77. Lawrence, P. K., Kittichotirat, W., Bumgarner, R. E., McDermott, J. E., Herndon, D. R., Knowles, D. P. and Srikumaran S. 2010. Genome Sequences of Mannheimia *haemolytica* Serotype A2: Ovine and Bovine Isolates. J Bacter. 192(4) 1167–1168.
78. Weigu, L., A., B. K., C. D. W., Mansfield K, Lagerquist J., Foreyt W. and Srikumaran S. 2007. *Manhhemimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin utilizes CD18 as its receptor on bighorn sheep leukocytes. JWD. 43(1):75-81.
79. McClenahan, D., Hellenbrand, K., Atapattu, D., Aulik, N., Carlton, D., Kapur, A., and Czuprynski, C. 2008. Effects of lipopolysaccharide and *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on bovine lung microvascular endothelial cells and alveolar epithelial cells. Clin Vacci Imm. 15(2) 338–347.
80. Supuran, C. T., Scozzafava, A. y Clare, B. W. 2002. Bacterial protease inhibitors. Med. Res. Rev. 22: 329-372.
81. Hoge, A. Pelzer, Rosenau, F., Wilhelm, S. 2010. Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Current research, Technology and education Topics in applied Microbiology and microbial Biotechnology. Ed. A. Méndez-Vilaz. Pag. 211.
82. Barrett, A. J, Rawlings, N. D., Woessner, J. F. 2004. Handbook of Proteolytic Enzymes. 2e ed. London, Academic Press. Pág. 100.
83. Maeda, H. and Yamamoto, T. 1996. Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. Biol. Chem. Hoppe Seyler 377:217-226.
84. Grund, F. J., Plaut, A. and Wright, A. 1987. *Haemophilus influenza* immunoglobulin A1 protease genes: cloning by plasmid integration-excision, comparative analyses, and localization of secretion determinants. J. Bacteriol. 169:4442-4450.

85. Tomasi, T. B., Jr. And Yurchak, A. M. 1972. The synthesis of secretory component by the human thymus. *J. Immunol.* 108:1132-1135.
86. Negrete, A. E., Tenorio, V. R. and De la Garza, M. 1999. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida*; isolates. *Curr. Microbiol.* 38:64-67.
87. Negrete, A. E., Tenorio, V. R., Serrano, J. J., García, C. and De la Garza, M. 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can. J. Vet. Res.* 58, 83-86.
88. Negrete, A. E., Pacheco, S. V., Paniagua, G. L., Mendez, A. P., Caballero, J. L., Marquez, V. M. and Tenorio, V. R. 2004. Metalloproteases secreted by *Actinobacillus suis*. *Curr. Microbiol.* 49, 55-58.
89. Rivero, G. P. C., Cruz, C. V. Alonso, P. S., Vaca, S. and Negrete, A. E. 2005. *Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases. *Can J. Microbiol.* 51: 893-896.
90. Hirst, G. K. 1941. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science.* 94: 22-23.
91. Burnet, F. M., Mccrea, J. F. y Stone, J. D. 1946. Modification of human red cells by virus action. I. The receptor gradient for virus action in human red cells. *Br. J. Exp. Pathol.* 27: 228-236.
92. Heimer, P. y Meyer, K. 1956. Studies on sialic acid of submaxillary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42: 728-734.
93. Gottschalk, A. 1957. Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*. *Biochem. Biophys. Acta.* 23: 645-646.
94. Cabezas, J. A.; Reglero, A. Y Calvo, P. 1983. Glycosidases (fucosidases, galactosidases, glucosidases, hexoaminidases and glucuronidase from some molluscs and vertebrates, and neuraminidase from virus). *Int. J. Biochem.* 15: 243-259.
95. Corfiel, A. P. 1992. Bacterial sialidases-roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiol.* 2: 509-521.
96. Fernández, V. 2007. Estudios Moleculares sobre la neuraminidasa de *Mannheimia haemolytica* 2. Secretariado de Publicaciones, Universidad de León, León, España. Pag. 207.

