



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Determinación del complejo principal de histocompatibilidad clase II  
en células dendríticas de ovino en presencia de vesículas de  
membrana externa de *Mannheimia haemolytica* A2**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA :

**ELIA RIQUELME ZUBIRÍA**

**TUTORA:**

**Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**COMITÉ TUTORAL**

**Dr. Victor Rúben Tenorio Gutiérrez**

**Dr. Efrén Díaz Aparicio**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

# ÍNDICE

Página

Resumen.....	2
--------------	---

## INTRODUCCION

1.1 Antecedentes de Manheimiosis.....	3
1.2 Antecedentes de <i>Mannheimia haemolytica</i> .....	6
1.3 <i>Mannheimia haemolytica</i> .....	8
1.2.1 Factores de virulencia de <i>M. haemolytica</i> .....	8
1.3 Vesículas de membrana externa bacterianas (MVs).....	10
1.4 Inmunidad del hospedero .....	14
1.4.1 Células dendríticas .....	16
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
4.1 Objetivos particulares .....	18
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
5.1 Obtención de vesículas de membrana externa (MVs) .....	19
5.2 Obtención de proteína de membrana externa (PME) .....	19
5.3 Precipitación de proteínas en solución, en presencia de detergentes y lípidos .....	22
5.4 Cuantificación de proteína por método de Bradford.....	22
5.5 Preparación de la muestra para el corrimiento electroforético .....	23
5.6 Condiciones para corrimiento electroforético.....	23
5.7 Tinción negativa para <i>Mannheimia haemolytica</i> A2 y MVs.....	24
5.8 Obtención de células dendríticas a partir de monocitos sanguíneos ....	24

5.9 Exposición de células dendríticas con MVs de <i>M. haemolytica</i> .....	25
<b>6. RESULTADOS</b> .....	27
6.1 SDS-PAGE al 12% de MVs y fracción de PME .....	27
6.2 Tinción negativa de <i>Mannheimia haemolytica</i> A2 y MVs. ....	28
6.3 Citometría de flujo.....	30
6.3.1 Mononucleares ovinas obtenidas por Gradiente de densidad .....	30
6.3.2 Purificación y Caracterización de Monocitos .....	32
6.3.3 Monocitos estimulados con IL 4 y GM-SF. ....	33
6.3.4 Expresión de Marcadores de Superficie de CDs .....	35
6.3.5 Marcadores de Superficie en CDs humanas.....	37
6.3.6 Tratamiento de CDs de ovino con MVs de <i>M. haemolytica</i> A.....	39
6.3.7 Evaluación de la expresión de CD14, Cd1w2, MHC-II y CD86 .....	41
6.3.8 Morfología durante diferenciación celular.....	46
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	47
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	52
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	53

## RESUMEN

La neumonía en animales domésticos es un padecimiento relevante, ya que afecta directamente al proceso productivo de las explotaciones comerciales, no sólo por la muerte de los animales, sino también por la disminución en la ganancia de peso, la menor eficiencia en la conversión alimenticia y los costos elevados del tratamiento de los animales afectados. *Mannheimia haemolytica* es el agente que comúnmente se asocia a problemas neumónicos de rumiantes; entre sus factores de virulencia se encuentran la leucotoxina, el lipopolisacárido, las adhesinas, una neuroaminidasa, plásmidos de resistencia a antibióticos, algunas de las proteínas de membrana externa, y las vesículas de membrana externa (MVs). Las bacterias Gram-negativas producen MVs, estas estructuras consisten en una bicapa de fosfolípidos que durante su proceso de formación arrastran constitutivamente todos los componentes de la membrana externa y secretan los factores de virulencia contenidos en ellas.

Las MVs han sido identificadas en múltiples géneros bacterianos incluyendo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae* y *Porphyromonas gingivalis*, entre otras especies. En 2007 nuestro grupo de investigación (González y col.) identificó y caracterizó las MVs de *M. haemolytica* A2, determinando que arrastran sus principales factores de virulencia. Por otra parte, se han reportado en numerosos estudios la capacidad inmunogénica de las MVs. En el 2013, Roier y col., inocularon MVs de *M. haemolytica* serotipo A1 a ratones por vía intranasal, para evaluar el aumento de títulos de inmunoglobulinas, demostrando que las MVs son capaces de inducir respuestas inmunes humorales y de mucosas.

Las células dendríticas (CDs) son fundamentales en el inicio de una respuesta inmune en contra de patógenos microbianos *in vivo*, debido a que son consideradas células profesionales presentadoras de antígenos (APC). El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad inmunomoduladora de las MVs de *M. haemolytica* A2 sobre componentes del sistema inmune innato de ovino, por lo que fue necesario tener un modelo de interacción entre CDs y MVs en condiciones *in vitro*. Se obtuvieron MVs de *M. haemolytica* y se corroboró su patrón de proteínas mediante SDS-PAGE. Se realizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) a dichas estructuras para confirmar su presencia. Además, se estandarizó la técnica de obtención de monocitos y su posterior diferenciación a CDs ovinas. Se utilizó citometría de flujo para la fenotipificación de CDs mediante marcadores de superficie celular. Finalmente se procedió al tratamiento de CDs con MVs y se determinó la expresión del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) y moléculas co-estimuladoras (CD86) en las CDs de ovino en presencia de MVs de *M. haemolytica* A2. Se determinó que las MVs de *M. haemolytica* A2 inducen el aumento en la expresión del MHC-II y de CD86 con respecto a las células que no fueron tratadas. Lo anterior nos permite afirmar la eficiente estimulación por parte de las MVs sobre las CDs y el importante papel inmunomodulador de las MVs de *M. haemolytica* serotipo A2 sobre la respuesta inmune innata de ovinos.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 ANTECEDENTES DE LA Mannheimiosis

Las enfermedades respiratorias causantes de neumonía, afectan significativamente las unidades de producción de bovinos y ovinos en el mundo, ya sea en forma individual o generalizada. Habitualmente estas enfermedades engloban etiologías de carácter multifactorial, asociado a diferentes factores predisponentes. Por esta razón, las neumonías representan una de las principales causas de muerte en dichos animales, generándose potenciales pérdidas económicas en la producción de ganado, además del costo por tratamiento y pérdida de la eficiencia en ganancia de peso.<sup>1</sup>

El Complejo Neumónico Respiratorio (CNR) es el conjunto de etiologías que predisponen y desencadenan un cuadro neumónico agudo severo. *M. haemolytica* es la principal bacteria aislada a partir del CNR, la cual está presente en una pequeña proporción como flora de la nasofaringe del ganado sano. Las infecciones respiratorias concurrentes, tanto de tipo viral como bacteriano, favorecen a *M. haemolytica* para colonizar el tracto respiratorio hasta llegar a tejido pulmonar. Además, en los animales susceptibles se requiere de la presencia de factores predisponentes para desarrollar el cuadro neumónico característico. Es por ello que los términos “Complejo Respiratorio Infeccioso”, “Síndrome Respiratorio Bovino” y “Complejo Neumónico Respiratorio”, han sido utilizados con mayor frecuencia en los últimos años, aunque tienen el defecto de ser demasiado generales, pues implican la naturaleza multifactorial de esta enfermedad. Al igual que otras enfermedades multifactoriales, la presentación y severidad de las neumonías se pueden atribuir a interacciones complejas entre diversos agentes infecciosos y factores predisponentes, así como al estado inmunológico del animal. Los factores ambientales mejor reconocidos como predisponentes son: el estrés producido por la movilización de los animales, el ambiente donde se les aloja (hacinamiento, temperatura, humedad), el manejo (descole, destete), y su nutrición. Considerando que *M. haemolytica* es el principal patógeno bacteriano asociado al CNR y para fines de este trabajo, se nombrará a este complejo como Mannheimiosis Ovina a lo largo de todo el texto.<sup>1,2</sup>

Los microorganismos asociados para desencadenar la Mannheimiosis Bovina y Ovina son virus, bacterias y micoplasmas, entre otros. Sin embargo, el sinergismo de la interacción virus-bacteria es considerado uno de los factores clave para desencadenar la colonización por *M. haemolytica* en el pulmón. Entre los principales agentes virales involucrados se encuentran el virus Herpes Bovino 1 (HB1) responsable de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, el virus de Parainfluenza 3 (PI3) y el virus Respiratorio Sincitial Bovino (RSB). En la interacción virus-bacteria, el animal desarrolla una neumonía clínica, la cual es responsable de su muerte.<sup>1,2</sup>

Las inoculaciones experimentales de bovinos y ovinos con diferentes virus, micoplasmas y bacterias han permitido conocer la patología que produce cada agente, así como el efecto sinérgico que desarrollan en ciertos casos. Por lo general, los virus respiratorios (HB1, PI3 y RSB) producen lesiones de poca intensidad, caracterizadas por bronquitis y alveolitis; aunque en el caso de la infección con el virus de HB1 también se observa rinitis y traqueítis. Cuando se llegan a observar lesiones microscópicas, éstas corresponden a discretas zonas multifocales de color rojo, localizadas en la porción craneoventral del pulmón. Ahora bien, si la infección secundaria por *M. haemolytica* logra establecerse, la patología pulmonar cambia drásticamente. Las lesiones se distribuyen en la porción craneoventral de ambos pulmones, afectando en ocasiones más del 50% de la superficie total pulmonar. La pleura contiene un exudado serofibrinoso, con los septos interlobulillares dilatados debido al depósito de fibrina y al edema. Los bronquios contienen fibrina, edema, o bien, exudado purulento. Al corte del pulmón se observa consolidación (solidificación) roja en la fase aguda, a veces con hemorragias; mientras que en la etapa crónica se aprecia consolidación gris, a veces acompañada de algunos abscesos multifocales y adherencias pleurales.<sup>1,2</sup>

La incidencia de las infecciones respiratorias es muy alta, pero el índice de mortalidad puede ser muy variable. De acuerdo con un estudio sobre la incidencia de la enfermedad en becerras inglesas, los tratamientos contra las neumonías representaron el 50% de todos los tratamientos recibidos. En México, la mayor parte (un 63%) de los establos presenta padecimientos respiratorios en el ganado bovino.<sup>3,4</sup>

En el caso particular de los ovinos, un estudio realizado en México establece a las neumonías como la segunda causa principal de muerte, seguida de padecimientos del aparato digestivo.<sup>5</sup> Por otro lado, en un estudio realizado en razas Pelibuey y Blackbelly, se señala que la neumonía es una de las principales causas de muerte en los corderos lactantes<sup>6</sup>. Otros estudios indican que el 26.9% de las muertes de los ovinos se asoció a esta causa. Trabajos similares mencionan que la mortalidad debida a la neumonía en pequeños rumiantes fue del 20.2%.<sup>3</sup>

Los animales que se recuperan de la infección comúnmente presentan deficiente desarrollo durante la etapa de engorda,<sup>3</sup> por lo que el control eficaz de la neumonía producida por *M. haemolytica* requiere de una combinación entre un rápido diagnóstico definitivo, vacunas eficaces, y buenas prácticas terapéuticas.<sup>2</sup> Debido a que se genera escasa inmunidad a los diferentes agentes infecciosos involucrados, los programas de vacunación contra esta enfermedad tienen efectos muy limitados. La terapia con antibióticos es cara<sup>5,6</sup> y son empleados excesivamente en la industria del ganado, tanto de manera profiláctica como terapéutica, pero su eficacia varía debido a diagnósticos inconsistentes, malos regímenes de tratamiento y el desarrollo de resistencia al antibiótico por parte de la bacteria.<sup>5-7</sup>

Las vacunas para proteger a los animales del desarrollo de la Mannheimiosis neumónica han sido utilizadas durante muchas décadas por la industria ganadera; sin embargo, las bacterinas tradicionales demostraron fallar contra la protección del padecimiento en los animales vacunados. Actualmente las vacunas modernas usan sobrenadantes de cultivo bacteriano ricos en Leucotoxina (LTX, potente toxina que produce la bacteria en fase de crecimiento, la cual es letal para leucocitos de rumiantes), antígenos (Ags) solubles que se encuentran en el extracto de células bacterianas, o bien combinaciones con bacterinas. Estas vacunas tienen una eficiencia del 50-70%<sup>7</sup> en la prevención de la Mannheimiosis.<sup>5</sup>



## 1.2 ANTECEDENTES DE *Mannheimia haemolytica*.

En 1885, Kilt denominó a *Mannheimia haemolytica* como *Bacterium bipolare multocidum*.<sup>3</sup> En 1896, Flugge la renombró como *Bacillus bovisepitica*.<sup>2</sup> Posteriormente, en 1921, Jones describió la actividad hemolítica de este microorganismo, el cual fue clasificado dentro de la familia *Pasteurellaceae*. Consecutivamente, en 1932, Cross y Newsom aislaron el mismo microorganismo causante de enfermedades en terneros y en borregos, llamándolo *Pasteurella haemolytica*.<sup>8</sup>

Entre 1959 y 1961 Smith y col. reconocieron dos biotipos, el A y el T, clasificación que se otorgó por la capacidad de la bacteria para fermentar arabinosa y trehalosa, respectivamente. Dicha actividad está relacionada con el metabolismo de la bacteria.<sup>8</sup>

En 1960, Biberstein explicó la relación entre serotipos y biotipos de *P. haemolytica*, en base a estudios de serotipificación realizados por hemoaglutinación indirecta (HAI) de Ags capsulares solubles, pero fue hasta 1962 que Biberstein y Gills reconocieron once serotipos capsulares por el mismo método.<sup>8</sup>

A inicios de 1980, Mannheim y sus colaboradores realizaron estudios genéticos de miembros representativos de los géneros *Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella* (grupo HAP), concluyendo que este grupo HAP debía ser categorizado como familia, lo que trajo como consecuencia renombrar algunas especies que fueron erróneamente clasificadas dentro de este grupo.<sup>9</sup> Posteriormente, en 1981, Mannheim propuso una nueva clasificación dentro de la familia *Pasteurellaceae* y consideraba que los tres géneros del grupo HAP debían conservar distinta identidad. En el mismo año Pohl sugirió que *Pasteurella haemolytica* biotipo A, estaba mucho más asociada genéticamente con *Actinobacillus lignieresii*.<sup>8</sup>

En investigaciones subsecuentes, Fodor en 1987 propuso más serotipos, el 3, 4, 10 y 15 asociados con el biotipo T y el resto con el biotipo A; las cepas no tipificables por HAI fueron clasificadas posteriormente por la técnica de contra-inmuno-electroforesis, con lo que se demostraron nueve serogrupos adicionales y en consecuencia el número de serotipos incrementó a 17.<sup>8-10</sup>

En 1991, Carter y Chengappa identificaron 17 serotipos en base a la expresión de Ags de superficie por medio de hemoaglutinación indirecta. Los serotipos 1, 2, 5-9,11-14,16-17 correspondieron al biotipo A. Sin embargo, en 1995 Younan y Fodor establecieron que el A11 no está relacionado con *M. haemolytica*, reclasificándolo como *Mannheimia glucosida*.<sup>8-9</sup>

El resto de los serotipos (3, 4, 10 y 15) del biotipo T, fue reclasificado como una especie separada que se denominó *Pasteurella trehalosi*.<sup>8</sup> Sin embargo, Blackall y col. establecieron a *Pasteurella trehalosi* como un nuevo género, denominándola *Bibersteinia trehalosi*, la cual es causante de septicemia aguda en corderos.<sup>9</sup>

Finalmente, en 1999, Angen y col. reclasificaron a la bacteria en un nuevo género denominado *Mannheimia*, el cual sigue perteneciendo a la familia *Pasteurellaceae*.<sup>4</sup> Esta reclasificación se basó en los resultados de estudios de ribotipificación, electroforesis de enzimas multi-locus, secuenciación del gen 16S del RNAr e hibridación de ADN-ADN.<sup>8-10</sup> Por lo que después de la reclasificación de Angen y col., el género *Mannheimia* comprende cinco nuevas especies:

*M. haemolytica* (originalmente biogrupo 1), incluye todos los serotipos A (1, 2, 5-9, 12-14, 16 y 17).

*M. granulomatis*, que comprende a cepas previamente clasificadas como *P. granulomatis*, Bisgaard taxón 20 y *P. haemolytica* biogrupo 3J. Incluye también cepas originalmente clasificadas genéticamente como *P. haemolytica*-like (parecidas a *P. haemolytica*), aisladas de conejos, liebres y bovinos, asociadas con neumonías y conjuntivitis purulenta en lepóridos y con granulomas en piel y otras enfermedades en bovinos.

*M. glucosida*, que incluye cepas originalmente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupos 3 A-H y 9, así como el serotipo 11 y todas sus cepas, la mayoría aisladas de la cavidad nasal de borregos, en algunos casos con neumonías u otras enfermedades.

*M. ruminalis*, que incluye cepas no hemolíticas de *P. haemolytica* previamente descritas como *Actinobacillus lignieresii* y *P. haemolytica* biogrupo 3J, aisladas del rumen de bovinos y ovinos, las que no están involucradas con cursos patológicos.

*M. varigena*, que comprende un grupo de cepas originalmente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupo 6 y Bisgaard taxones 15 y 36, las que han sido aisladas de bovinos y porcinos, asociados con sepsis, neumonía y otros estados patológicos.<sup>8,9</sup>

## **1.2 *Mannheimia haemolytica***

*M. haemolytica* es un cocobacilo o bacilo pequeño pleomórfico, negativo a la tinción de Gram, que mide un diámetro de 1 a 3  $\mu\text{m}$ , mesófilo, encapsulado, y tiene la capacidad de crecer tanto como anaerobio facultativo como microaerófilico. Esta bacteria fermenta glucosa, manitol, maltosa, D-sorbitol, D-xilosa, dextrina y sacarosa produciendo ácido con ausencia de gas; no es capaz de fermentar D-arabinosa pero si L-arabinosa, es oxidasa positivo y negativo a indol, rojo de metilo, gelatinasa y Voges-Proskauer.<sup>8-10</sup>

*M. haemolytica* crece en agar sangre formando colonias delgadas, lisas, con una ligera elevación de color blanco grisáceo en el centro, rodeada por una angosta  $\beta$ -hemólisis. Las colonias tienen un diámetro de 1 a 2 mm después de 24 h de incubación.<sup>9</sup>

### **1.2.1 FACTORES DE VIRULENCIA DE *M. haemolytica***

La infección grave por *M. haemolytica* se debe principalmente al efecto de sus factores de virulencia, que forman parte de los componentes de superficie y de los productos propios del metabolismo bacteriano. Los factores de virulencia son capaces de promover la adherencia, la colonización y la proliferación del organismo dentro del pulmón<sup>10,11</sup>. *M. haemolytica* puede expresar una gran cantidad de potentes Ags de superficie que incluyen:

Cápsula: juega un papel como cubierta protectora resistiendo la fagocitosis, y le permite la adhesión y la invasión celular. También se utiliza como depósito de alimentos y como lugar de eliminación de sustancias de desecho. Protege de la desecación, ya que contiene una gran cantidad de agua disponible en condiciones adversas.<sup>11</sup>

Fimbrias: son utilizadas por las bacterias para adherirse a superficies, tanto entre ellas mismas, como a las células del hospedero, además son necesarias para la

colonización durante el proceso de infección o para iniciar la formación de una biopelícula.<sup>12</sup>

Proteínas de membrana externa (PME): participan como transportadoras de materiales a través de la membrana (como las porinas que se encuentran en esta membrana), en la adhesión a la célula hospedera (con lo que la función de la membrana celular es dañada) y pueden actuar como receptores de alta afinidad para obtener hierro del hospedero.<sup>12</sup>

Proteínas de membrana externa reguladas por hierro (PMERH): en ausencia de hierro, la bacteria expresa en su superficie proteínas especialmente dedicadas a captarlo. Estas proteínas llamadas PMERH trabajan específicamente compitiendo con proteínas transportadoras del hospedero, para quitarles el hierro.<sup>12</sup>

Adhesinas: son moléculas de la superficie bacteriana que fijan a las bacterias a las células del hospedero, teniendo amplio rango de especificidad para dichas células, por lo que están implicadas en la invasión y colonización celular del epitelio respiratorio.<sup>12,13</sup>

Lipopolisacárido (LPS): es el principal Ag anclado en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y participa en la adhesión a superficies.<sup>12</sup>

Neuroaminidasa: reduce la viscosidad de moco respiratorio y permite la exposición bacteriana sobre la superficie de la célula hospedera.<sup>12</sup>

Sialoglicoproteasa: está presente entre los Ags del sobrenadante de cultivo, entre los que destaca una O-sialoglicoproteína (Gcp) que es una metaloproteasa neutra, con actividades de endopeptidasa y neuroaminidasa, que tiene la capacidad de fraccionar en diferentes sitios a la glicoproteína A tipo mucina.<sup>12</sup>

Plásmidos: En *M. haemolytica* se ha podido demostrar la existencia de plásmidos de resistencia a antibióticos; aun cuando la presencia de plásmidos no es un fenómeno característico entre todas las cepas, algunas cepas poseen sólo un

plásmido pequeño (de aproximadamente 4.2 kpb), el cual es responsable de la resistencia contra estreptomycin y sulfonamidas.<sup>1,8,9</sup>

Leucotoxina (LKT): es una exotoxina, considerada uno de los factores de virulencia de mayor importancia, capaz de lisar macrófagos alveolares, linfocitos y polimorfonucleares.<sup>13</sup>

Vesículas de membrana externa (MVs): Las bacterias Gram-negativas han desarrollado diferentes mecanismos para la secreción de factores de virulencia, como lo son las MVs. Éstas representan una ruta alterna para la colonización de la bacteria en el tejido, pues afectan la actividad biológica de las células del hospedero.<sup>15</sup>

La combinación de todos los factores mencionados permite a *M. haemolytica* evadir los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del hospedero, favoreciendo y complicando la neumonía.<sup>10</sup> El producto que causa mayor daño celular en la patogénesis de la enfermedad es la LKT, la cual además de tener habilidad para lisar eritrocitos, tiene efecto citotóxico en leucocitos de rumiantes.<sup>13,14</sup>

La expresión de los diferentes Ags ocurre en distintas condiciones de crecimiento<sup>14</sup>. Cada uno de estos Ags contribuye a la enfermedad clínica en combinación con las secreciones del huésped, que favorecen la presentación de la enfermedad, así como los cambios histopatológicos asociados al proceso.<sup>11</sup>

### **1.3 VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA BACTERIANA (MVs).**

La secreción de los factores de virulencia de los patógenos Gram-negativos es compleja, debido a que la envoltura bacteriana consiste en dos bicapas de lípidos: membrana externa (ME), membrana interna (MI) y entre ellas el periplasma.<sup>14,15</sup> Las membranas difieren en la composición proteínica y lipídica. La ME está compuesta principalmente por LPS, mientras que la MI está conformada por fosfolípidos. El periplasma es una región viscosa compuesta por una capa delgada y rígida de péptidoglicano anclado a ambas membranas mediante lipoproteínas. Mide aproximadamente 13 nm y se estima que representa desde el 7 % al 40% del volumen total de la bacteria.<sup>16-18</sup>

La envoltura de las bacterias Gram-negativas contiene un gran número de proteínas las cuales tienen diversas funciones, como adhesión, secreción, señalización, paso de nutrientes y protección. La importancia de esta doble membrana radica en que cualquier pérdida de la continuidad puede representar la muerte bacteriana. Por lo anterior, las bacterias han desarrollado múltiples estrategias para monitorear y reparar cualquier daño generado.<sup>15,16</sup>

Las bacterias Gram-negativas, al igual que otras células, interactúan con el ambiente que las rodea. Dichas interacciones frecuentemente son debidas a moléculas secretadas a distancia, por lo que influyen considerablemente en el ambiente inaccesible para la bacteria completa. Dicho mecanismo de secreción les permite interactuar con lo que las rodea, sin tener que gastar energía en su desplazamiento. La secreción es importante en las bacterias Gram-negativas ya que les ofrece muchas ventajas, teniendo en cuenta la gran variedad de materiales que secretan las células del hospedero contra ellas. Dicho material secretado por las bacterias se considera generalmente como soluble, pero se conoce que las células de cualquier dominio tienen mecanismos específicos para que el material insoluble también sea secretado.<sup>14,18</sup>

Las bacterias Gram-negativas, durante todas las fases de crecimiento, liberan moléculas de la ME mediante vesículas (MVs); dichas estructuras representan una vía de secreción de moléculas insolubles.<sup>19,20</sup> La biogénesis de las MVs se da cuando pequeñas porciones de la ME sufren un plegamiento dando origen a estructuras esféricas de 50-250 nm y que son liberadas al exterior de la célula bacteriana. La superficie externa de dichas MVs naturalmente está compuesta de los elementos que forman parte de la ME bacteriana.<sup>21</sup> Las MVs liberadas pueden difundir lejos de la bacteria y jugar un papel en la patogénesis mediante la generación de un ambiente adecuado para la bacteria completa, la señalización, la adquisición de nutrientes y la transferencia horizontal de genes. Se ha descrito que el lumen de las MVs contiene proteínas solubles correspondientes a componentes periplásmicos y citoplásmicos.<sup>21</sup>

Las MVs han sido identificadas en múltiples géneros bacterianos patógenos de seres humanos. También ha sido definida su composición, incluyendo a las MVs de *Escherichia*

*coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), *Porphyromonas gingivalis*, *Francisella tularensis* y *Acinetobacter baumannii*.<sup>21-26</sup>

Una propuesta que explica la producción de MVs es que se debe a una sobre-estimulación del crecimiento de la ME, y que posteriormente son emitidas en su ambiente circundante. Estudios realizados en *P. aeruginosa* comprobaron que a dosis subletales de gentamicina, un antibiótico de amplio espectro, se induce la producción de MVs en esta bacteria. La actividad de gentamicina a dosis subletales media parcialmente la alteración de la superficie celular, la ME se pliega y se une deliberadamente en sitios específicos formando MVs, las cuales son expulsadas de la célula manteniéndose libremente en el entorno externo.<sup>23</sup>

Por otra parte, se ha propuesto que las MVs son liberadas por la bacteria mediante un mecanismo que implica la separación de fracciones de su ME. Por lo tanto, las MVs conservan normalmente el total de los constituyentes de la ME que les dio origen, e incluyen proteínas, LPS, ácido murámico de la pared celular, cápsula y fimbrias. Muchos de estos componentes juegan un papel crucial en la patogenicidad de las bacterias.<sup>20</sup>

Además de la producción de MVs, los patógenos Gram-negativos tienen varias estrategias que permiten la activación de los factores de virulencia para que, posteriormente, estos factores ganen acceso al medio extracelular mediante diversos sistemas de secreción. Se han identificado una gran cantidad de mecanismos de secreción de proteínas y por lo menos cinco de estos están bien caracterizados. Los sistemas de secreción tipos II y V son procesos mediante los cuales las proteínas atraviesan la superficie en dos pasos: primero las proteínas pasan a través de la membrana interna por el camino péptido-dependiente (llamado camino Sec-dependiente) con una escala transitoria en el periplasma y posteriormente se da la siguiente translocación donde atraviesan la membrana externa y llegan al medio extracelular, este último proceso está mediado por proteínas adyacentes específicas.<sup>14</sup>

En el caso de las vías de secreción tipos I, III y IV, el material que va a ser liberado es transferido directamente hacia el medio extracelular o hacia el interior de otra célula. Se

cree que la proteína puede cruzar la MI y la ME en un solo paso, posiblemente a través de los sitios de adhesión entre las dos membranas. Aunque este modelo tiene ciertas características que lo pueden hacer confiable, la existencia de tales sitios de contacto ha sido cuestionada. Todos estos sistemas de secreción son utilizados por las bacterias para excretar proteínas individuales o complejos de tamaño pequeño. Se especula que el mecanismo de secreción de las MVs es de tipo V, es decir, permite a la bacteria liberar proteínas de alto peso molecular y grupos de proteínas y lípidos hacia el medio extracelular.<sup>15</sup>