97. Lichtensteiger, C. A. y Vimr, E. R. 1997. Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. FEMS Microbiol. 152: 269-274.
98. Roggentin, P.; Kleineidam, R. y Schauer, R. 1995. Diversity in the properties of two sialidase isoenzymes produced by *Clostridium perfringens*. Biol. Chem. Hoppe Seyler. 376: 569-575.
99. Straus, D. C., Jolley, W. L., Purdy C. W. 1993. Characterization of Neuraminidases Produced by Various Serotypes of *Pasteurella haemolytica*. Infection And Immun. 61(11)4669-4674.
100. Frank, G. H., and L. B. Tabatabai. 1981. Neuraminidase activity of *Pasteurella haemolytica* isolates. Infect. Immun.32:1119-1122.
101. Abdullah, K. M., Lo, R. Y. and Mellors, A. 1990. Distribution of glycoprotease activity and the glycoprotease gene among serotypes of *Pasteurella haemolytica*. Biochem. Soc. Trans. 18:901-903.
102. Otulakowski, G. L., Shewen, P. E., Udoh, A. E., Mellors, A. and Wilkie., B. N. 1983. Proteolysis of sialoglycoprotein by *Pasteurella haemolytica* cytotoxic culture supernatant. Infect Immun 42:64-70.
103. Abdullah, K. M., Udoh, E. A. , Shewen, P. E., Mellors, A. 1992. A neutral glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-sialoglycoproteins. Infect. Immun. 60:56-62.
104. Lee, C. W., Lo, R. Y., Shewen, P. E., Mellors, A. 1994. The detection of the sialoglycoprotease gene and assay for sialoglycoprotease activity among isolates of *Pasteurella haemolytica* A1 strains, serotypes A13, A14, T15 and A16. FEMS Microbiol. 121:199-205.
105. Lee, C. W., Shewen, P. E. 1996. Evidence of bovine immunoglobulin G1 (IgG1) protease activity in partially purified culture supernate of *Pasteurella haemolytica* A1. Can. J. Vet. Res. 60:127-132.
106. Lee, C. W., Shewen, P. E., Cladman, W. M., Conlon, J. A., Mellors, A., LO, R. Y. 1994. Sialoglycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1: detection of antisialoglycoprotease antibodies in sera of calves. Can. J. Vet. Res. 58:93-98.

- 107.** Nyarko, K. A., Coomber, B. L., Mellors, A., Gentry, P. A. 1998. Bovine platelet adhesion is enhanced by leukotoxin and sialoglycoprotease isolated from *Pasteurella haemolytica* A1 cultures. *Vet. Microbiol.* 61:81-91.
- 108.** Boyce, J., Lo, R., Wilkie, I., Adler, B. 2004. *Pasteurella* and *Mannheimia* in Pathogenesis of Bacterial Infectious in Animals. Carlton, Australia: Blackwell Publishing, 273-294.
- 109.** Sutherland, D. R., Abdullah, K. M., P. Cyopick, and Mellors A. 1992. Cleavage of the cell-surface O-sialoglycoproteins CD34, CD43, CD44, and CD45 by a novel glycoprotease from *Pasteurella haemolytica*. *J. Immunol.* 148:1458-1464.
- 110.** Conlon, J., Shewen, P., Lo, R. Y. 1991. Efficacy of recombinant leukotoxin in protection against pneumonic challenge with live *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect Immun.* 59:587-591.
- 111.** Henderson, I. R., Navarro, G. F., Desvaux, M., Fernández, R. C., and Ala'Aldeen, D. 2004. Type V protein secretion pathway: The autotransporter store. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 692-744
- 112.** González, B., Dreyfus, G. 2003. Sistema de secreción de proteínas en las bacterias Gram-negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico.* 27:45-63.
- 113.** Koster, M., Bitter, W. and Tommassen, J. 2000. Protein secretion mechanism in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* 290:325-331.
- 114.** Thanasi, D. G. and Hultgren, S. J. 2000. Multiple pathways allows protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Op. Cell. Biol.* 12:420-430.
- 115.** Lee, V. T. and Schneewind, O. 2001. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes and Develop* 15:1725-1752.
- 116.** Unterweger, D., Kitaoka, M., Miyata, S. T., Bachmann, V., Brooks, T. M., Moloney, J., Sosa, O., Silva, D., Gonzalez, J. D., Provenzano, D., Pukatzki, S. 2012. Constitutive Type VI Secretion System Expression Gives *Vibrio cholerae* Intra- and Interspecific Competitive Advantages. *PLOS ONE.* 7(10)48320.
- 117.** Miller, S., Bader, M., Guina, T. 2003. Bacterial vesicle formation as a mechanism of protein transfer to animals. *Cell* 115: 2-3.