Por todo lo anteriormente mencionado, las MVs pueden proveer de una ruta alterna para la liberación de factores de virulencia. Por ejemplo, las MVs de *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, y *Serratia marcescens* empaquetan fosfolipasa C, proteasas, proelastasas y hemolisinas. Los constituyentes que están contenidos dentro del lumen de las MVs cuentan con la ventaja de estar protegidos contra la inactivación por proteínas inmunocompetentes.<sup>20-26</sup>

Satsuki y col. demostraron en 2002 que en la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* el mayor constituyente de las MVs liberadas correspondía a proteínas que son parte de la ME de la célula bacteriana. En dichas vesículas fueron identificadas proteínas secretadas: una proteína termolábil que tiene similitud con la OMP A de 28 kDa, la cual está relacionada con una lipoproteína de membrana externa de *M. haemolytica*. También se identificó una proteína similar a la LTX de *M. haemolytica*. Además, en este estudio se incubaron a las MVs de diferentes cepas de *A. actinomycetemcomitans* (JP2 y 652) con células HL60, en donde se observó la lisis de dichas células, concluyendo que las vesículas liberadas están enriquecidas con una Ltx activa. La cepa JP2 contiene vesículas enriquecidas con una LTX 10 veces más tóxica que la de la cepa 652.<sup>26</sup>

González y col., en el 2007 identificaron y caracterizaron en *M. haemolytica* serotipos A1 y A2 las MVs liberadas durante su crecimiento *in vitro*, exacerbando su producción y liberación al adicionar al medio la gentamicina a dosis subletales. Se estableció que dentro de estas estructuras se encontraban los principales Ags de la bacteria, considerados así



por el papel que juegan en la patogénesis de la enfermedad, tal es el caso de la LKT, el LPS, las PME y un fragmento de DNA.<sup>10</sup> Sahlu y col., en 2013, caracterizaron mediante proteómica a las MVs de *M. haemolytica* A1, encontrando un total de 226 proteínas.<sup>27</sup>

En un estudio realizado por Roeir y col. en 2013, se analizó la capacidad inmunogénica de las MVs de *P. multocida* y *M. haemolytica*, determinando un alza en la producción de IgG e IgA a los 39 días post-inmunización en ratones BALB/c, en comparación con los que no fueron inmunizados.<sup>28</sup>

En otro estudio realizado por Alaniz y col. en 2007, se demostró que las MVs de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium estimulan a células profesionales presentadoras de Ags (CDs y macrófagos) en condiciones *in vitro*. Ellos determinaron el aumento de la expresión en marcadores de superficie celular como el MHC-II y moléculas co-estimuladoras (CD86) en CDs de ratón, y en experimentos simultáneos determinaron el aumento de la producción de mediadores proinflamatorios (NO, TNF-, e IL-12).<sup>29</sup>

Actualmente se desconoce el mecanismo de acción de las MVs de *Mannheimia haemolytica* A2 sobre la respuesta inmune innata. Tampoco se ha evaluado su efecto en células del sistema inmune innato como CDs y macrófagos, entre otros.

#### **1.4 SISTEMA INMUNE DEL HOSPEDERO**

El sistema inmune es parte de los mecanismos biológicos de defensa de un organismo. Este sistema está constituido por varios órganos y diferentes tipos de células, que le permiten al organismo distinguir y no afectar lo propio y eliminar lo extraño. Este sistema está destinado a mantener la integridad estructural y funcional de los individuos, y programado para la neutralización y eliminación de agentes infecciosos. Los componentes celulares y moleculares del sistema inmune se han separado tradicionalmente en componentes innatos y componentes específicos que han desarrollado estrategias, mecanismos y receptores distintos para el reconocimiento inmunológico.<sup>30</sup>

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra la infección, sus mecanismos de defensa son inespecíficos frente a los microorganismos. Se genera una respuesta inmune que no se incrementa tras exposiciones repetidas al mismo agente, es decir, no posee

memoria. Está constituido por diversos tipos celulares y moléculas solubles que juegan un rol en el reconocimiento de microorganismos. Filogenéticamente es el mecanismo de defensa más antiguo y se ha conservado a lo largo de la evolución. Actúa rápidamente para eliminar al Ag a través de mecanismos microbicidas y respuesta inflamatoria. Por ser sus mecanismos efectores tan potentes y con capacidad de producir daño tisular al hospedero, están finamente regulados de diversas maneras. La respuesta innata tiene la capacidad de alertar y dirigir la respuesta inmune adaptativa, orientándola hacia una respuesta celular o humoral.<sup>31-33</sup>

A diferencia de la inmunidad innata, existen mecanismos de defensa mucho más evolucionados que son estimulados tras la exposición a agentes infecciosos, cuya intensidad y capacidad defensiva aumentan después de la última exposición a un determinado microorganismo. Las características de la inmunidad adaptativa son: 1) especificidad para moléculas diferentes; 2) especialización que la capacita para responder de forma singular a distintos tipos de microorganismos; 3) su capacidad de memoria y de responder con más rapidez tras exposiciones repetidas en contra del mismo microorganismo. Debido a esta capacidad para discriminar entre diferentes microorganismos, la inmunidad adaptativa se denomina también inmunidad específica.<sup>33</sup>

Los mecanismos de las respuestas inmunitarias innata y específica forman un sistema integrado de defensa del hospedero, en el que existe una cooperación funcional de numerosas células y moléculas. La inmunidad innata no proporciona solamente una primera barrera de defensa contra los microorganismos, sino que también desempeña diversas funciones importantes en la activación del sistema inmune específico. El sistema inmune específico ha conservado muchos de los mecanismos efectores de la inmunidad innata temprana que sirven para eliminar Ags extraños.<sup>34,35</sup>

Entre los componentes de la respuesta inmune innata destaca el papel funcional de las células fagocíticas (CDs, macrófagos, neutrófilos y células asesinas naturales o Natural Killer, NK), para la eliminación de los patógenos y la captura de Ags, y su posterior transferencia mediante el MHC-II a los linfocitos T, para dar inicio a la denominada fase adaptativa de la respuesta inmune. En esta conexión entre la fase innata y la adaptativa

de la inmunidad tienen un papel esencial las CD, además de las citocinas por su capacidad para polarizar la respuesta inmune.<sup>36,37</sup>

#### 1.4.1 CÉLULAS DENDRÍICAS

Las CD representan una población de células de origen hematopoyético, ampliamente distribuidas como células inmaduras en tejidos linfoides y no linfoides (principalmente piel, mucosas y ganglios linfáticos). Por su distribución multifocal en los diferentes tejidos corporales y su gran heterogeneidad y versatilidad, tienen la capacidad de responder a múltiples estímulos endógenos o exógenos, migrar a través de los tejidos, internalizar Ags propios y no propios, procesarlos y presentarlos a las células no sensibilizadas y de memoria, constituyéndose como células presentadoras de Ags (CPA) profesionales. Las CDs son de forma irregular y recibieron este nombre debido a su morfología distintiva, ya que tienen prolongaciones membranales a las cuales se les llamó dendritas, que tienen función fundamental en la captura de Ags.<sup>38</sup>

Se ha demostrado la existencia de distintas líneas de CD, con diferentes estadios de maduración y vías de migración. Se han logrado identificar tres subpoblaciones de CD con características fenotípicas particulares: una localizada en la piel (Células de Langerhans) y órganos linfoides, conocidas como CD intersticiales, y las otras dos localizadas en la circulación, denominadas CD de linaje mielóide CD11+ CD8- y CD plasmacitoides CD11- CD8+.<sup>38</sup>

Acorde a su estadio de maduración se han identificado dos grupos, las células dendríticas inmaduras (CDi) que actúan como centinelas, caracterizándose por su alta capacidad de internalizar microorganismos por medio de procesos como la fagocitosis. Luego de internalizar Ags extraños (por ejemplo, productos derivados de un patógeno (LPS), o bien el encuentro de una CDi con señales de “alerta” (citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , entre otras), se induce una serie de cambios a nivel fenotípico e inmunológico-funcional, dando lugar en la mayoría de los casos a Células Dendríticas maduras (CDm).<sup>38</sup>

Las CDm se caracterizan por presentar una reducción en su capacidad fagocítica, sin embargo, pueden iniciar la respuesta inmune mediada por células debido a que expresan abundantes moléculas de MHC, al igual que moléculas coestimuladoras (CD86,

entre otras). Luego de su activación, las CD<sub>s</sub> migran hacia los nódulos linfoides, donde presentan eficientemente los Ags procesados de un microorganismo patógeno. De esta forma, las CD<sub>s</sub> desempeñan un papel determinante en la protección de los tejidos periféricos de la invasión por microorganismos patógenos y en la inducción de la tolerancia inmunológica.<sup>38</sup>

El procesamiento incluye la fragmentación de las moléculas del Ag en péptidos pequeños, los cuales se unen a receptores MHC. Actualmente se conocen dos tipos de complejos principales de histocompatibilidad: Clase I y II (MHC-I, MHC-II). Los péptidos antigénicos unidos al MHC-I o MHC-II, finalmente son transportados a la superficie celular. La inmunidad adquirida se desencadena cuando estos péptidos antigénicos unidos al MHC se unen a receptores específicos en los linfocitos T. Estos linfocitos responden sólo a los péptidos que se han procesado correctamente, para que la respuesta inmune adquirida no se desarrolle de forma indiscriminada.<sup>38</sup>

En la actualidad existen diferentes metodologías para la obtención y generación de CD<sub>s</sub>. La selección del método a utilizar para la obtención, puede tener un impacto en la habilidad de generar una respuesta *in vitro*, cuyos resultados puedan extrapolarse con las respuestas generadas *in vivo*.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La neumonía es una de las principales causas de muerte en ovinos y genera grandes pérdidas económicas en las unidades de producción, por lo que es necesario desarrollar estrategias para su prevención. Se ha determinado la capacidad inmunogénica de las MVs de *Mannheimia haemolytica* concluyendo que hay un alza en la producción de IgG e IgA, con capacidad protectora. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción de las MVs de *M. haemolytica* A2 sobre los componentes de la inmunidad innata, como las CDs, por lo que determinar la expresión del MHC-II y de la molécula co-estimuladora CD86 permitirá establecer la participación de las MVs en la inmunidad innata de ovinos.

## **3. HIPÓTESIS**

Las MVs de *M. haemolytica* A2 contienen importantes factores de virulencia, por tanto, podrían inducir activación de las CDs ovinas, que resulte en su adecuado procesamiento y presentación al sistema inmune a través del MHC-II.

## **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión del MHC-II en CDs ovinas expuestas a MVs de *M. haemolytica* A2

### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener MVs a partir de sobrenadantes de cultivo de *M. haemolytica* A2 y confirmar su presencia mediante microscopía electrónica
- Estandarizar la diferenciación de monocitos ovinos sanguíneos a CDs en condiciones *in vitro*
- Estimular CDs ovinas con las MVs de *M. haemolytica* A2 y determinar en las CDs el aumento en la expresión del MHC-II y de CD86

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una cepa de campo de *M. haemolytica* A2, obtenida en un trabajo previo, a partir de lesiones neumónicas de un ovino muerto por la enfermedad en campo. Dicha cepa se identificó mediante un kit comercial: Api 20E (BioMérieux S.A., México). Se realizó primocultivo de dicha cepa, en agar sangre mediante estría cerrada, incubando a 37 C por 24 h. A continuación, se realizó una tinción de Gram para verificar la morfología de la bacteria y la pureza del cultivo.

### 5.1 OBTENCIÓN DE MVs DE *M. haemolytica* A2

Se realizó el crecimiento bacteriano de la cepa antes mencionada, en placas de agar sangre incubada a 37 C / 24h. Una vez realizado lo anterior, se procedió a cultivar a las bacterias en 500 ml de medio Infusión Cerebro Corazón (BHI, México), enriquecido con  $\text{CaCl}_2$  (1ml/250ml de BHI), en agitación a 150 rpm, 37 C por 24 h. Transcurridas las primeras 8 h, se adicionó gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA) en una dosis de 25  $\mu\text{g/ml}$  de medio de cultivo, de esta manera se exacerbó la producción de MVs. Dicho cultivo se incubó nuevamente bajo las condiciones descritas hasta completar 24 h. Finalmente se realizó tinción de Gram para evidenciar la pureza del cultivo.

El cultivo anterior se centrifugó a 9,000 X g por 15 min y el sobrenadante (SN) resultante se filtró a través de membranas de nitrocelulosa (Millipore, Irlanda), primero de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y posteriormente de 0.22  $\mu\text{m}$ . El producto de la filtración se ultracentrifugó (BECKMAN COULTER, EUA) a 150,000 X g/3 h/ 4 C, desechando el SN y el botón resultante correspondió a las MVs, las cuales se resuspendieron en amortiguador Hepes 10 mM con inhibidores de proteasas y se conservaron a -70 C hasta su uso.

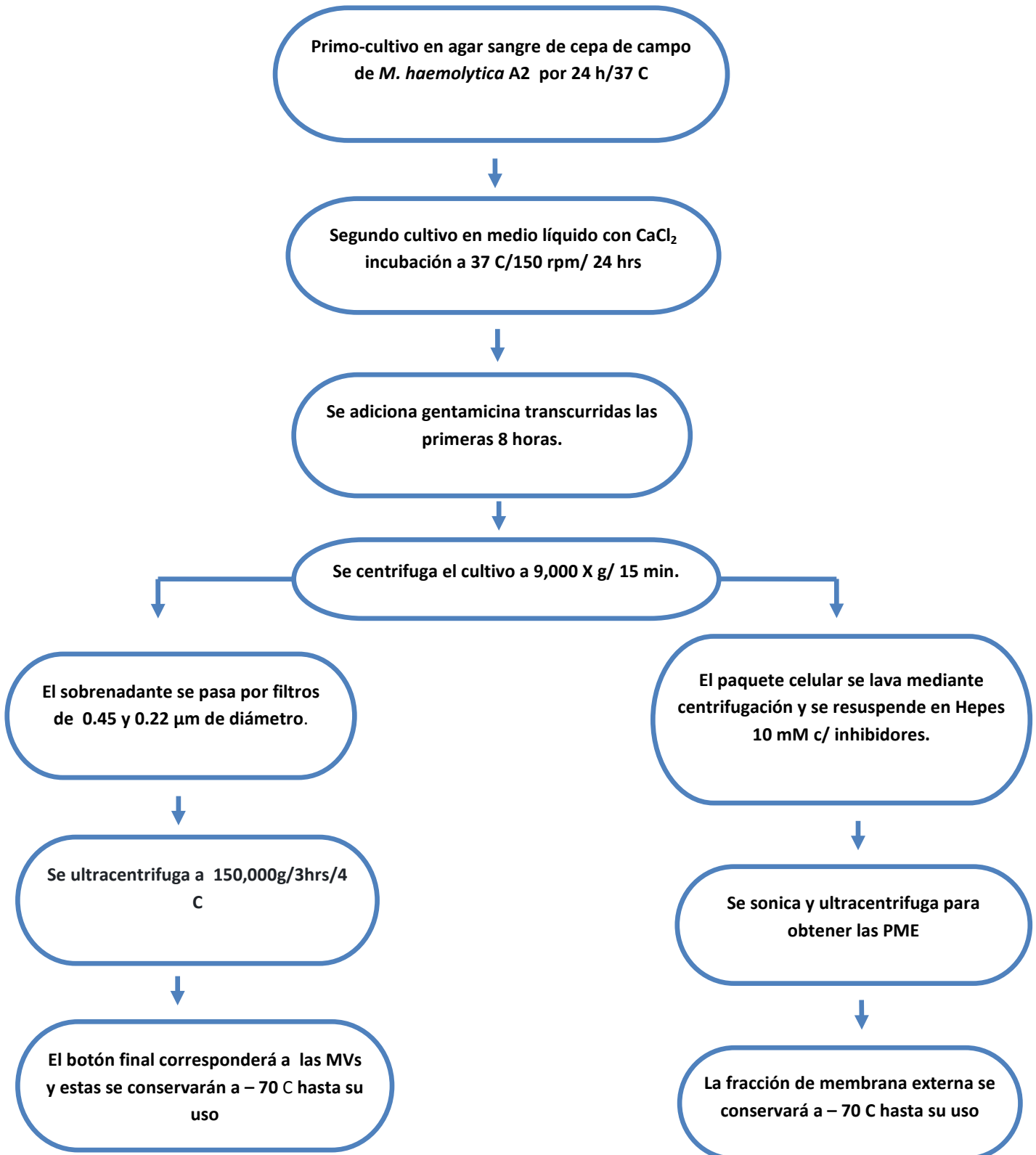
### 5.2 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME)

Las células que fueron recuperadas durante el proceso de obtención de las MVs, se lavaron por centrifugación a 4 C a 3,500 X g / 25 min con Hepes 10 mM (2 veces). Para obtener las fracciones celulares se sometió la muestra a lisis celular por sonicación (Ultrasonic Proccesor, Vibra-Cell 130, SONICS, EUA), distribuyéndola en varios tubos en cantidades de 10 a 15 ml sobre baño de hielo. Cada muestra se sometió a 10 pulsares de

30 a 60 seg con 1 min de descanso, de tres tiempos cada uno, en baño de hielo con sonicador de punta. Posteriormente se centrifugó la muestra sonicada a 1,000 X g / 15 min para la remoción de restos celulares. Se recuperó el SN y se ultracentrifugó a 100,000 X g / 2 hrs. La pastilla que se obtuvo correspondió a una fracción de la envoltura celular cruda de membrana externa y membrana interna y el SN al citosol. La pastilla de membranas totales se disolvió en amortiguador conteniendo Sarcosyl (Sigma) al 1% y se colocó en agitación suave por 30 min / T ambiente.

Finalmente se ultracentrifugó la muestra a 100,000 X g /1 h, donde el paquete resultante correspondió a la membrana externa y se disolvió en Hepes con inhibidores de proteasas. El SN correspondió a la membrana interna. La membrana externa se conservó en congelación a -70 C hasta su uso. En el **Esquema 1** se muestra el diagrama de flujo para la obtención de MVs y PME de *M. haemolytica* A2.

**ESQUEMA 1: METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE MVs DE *M. haemolytica* A2.**





### **5.3 PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS EN SOLUCIÓN, EN PRESENCIA DE DETERGENTES Y LÍPIDOS.**

Se colocaron 200  $\mu$ l de la muestra problema y se le adicionaron 400  $\mu$ l de metanol para precipitar las proteínas; esta mezcla de soluciones se sometió a la acción del vortex por 30 seg para homogeneizar. La muestra se centrifugó por 10 seg a 9,500 X g en microtubos de polietileno de 1.5 ml, para la colección total de la muestra. Posteriormente, a la mezcla anterior se le adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo y se sometió una vez más a la acción del vortex. Una vez realizado lo anterior se centrifugó por 10 seg a 9,000 X g y consecutivamente, se le agregaron 300  $\mu$ l de agua desionizada. Esta mezcla se homogenizó enérgicamente mediante vortex por 1 min y posteriormente se centrifugó por 1 min en las mismas condiciones. La fase superior se removió cuidadosamente y fue desechada. Al resto de la fase clorofórmica y a la interfase con las proteínas precipitadas, se le añadieron 300  $\mu$ l de metanol, homogenizando mediante vortex por 1 min y finalmente se centrifugó a 9,000 X g por 2 min. El SN fue desechado y el botón de proteínas resultante fue secado bajo rocío de aire y conservado a -70 C, hasta su uso.

### **5.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD**

La cuantificación de proteínas por el método de Bradford se realizó en una placa de microtitulación. A partir de albúmina sérica bovina (ASB) de concentración de 1 mg/ml se realizó la cuantificación de las muestras deseadas, mediante una curva estándar que fue de menor a mayor concentración (de 1  $\mu$ l a 10  $\mu$ l) en PBS. Posteriormente, se colocaron 10  $\mu$ l de la muestra problema a 190  $\mu$ l de reactivo de Bradford, mezclando mediante agitación durante 1 min. Finalmente la placa se leyó en lector de ELISA (BIO-TEK ELX 808, EUA), a 590 nm y por regresión lineal se calculó la concentración de proteína de la muestra problema.<sup>39</sup>

## 5.5 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO

La separación analítica de las proteínas de la fracción de membrana externa y de las MVs, se realizó en función de sus pesos moleculares, utilizando SDS-PAGE (Bio-Rad, EUA), por el método de Laemmli.<sup>40</sup>

## 5.6 CONDICIONES PARA CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO

Las MVs se resuspendieron en Hepes 10 mM con inhibidores de proteasas, ajustando el volumen 1:1 con el amortiguador de muestra Laemmli y posteriormente se sometió a ebullición (95 C) durante 10 min. A continuación las muestras fueron colocadas en cada carril y se corrieron en geles al 12% a 80 volts para alinear la muestra en el gel concentrador y 100 volts para el gel separador en solución amortiguadora de corrida. Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave, posteriormente se sometieron a una solución desteñidora, hasta visualizar claramente las bandas deseadas y finalmente éstos se conservaron en ácido acético al 10%.

En otros casos se realizó la tinción de plata de proteínas y se fijó el gel en una solución de metanol:ácido acético:agua (5:1:4) toda la noche. Posteriormente se retiró la solución fijadora y se lavó el gel 3 veces por 15 min en 500 ml de agua destilada. La mezcla de tinción se preparó al momento, la cual contenía 56 ml de hidróxido de sodio (NaOH 0.1 M), 5 ml de hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH al 100%) y 2 g de nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) disueltos en 10 ml de agua desionizada fría (4 C) adicionada gota a gota y finalmente 200 ml de agua desionizada, adicionando primero 100 ml y después los otros 100 ml. Se dejó el gel en agitación vigorosa por 10 min. Se realizaron 4 lavados de 1 min cada uno con agua destilada. Se reveló con 50 mg de ácido cítrico disueltos en 200 ml de agua destilada más 1 ml de formaldehído (38 %) y se aforó a 1000 ml. Se pasaron de 250 a 500 ml al cristizador y se mantuvo la agitación hasta la aparición de bandas proteínicas (de 10 a 15 min aproximadamente). Se desechó la solución y se detuvo la reacción con 10 ml de isopropanol al 25%, ácido acético al 7% más 200 ml de agua desionizada, agitando por 1 h y cambiando a agua destilada para almacenar a 4 C, o bien se deshidrató el gel. El peso molecular de las bandas, tanto de la fracción de membrana externa como de las MVs, fue

estimado según la posición en el gel, comparándolo con un estándar de proteínas de pesos moleculares conocidos presentes en el mismo gel (Bio-Rad, EUA)

### **5.7 TINCIÓN NEGATIVA PARA *Mannheimia haemolytica* A2 y MVs.**

Se realizó la tinción negativa a partir de un cultivo de *M. haemolytica* A2 para corroborar la presencia de MVs mediante microscopía electrónica de transmisión. Una vez que se obtuvo el cultivo bacteriano, como se describió anteriormente, se procedió a lavar por centrifugación 15 min/ 600 g. Posteriormente se resuspendió el botón con las células bacterianas en 500  $\mu$ l de PBS. A continuación se tomaron 10  $\mu$ l de la muestra colocándola en la rejilla por un minuto para su fijación. Subsecuentemente se retiró la muestra con papel filtro e inmediatamente después, se colocaron 10  $\mu$ l de ácido fosfotúngstico al 1% por 1 min. Una vez realizado lo anterior se procedió al secado de la muestra bajo el rocío de aire y observación en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL, JEM 1400, Japón).

### **5.8 OBTENCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS A PARTIR DE MONOCITOS SANGUÍNEOS**

#### ***Monocitos humanos:***

A partir de sangre periférica de donadores sanos, tanto de seres humanos como de ovinos, se aislaron células mononucleares mediante un gradiente de Optiprep (Axis Shield, Noruega). Posteriormente se realizó una separación de las células CD14+, marcador característico de los monocitos, con la ayuda de una columna con perlas magnéticas MACS (Miltenyi, Biotec, Alemania). Una vez separadas estas células CD14+ se ajustaron a  $3 \times 10^6$  por pozo en cajas para cultivo celular.

Para favorecer la diferenciación de los monocitos humanos a CDs inmaduras, se adicionaron 10 ml de medio RPMI-1640 (Mo-DC Differentiation Medium (Miltenyi)), el cual contiene: suero fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) e IL-4, y se incubó a 37 C durante 7 días. Al día tres de cultivo, se realizó un cambio de medio de cultivo con las mismas soluciones, y al sexto día se estimuló con LPS de *Escherichia coli* (Sigma) con el fin de obtener CDs maduras. Para confirmar la diferenciación de monocitos a CDs, se midió la expresión de marcadores

positivos a HLA-DR conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Dako, EUA) (MHC-II humano), CD1a conjugado con ficoeritrina (PE, Dako), CD11c conjugado con aloficocianina (APC, Becton Dickinson, EUA) CD11b conjugado con PE-Cy5 (BD-Pharmigen), y negativo para CD14 conjugado con azul Pacífico (PB, Biolegend, EUA), CD19 conjugado con APC-Cy7 y CD3 conjugado con PE-Cy7 (Biolegend), mediante citometría de flujo (FORTESSA, BECTON DICKINSON).