118. Devoe, I., Gilchrist, J. 1973. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitides*. J. Exp. Med. 138: 1156-1167.
119. Mayrand, D., and D. Grenier. 1989. Biological activities of outer membrane vesicles. Can. J. Microbiol. 35:607–613.
120. McBroom, A., and M. J. Kuehn. 2005. Outer membrane vesicles. Ed. EcoSal. ASM Press, Washington, DC. Pág. 115.
121. Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D., Doyle, R. 1998. On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. 37:223-228.
122. González R. C., Tenorio G. V., Trigo T. F., Reyes L. M., León S. N., Godínez V. D., De la Garza A. M. 2007. Characterization of Microvesicles of *Mannheimia haemolytica* serotype A1 (Reference Strain) and Serotype A2 (Field Isolate). J. Anim. Vet. Adv. 6: 1172-1182.
123. Kadurugamuwa, J., Beveridge, T. 1997. Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effects of aminoglycoside antibiotics on their release. J. Antimicrob, Chemother. 40: 615-621.
124. Kadurugamuwa, J., Beveridge, T. 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. J. Bacteriol. 177: 3998-4008.
125. Ellis, T. N. and Kuehn, M., J. 2010. Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 74(1) 81–94.
126. Beveridge, T. J. 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. J. Bacteriol. 181:4725–4733.
127. Li, Z., Clarke, A. and Beveridge, T. 1998. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. J. Bacteriol. 180: 478-5483.

- 128.** Grenier, D., Belanger, M. 1991. Protective effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles against bactericidal activity of human serum. *Infect. Immun.* 59:3004-3008.
- 129.** Negrete, A. E., García, R. M., Reyes, M. E., Godínez, D., De la Garza, M. 2000. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS Micro.* 191:109-113.
- 130.** Gankema, H., J. Wensink, P. A. Guinee, W. H. Jansen, and B. Witholt. 1980. Some characteristics of the outer membrane material released by growing enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 29:704–713.
- 131.** Kadurugamuwa, J. L., and T. J. Beveridge. 1998. Delivery of the non-membrane-permeative antibiotic gentamicin into mammalian cells by using *Shigella flexneri* membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1476–1483.
- 132.** Kato, S., Kowashi, Y. and Demuth, D. R. 2002. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb. Pathog.* 32:1–13
- 133.** Heczko, U., Smith, V. C., Meloche, R. M., Buchan, A. M. and Finlay, B. B. 2000. Characteristics of *Helicobacter pylori* attachment to human primary antral epithelial cells. *Microbes Infect.* 2:1669–1676.
- 134.** Keenan, J., Day, T., Neal, S., Cook, B., Perez-Perez, G., Allardyce, R. and Bagshaw, P. 2000. A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 182:259–264.
- 135.** Patrick, S., McKenna, J. P., O'Hagan, S. and Dermott, E. 1996. A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. *Microb. Pathog.* 20:191–202.
- 136.** Whitmire, W. M., and Garon, C. F. 1993. Specific and nonspecific responses of murine B cells to membrane blebs of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61:1460–1467.
- 137.** Fiocca, R., Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T. L. and Solcia E. 1999. Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a

specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J. Pathol.* 188:220–226.