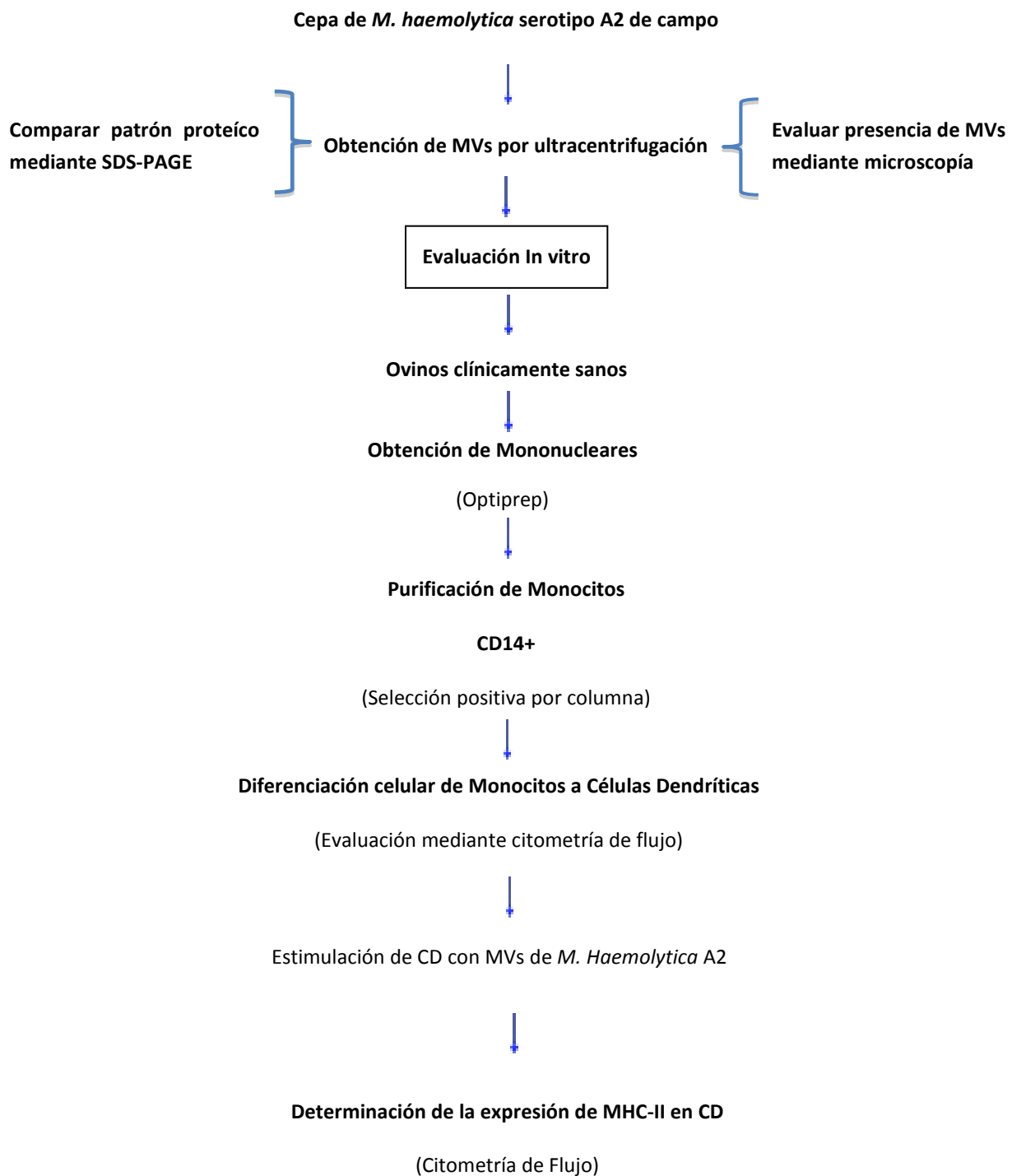
### ***Monocitos ovinos:***

A partir de sangre periférica de un ovino clínicamente sano se aislaron células mononucleares mediante un gradiente de densidad Optiprep™. Posteriormente se realizó la separación de las células CD14+, marcador característico de los monocitos, utilizando el sistema de MACS (Miltenyi). Una vez separadas estas células CD14+ se ajustaron a  $3 \times 10^6$  / pozo, se incubó 1 h, y se realizó extracción de las células para su posterior conteo en una cámara de Neubauer previa tinción con azul de Tripano. Para lograr la diferenciación de los monocitos a CDs se adicionó GM-CSF e IL-4 (Ovine Dendritic Cell Growth kit, AbD Serotec, GB), en medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%, y se incubó a 37 C / 5% CO<sub>2</sub> durante 6 días. Al tercer día de cultivo, se realizó un cambio de medio de cultivo con las mismas soluciones y se adicionó nuevamente otra dosis del kit con las interleucinas antes mencionadas. Para confirmar la diferenciación de monocitos a CDs se midió la expresión de marcadores positivos a MHC-II específicos para ovino: conjugado con FITC (DQ-DR, AbD Serotec), CD1w2 conjugado con PE (AbD Serotec) y negativo para CD14 conjugado con PB (Biolegend), y un marcador que indica estimulación celular CD86 conjugado con FITC (AbD Serotec), mediante citometría de flujo.

### **6.0 ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS OVINAS CON MVs DE *Mannheimia haemolytica***

Transcurrido el tiempo de diferenciación de monocitos a CDs ovinas, se procedió a incubar estas células con MVs de *M. haemolytica* por 24 horas / 37 C / 5% CO<sub>2</sub>. La concentración utilizada de proteína de MVs fue de 50 µg / pozo por cada 3 ml de medio RPMI 1640 y 10% de SFB.

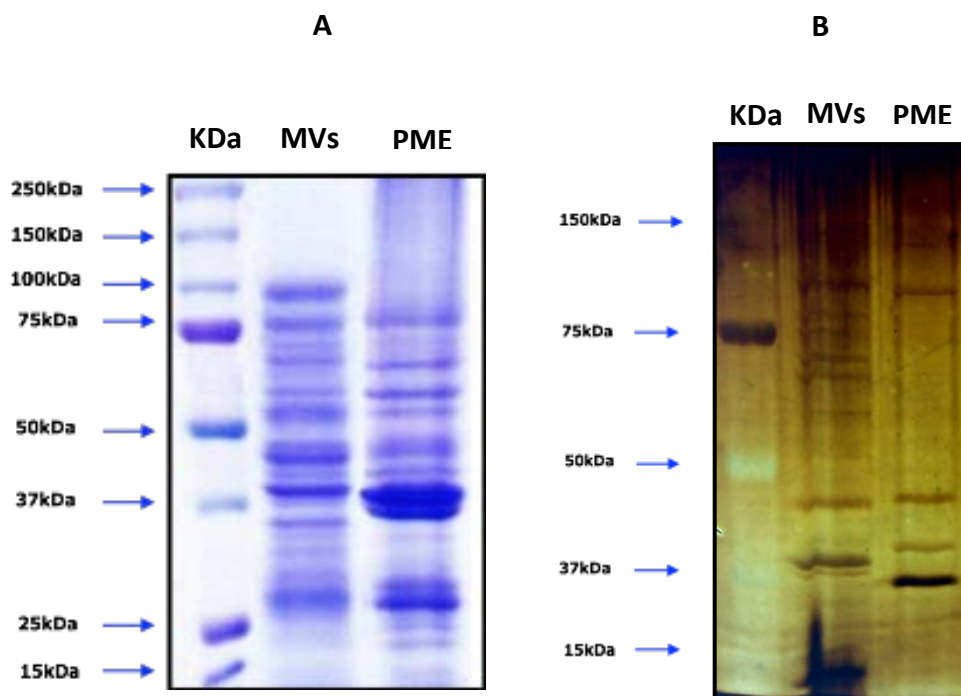
A continuación se presenta el diagrama de flujo del presente trabajo:



## 6 RESULTADOS

### 6.1 SDS-PAGE DE MVs Y DE PME

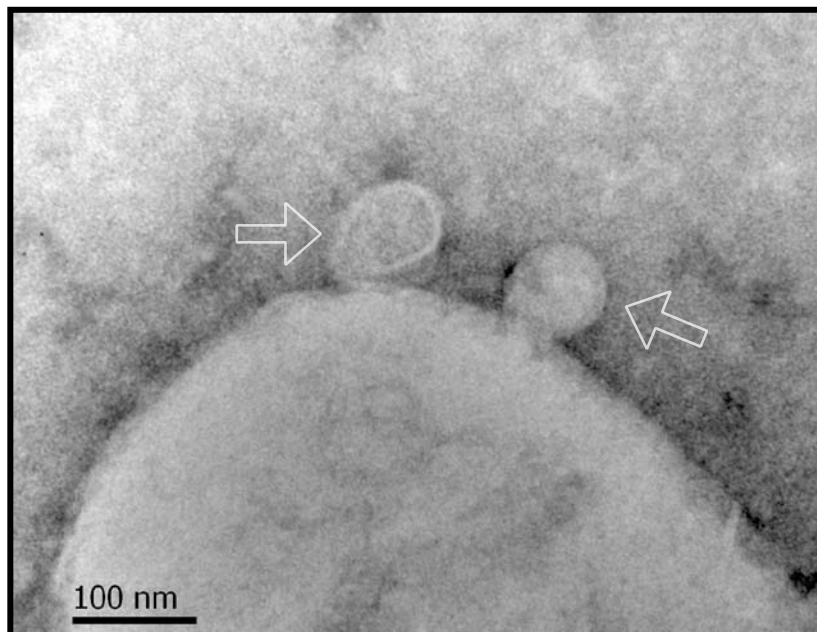
Las muestras de PME, así como las de MVs de *M. haemolytica* A2, se corrieron paralelamente mediante SDS-PAGE al 12% con la finalidad de comparar los patrones proteínicos, observándose que entre ellas comparten una gran cantidad de bandas. Es evidente que en las MVs se observa un mayor número de bandas, ya que también contienen las proteínas periplásmicas. La banda de 104 KDa, que sólo se observa en las MVs (asterisco), podría corresponder a la LKT, que proviene del citoplasma, antes de su secreción, ya que su presencia en MVs fue demostrada por reacción cruzada con la toxina de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en un trabajo previo (González et al., 2007). A continuación, en la **Figura 1** se muestra el corrimiento electroforético, en geles teñidos con azul de Coomassie y con plata.



**Figura 1 (A y B).** SDS-PAGE al 12% de PME y MVs de *M haemolytica*. Geles al 12% teñido con azul de Coomassie (A) y con tinción de plata (B), que muestran en el carril 1 los marcadores de peso molecular. En el carril 2 se muestra el patrón de bandeado de las MVs y en el 3 se muestran las proteínas correspondientes a las PME (10 µg de proteína en cada caso).

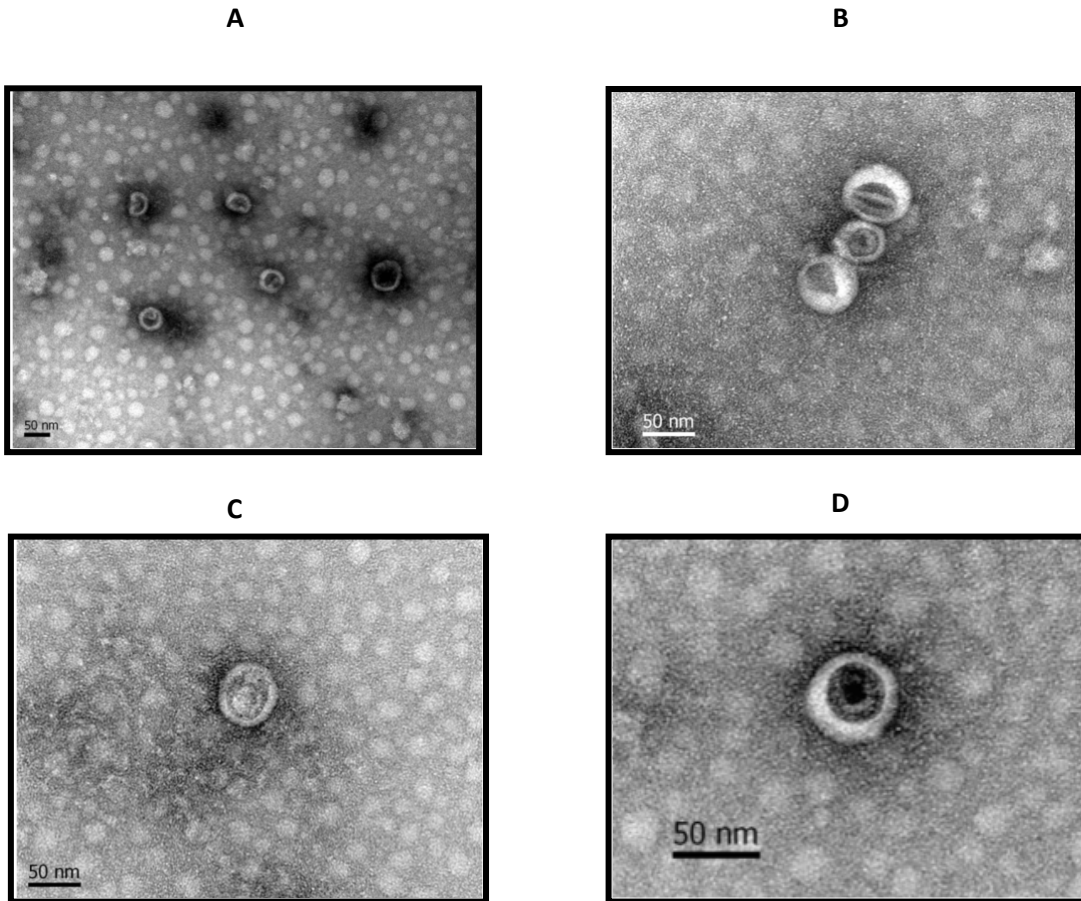
## 6.2 TINCIÓN NEGATIVA DE *Mannheimia haemolytica* A2 Y MVS.

Las células de *M. haemolytica* A2 obtenidas a partir de un cultivo con gentamicina, fueron teñidas con la metodología antes descrita de tinción negativa, con la finalidad de ser observadas en el microscopio electrónico de transmisión y corroborar la presencia de las MVs en dicha bacteria. En la **Figura 2** se muestra una bacteria con dos MVs (flechas) aún asociadas a la célula, una de ellas terminando su proceso de formación.



**Figura 2.** *Mannheimia haemolytica* A2 secretando MVs. Bacteria con acercamiento a su membrana donde se muestran MVs de aproximadamente 80 nm (flechas).

Además de observar las MVs en la bacteria, se procedió a realizar tinción negativa de la fracción obtenida por ultracentrifugación, que correspondía a un concentrado de MVs. En la **Figura 3** se muestran varios aumentos de dichas estructuras, en las que se observa un material translúcido que podría corresponder a la membrana externa bacteriana.