138. Ricci, V., Chiozzi, V., Necchi, V., Oldani, A., Romano, M., Solcia, E. and Ventura, U. 2005. Free-soluble and outer membrane vesicle-associated VacA from *Helicobacter pylori*: two forms of release, a different activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337:173–178.
139. Demuth, D. R., James, D., Kowashi, Y. and Kato, S. 2003. Interaction of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer membrane vesicles with HL60 cells does not require leukotoxin. *Cell. Microbiol.* 5:111–121.
140. Garcia-del Portillo, F., Stein, M. A. and Finlay, B. B. 1997. Release of lipopolysaccharide from intracellular compartments containing *Salmonella typhimurium* to vesicles of the host epithelial cell. *Infect. Immun.* 65:24–34.
141. Galka, F., Wai, S. N., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Uhlin, B. E. and Steinert, M. 2008. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect. Immun.* 76:1825–1836.
142. Alaniz, R. C., Deatherage, B. L., Lara, J. C. and Cookson, B. T. 2007. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J. Immunol.* 179:7692–7701.
143. Ismail, S., Hampton, M. B. and Keenan, J I. 2003. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 71:5670–5675.
144. Bauman, S. J., and Kuehn, M J. 2006. Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes Infect.* 8:2400–2408.
145. Galdiero, F., De L'ero, G. C., Benedetto, N., Galdiero, M. and Tufano, M. A. 1993. Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun.* 61:155–161.
146. Galdiero, M., Folgore, A., Moliterno, M. and Greco, R. 1999. Porins and lipopolysaccharide (LPS) from *Salmonella typhimurium* induce leucocyte

- transmigration through human endothelial cells in vitro. Clin. Exp. Immunol. 116:453–461.
- 147.** Tufano, M. A., Rossano, F., Catalanotti, P., Liguori, G., Capasso, C., Ceccarelli, M. T., and Marinelli, P. 1994. Immunobiological activities of *Helicobacter pylori* porins. Infect. Immun. 62:1392–1399.
- 148.** Tufano, M. A., Rossano, F., Catalanotti, P., Liguori, G., Marinelli, A., Baroni, A. and Marinelli, P. 1994. Properties of *Yersinia enterocolitica* porins: interference with biological functions of phagocytes, nitric oxide production and selective cytokine release. Res. Microbiol. 145:297–307.
- 149.** Ayalew, S., W, A., C., Shrestha, B., Wilso, A. E. and Montelongo, M. 2012. Proteomic Analysis and Immunogenicity of *Mannheimia haemolytica* Vesicles. Clin. Vaccine. Immunol. 20(2): 191–196.
- 150.** Ávalos, G. C. 2011. Evaluación estructural del tejido pulmonar, linfocitos tisulares y macrófagos alveolares de ovino en presencia de Microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* A2. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Pag. 220-250.
- 151.** Morales A. J. F., Tenorio G. V. R., De la Garza A. M., Tortora P. J. L., Trigo T. F. J. 1998. Presencia de proteasas de secreción de *Pasteurella haemolytica* aisladas de neumonías en bovinos y ovinos. 34 Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Querétaro, Qro. (México), 29-31.
- 152.** Van, O. C. J. 1989. On the Mechanism of the Cold Ethanol Precipitation Method of Plasma Protein Fractionation. J. Prot. Chem. 8(5)150-170.
- 153.** Mena, R. E., Vázquez, C., Vaca, S., García, O., Pérez, M. V., Pérez, M. A., Ibarra, J., De la Garza, M., Zenteno, E., Negrete, A. E. 2004. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110 kDa putative RTX-protein. FEMS Microbiol. Lett. 232: 83.87.
- 154.** Fernández, L. L. C., Rojas, A. N. G., Roldán, C. T. G., Ramírez, I. M. E., Zegarra, M. H. G., Hernández, R. U., Reyes, Á. R. J., Hernández, D. F., Arce, O. J. M. 2006. Manual de Técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Editorial Instituto mexicano del Petróleo. P-p 118-121.

- 155.** Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. *Anal Biochemistry* 72:248-254.
- 156.** Negrete, A. M., Tenorio, V. R., Guerrero, A. L., Garcia, R. M., Reyes, M. E. and De la Garza, M. 1998. Purification and Characterization of a Protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1, An Antigen Common to All the Serotypes. *Can J Vet Res*; 62: 183-190.
- 157.** González, R. C., Trigo, T. J. F., Tórtora, P. J. L., Morales, A. F. J. 2002. Perfil serológico contra antígenos de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* en corderos clínicamente enfermos de neumonía y desafiados experimentalmente. Tesis de Maestría; UNAM, FES-Cuautitlán.
- 158.** Clinkenbeard, K. D., Moiser, D. A., and Confer, A. W. 1989. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. *Infect. Immun.* 57: 420-425.