**Figura 3. Microvesículas de *M. haemolytica* A2.** Las barras indican el tamaño de las MVs.

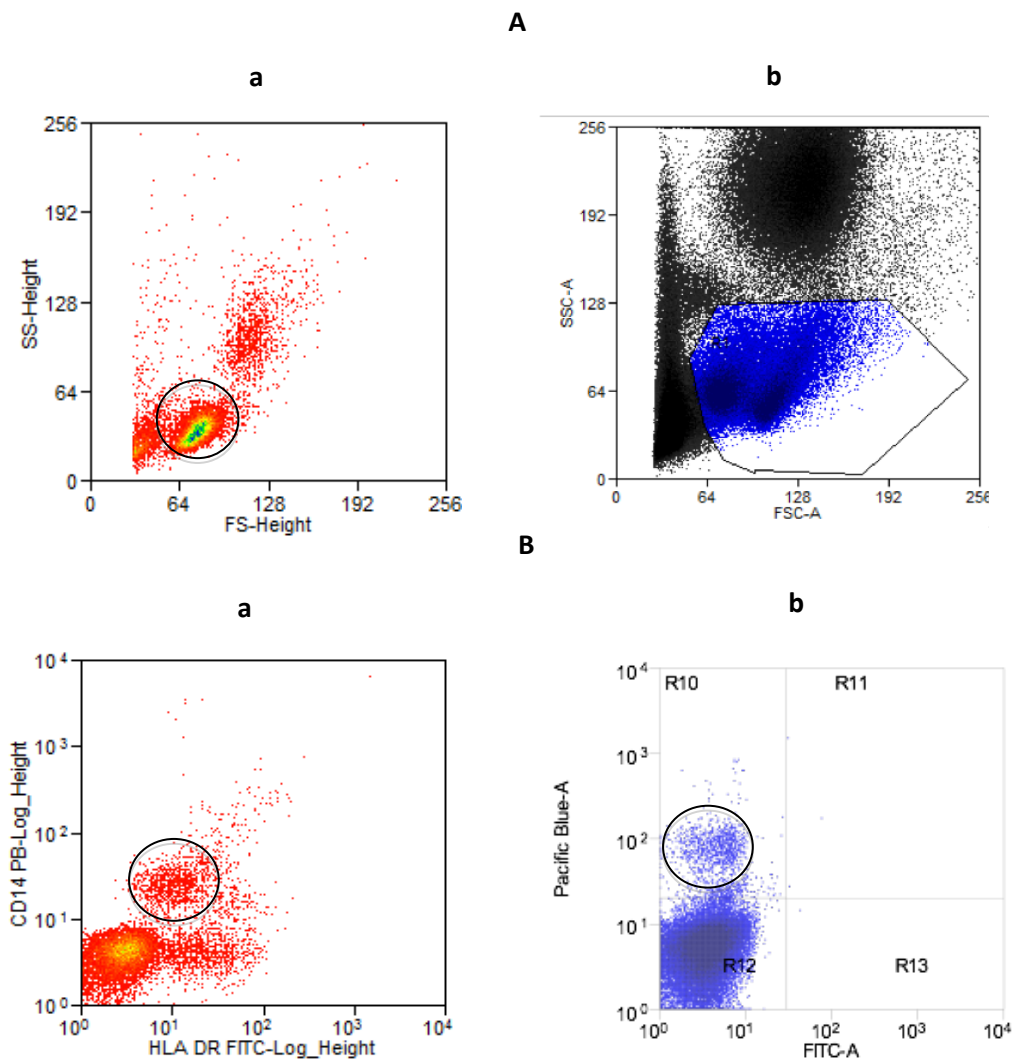


### **6.3 CITOMETRÍA DE FLUJO**

Un principio importante en el análisis de los datos de citometría de flujo es visualizar selectivamente las células de interés para eliminar resultados de partículas no deseadas, como células muertas y restos celulares. Dicho procedimiento es llamado acotamiento de poblaciones o “gating”. Las células se regionalizan de acuerdo con las características físicas, lo que permite distinguir poblaciones celulares de los contaminantes celulares. Por ello, se hizo el análisis de las poblaciones para obtener la intensidad media de fluorescencia, comparando los parámetros de fluorescencia con los parámetros de dispersión. Mediante el programa Summit versión 5.1, se realizó el análisis de datos de las poblaciones celulares, a fin de obtener los histogramas y gráficos de intensidad media de fluorescencia para cada marcador de superficie celular. En las siguientes figuras se mostrarán las células humanas en color rojo y las ovinas en azul, para hacer más evidentes las distintas poblaciones.

#### **6.3.1 CÉLULAS MONONUCLEARES OVINAS OBTENIDAS POR GRADIENTE DE DENSIDAD**

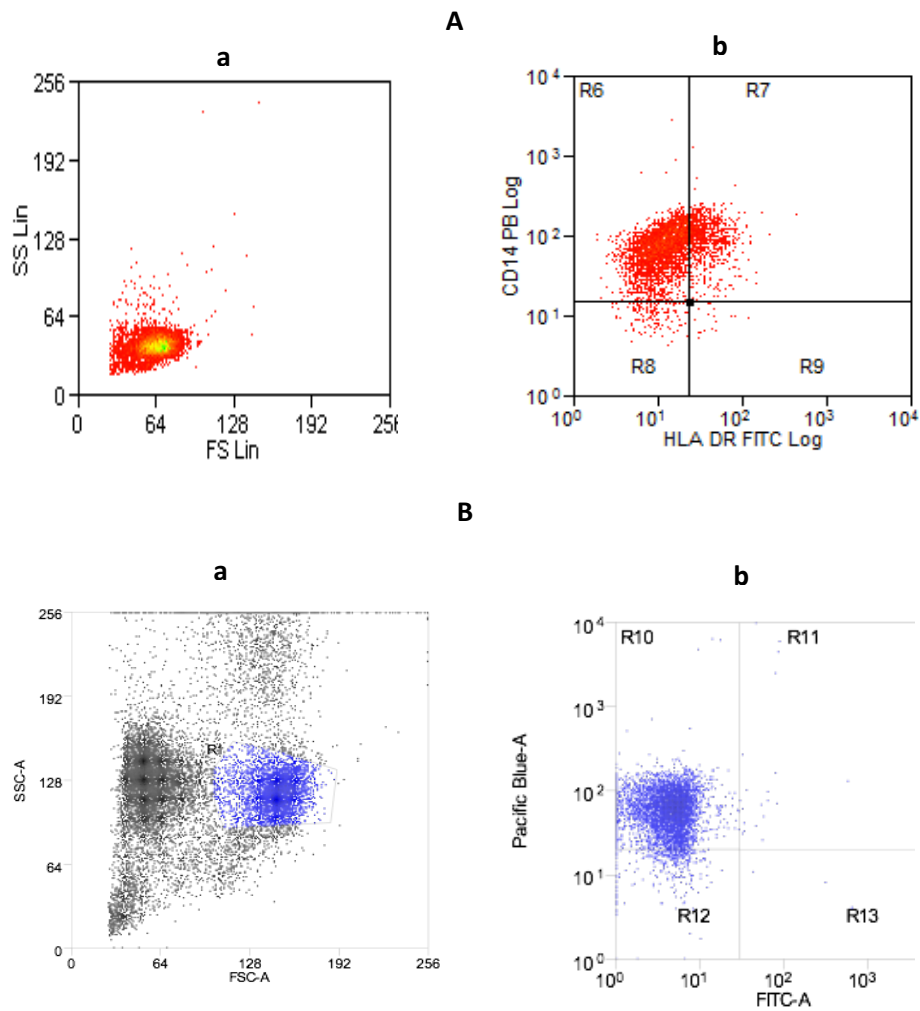
La expresión de los distintos marcadores de superficie de las diversas poblaciones celulares que se analizaron en este trabajo fue determinada mediante citometría de flujo. Una vez realizado el gradiente de densidad y obteniendo a partir de éste las células mononucleares humanas y ovinas de sangre periférica (PMBCs), se procedió a analizar la muestra para ubicar la región correspondiente a los monocitos ovinos, ya que el tamaño de éstos en relación a los monocitos humanos, es diferente. A continuación, en la Figura 4 se muestran ambas poblaciones de PMBCs, donde los monocitos se encuentran en la región marcada con un círculo en el histograma.



**Figura 4. Histogramas mostrando poblaciones de células mononucleares humanas y ovinas de sangre periférica.** En el panel A se muestran células mononucleares humanas (a, en rojo) y ovinas (b, en azul) obtenidas por gradiente de densidad. El eje de las ordenadas corresponde a la granulabilidad y el de las abscisas al tamaño celular. En el panel B se muestran las células mononucleares humanas (a) y ovinas (b), en el eje de las abscisas se observa la tinción positiva para CD14.

### 6.3.2 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MONOCITOS

Se realizó la purificación de la población de monocitos mediante perlas magnéticas acoplados a CD14+. A continuación, en la **Figura 5** se muestra la región que corresponde a monocitos humanos y ovinos, mediante tamaño y granularidad, además de la expresión del marcador de monocitos CD14+.



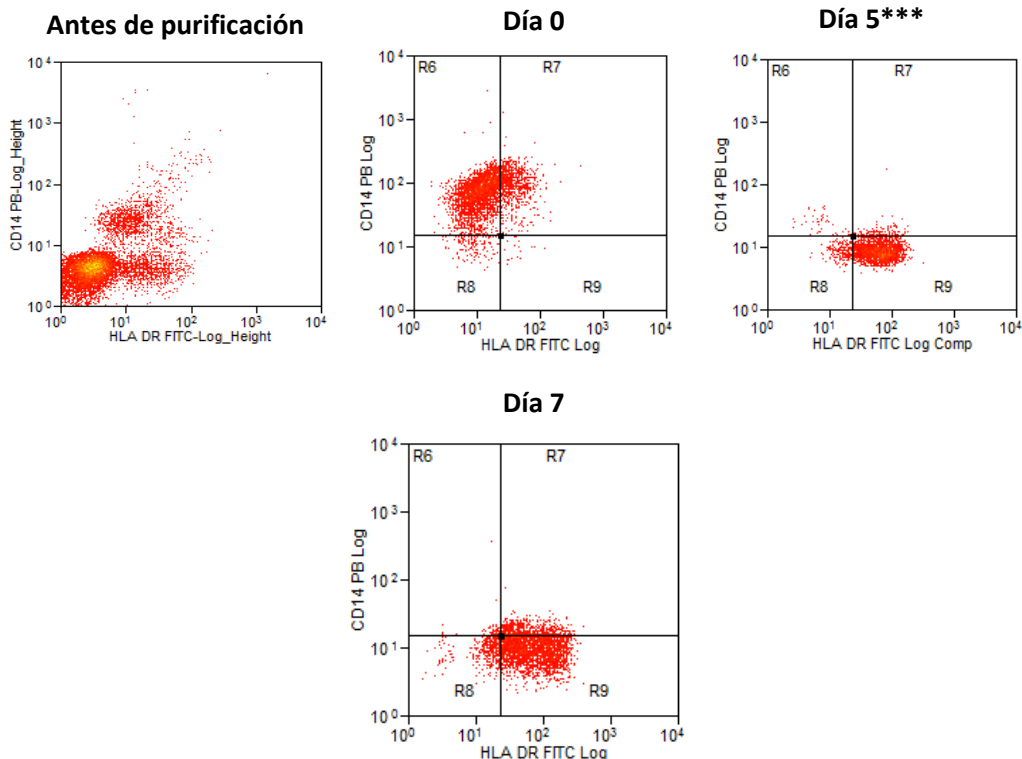
**Figura 5. Histogramas mostrando la purificación de la población de monocitos mediante perlas magnéticas.** En el panel A se muestran monocitos humanos (a, en rojo), el eje de las ordenadas corresponde a la granularidad y el de las abscisas al tamaño celular. En (b, en rojo) se muestran monocitos humanos con la tinción positiva a CD14 en el eje de las ordenadas. En el panel B se muestra el tamaño y granularidad de monocitos ovinos (a, en azul) y la tinción positiva con CD14 (b, en azul).

### 6.3.3 MONOCITOS ESTIMULADOS CON IL-4 Y GM-CSF

Con el fin de lograr una correcta estandarización de la diferenciación de monocitos ovinos hacia CDs, fue necesario comparar el comportamiento en la expresión de marcadores de superficie con las CDs humanas. La población de monocitos humanos y ovinos purificados mediante perlas magnéticas fue cultivada en presencia de IL-4 y GM-CSF; transcurrido el tiempo del cultivo, la expresión de marcadores fue evaluada mediante citometría de flujo. La disminución del CD14 es uno de los factores que regularmente se evalúa durante la diferenciación de monocitos a CDs. En este trabajo, se observa la pérdida en la expresión de CD14 en CDs humanas derivadas de monocitos, luego de la incubación en presencia del coctel de citocinas durante 6 días (CD14<sup>-</sup>). Este marcador disminuyó notablemente a los 5 días en el caso de los monocitos ovinos (CD14<sup>low</sup>). Adicionalmente, se ha reportado el uso de LPS como potente inductor de maduración,<sup>29</sup> por lo que las CDs tanto ovinas como humanas fueron tratadas con LPS de *E. coli* al quinto día de cultivo (mostrado con tres asteriscos en la Figura 6). A continuación, se muestra en la **Figura 6A** la pérdida de la expresión de CD14 en CDs humanas y en la **Figura 6B** la disminución de CD14 en CDs ovinas.

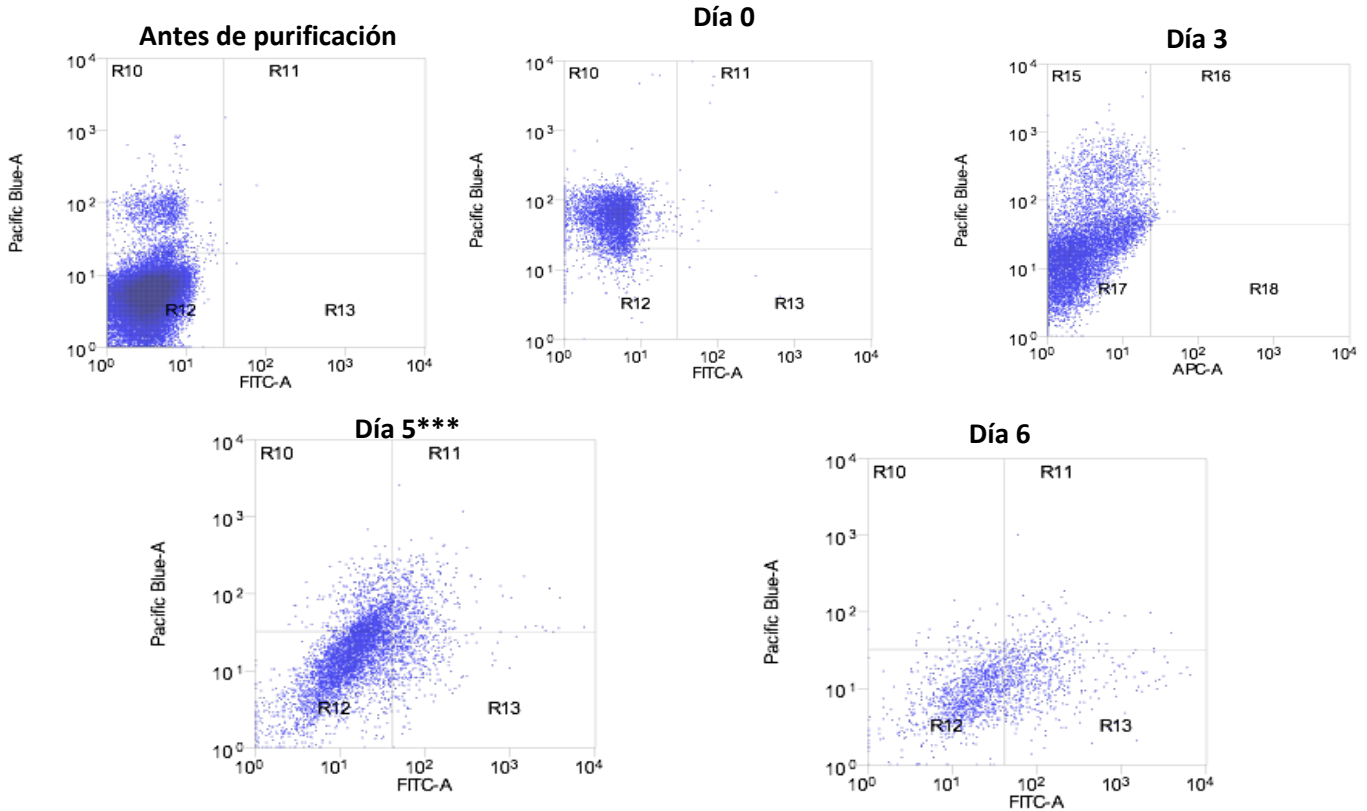
#### Expresión de CD14+

A



B

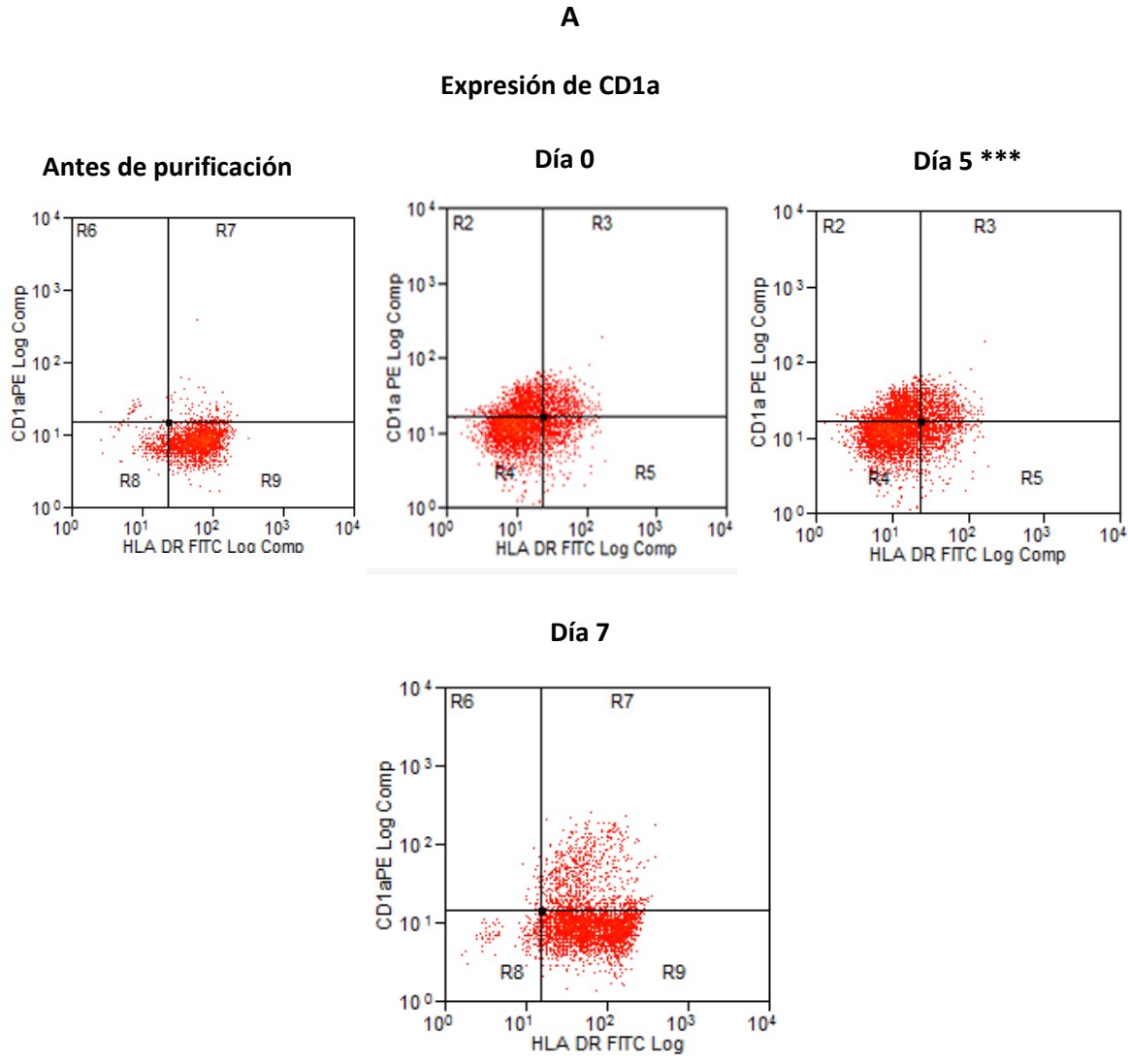
Expresión de CD14+



**Fig. 6 (A y B) Histogramas mostrando la expresión de CD14 durante el proceso de diferenciación a CD<sub>s</sub>.** En el panel A se muestra la disminución en la expresión de CD14 en CD<sub>s</sub> humanas. En el panel B se muestran CD<sub>s</sub> ovinas. El eje de las ordenadas corresponde a la tinción positiva o negativa de CD14 (conjugado con PB) dependiendo del estadio de diferenciación y tiempo transcurrido.

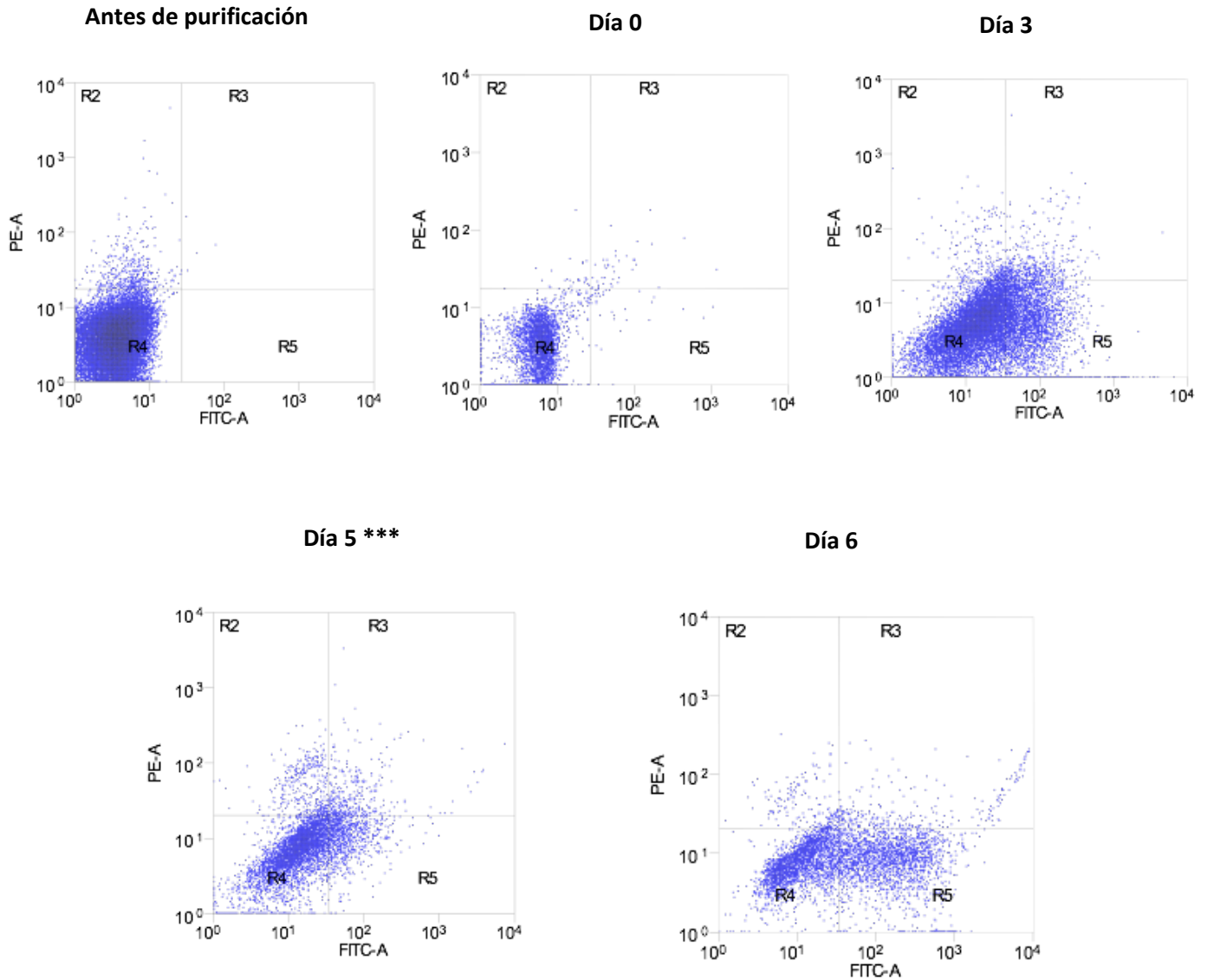
### 6.3.4 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE DE CDs

Entre los marcadores fenotípicos específicos para CDs se encuentran CD1a y CD11c, en el caso de CDs humanas, y para CDs ovinas es el CD1w2. La expresión de todos ellos aumentó en CDs derivadas de monocitos luego de la incubación en presencia del coctel de citocinas. La máxima expresión de CD1a fue al séptimo día en CDs humanas y al quinto día en el caso de CDs ovinas. A continuación se muestra en la **Figura 7A** el nivel de expresión de dichos marcadores en CDs humanas y en la **Figura 7B**, la expresión en CDs ovinas en relación a los días de cultivo para la diferenciación celular. La estimulación con LPS está señalada con tres asteriscos.



**B**

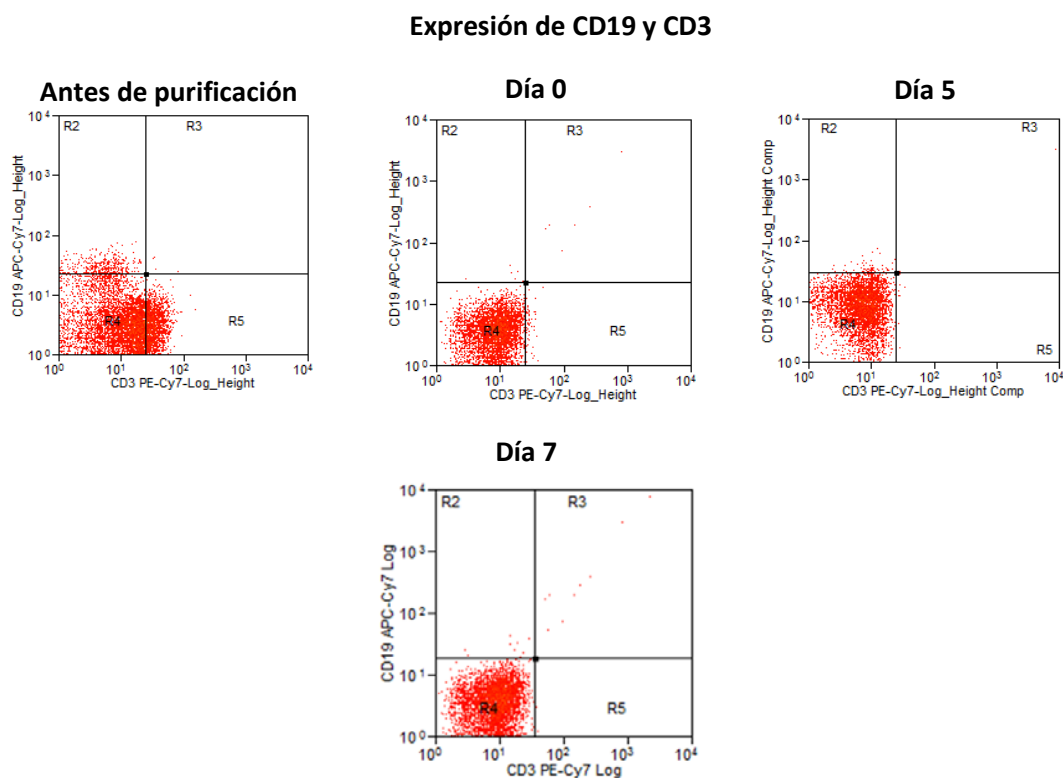
**Expresión de CD1w2**



**Fig. 7 (A y B) Histogramas mostrando la expresión de CD1a y CD1w2 durante el proceso de diferenciación a CD.** En el panel A se muestra el aumento en la expresión de CD1a en CD humanas. En el panel B se muestra el aumento de CD1w2 en CD ovinas. El eje de las ordenadas corresponde a la tinción positiva o negativa de CD1a o Cd1w2 (ambos conjugados con PE) dependiendo del estadio de diferenciación y tiempo transcurrido.

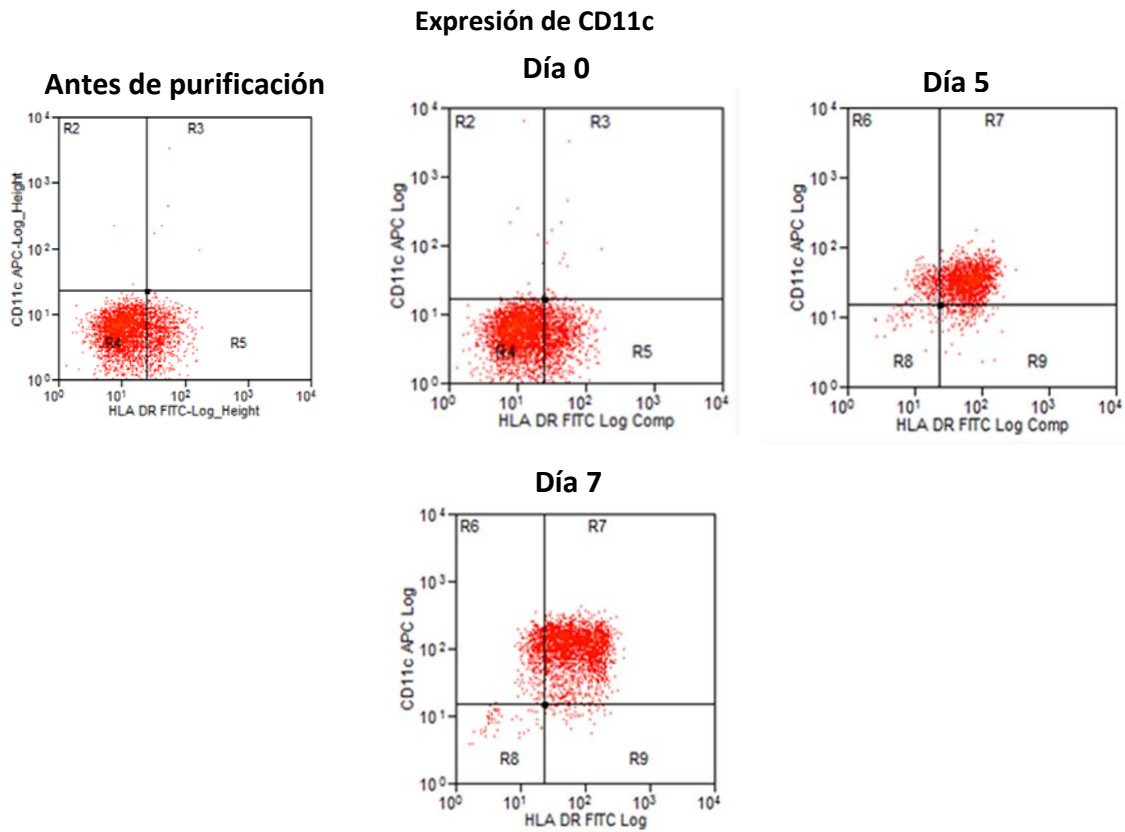
### 6.3.5 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE EN CDs HUMANAS

En el caso de la población de CDs humanas, existen en el mercado diversos anticuerpos que además de confirmar la diferenciación celular mediante el marcaje positivo a CD1a y negativo para CD14, se evalúan negativamente marcadores como el CD19, el cual es un marcador característico de Linfocitos B y el CD3, que es un marcador presente en el Linfocito T. Así mismo, existe en el mercado el anticuerpo contra el marcador CD11c, característico de CDs humanas. En la **Figura 8** se muestran los histogramas evidenciando el marcaje negativo para CD19 y CD3. Además en la **Figura 9** se muestra el marcaje positivo a CD11c. Desafortunadamente, no existen en el mercado anticuerpos que identifiquen CD19, CD3 y CD11c o sus equivalentes, en células ovinas.



**Fig. 8** Histogramas mostrando la expresión de CD19 y CD3 durante el proceso de diferenciación de monocitos a CDs. El eje de las ordenadas corresponde a la tinción negativa de CD3 y el eje de las abscisas a CD19.



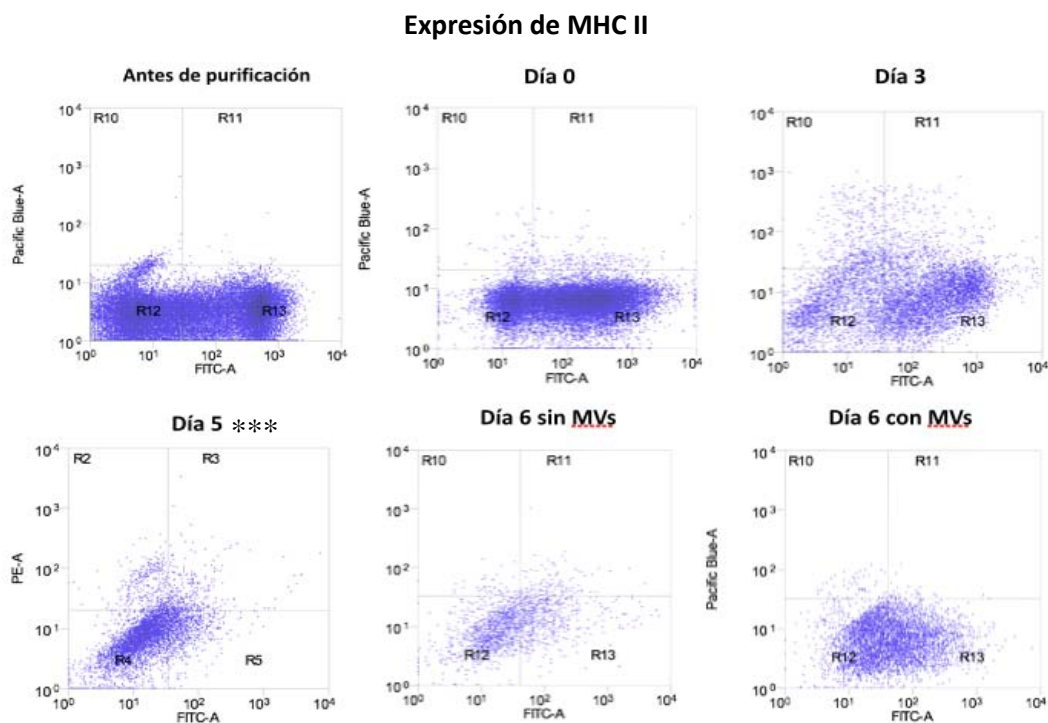


**Fig. 9** Histogramas mostrando la expresión de CD19 y CD3 durante el proceso de diferenciación de monocitos a CD. El eje de las abscisas corresponde a la tinción de CD11c.

### 6.3.7 TRATAMIENTO DE CDs OVINAS CON MVs DE *Mannheimia haemolytica* A2

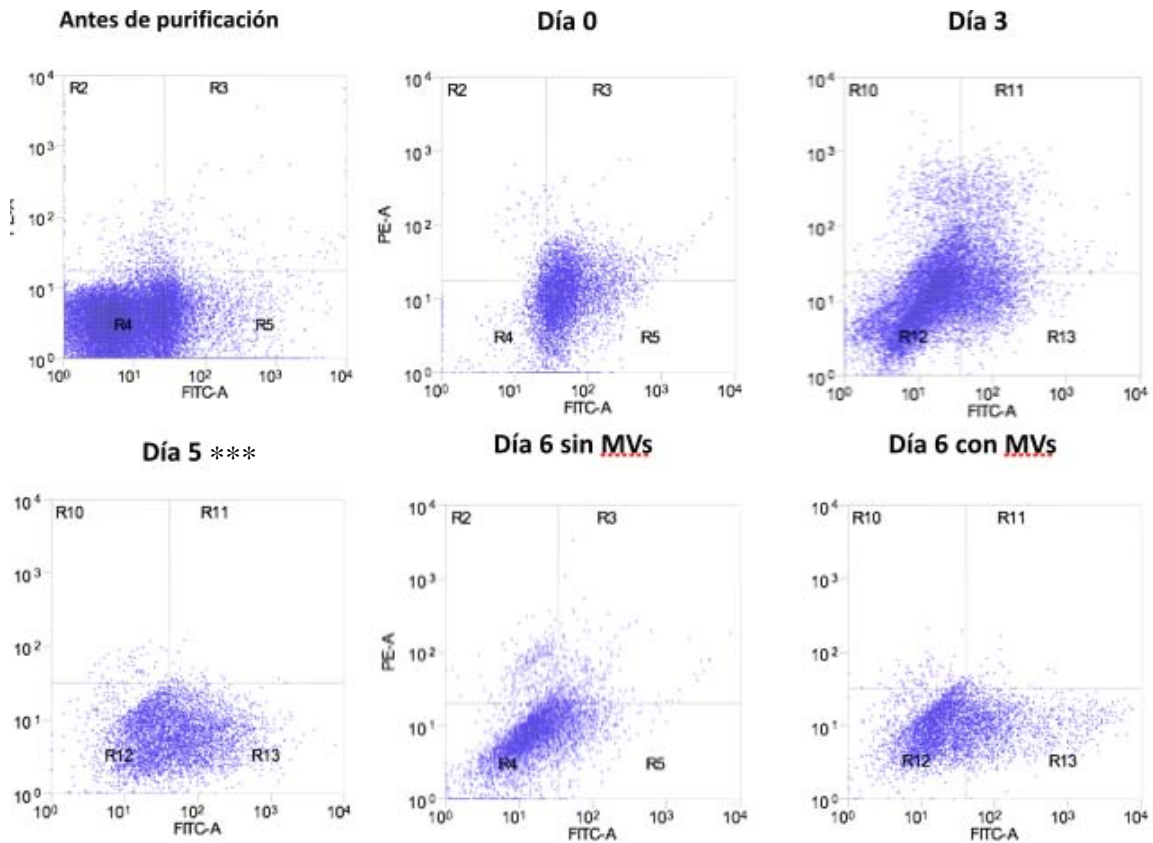
Las CDs de ovino fueron tratadas con MVs por 24 h con una concentración de 50  $\mu\text{g}/3$  ml del medio de cultivo, con el fin de evaluar la expresión de MHC-II y de la molécula coestimuladora CD86, puesto que si hay un correcto procesamiento antigénico de las MVs de *M. haemolytica*, ambas moléculas tenderán a aumentar su expresión. Se observó un aumento en la expresión de las moléculas MHC-II y CD86 en CDs ovinas tratadas con MVs, en comparación con las CDs que no recibieron tratamiento. Con ello se confirmó que la modulación de la respuesta inducida por antígenos de MVs sobre la CPA, en este caso la CD, constituye uno de los mecanismos de presentación antigénica.

A continuación, en la **Figura 10** se muestra el aumento de moléculas de MHC-II con tratamiento con MVs y en la **Figura 11** el aumento de CD86 en CDs ovinas. La estimulación con LPS se señala con tres asteriscos.



**Fig 10. Histogramas mostrando el aumento en la expresión de MHC-II.** En los paneles se muestra en el eje de las ordenadas, la tinción positiva del MHC-II (conjugado con FITC).

## Expresión de CD86



**Fig 11. Histogramas mostrando el aumento de la molécula co-estimuladora CD86 después del tratamiento con MVs. En los paneles se muestra en el eje de las ordenadas, la tinción positiva de CD86 (conjugado con FITC).**

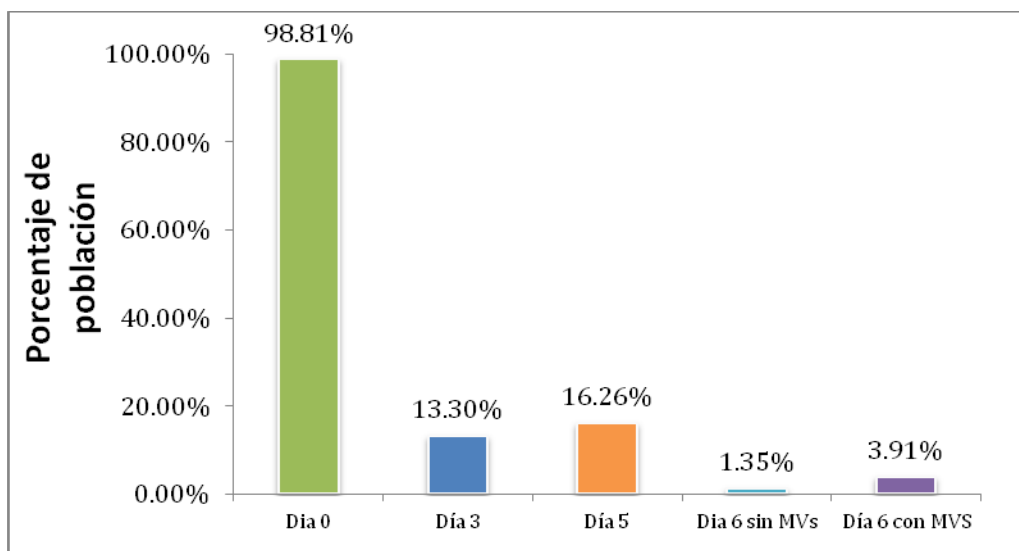
### 6.3.6 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD14, CD1w2, MHC-II Y CD86 EN CDs OVINAS

Además de mostrar la expresión de los marcadores de superficie por histogramas de citometría de flujo, se procedió a cuantificar la expresión en términos de porcentaje de población e intensidad media de fluorescencia. A continuación, se representa en un diagrama de barras la expresión de CD14, como porcentaje de la población: el número total de células dentro de una población definida, que expresan la molécula (**Figura 12A**) y la intensidad media de fluorescencia (**Figura 12B**), como la cantidad de moléculas expresadas sobre la superficie celular. Asimismo, se muestra la disminución en la expresión de CD14, luego de la incubación en presencia del coctel de citocinas durante 6 días para lograr la diferenciación celular de monocitos a CDs Ovinas (CD14<sup>low</sup>). Al sexto día se observa un ligero aumento en su expresión, esto pudiera ser debido a la estimulación con MVs, ya que su función biológica es reconocer el LPS presente en células bacterianas. Es importante mencionar que todos los marcadores de superficie evaluados en este trabajo muestran aumento en su expresión post-tratamiento con MVs de *M. haemolytica*

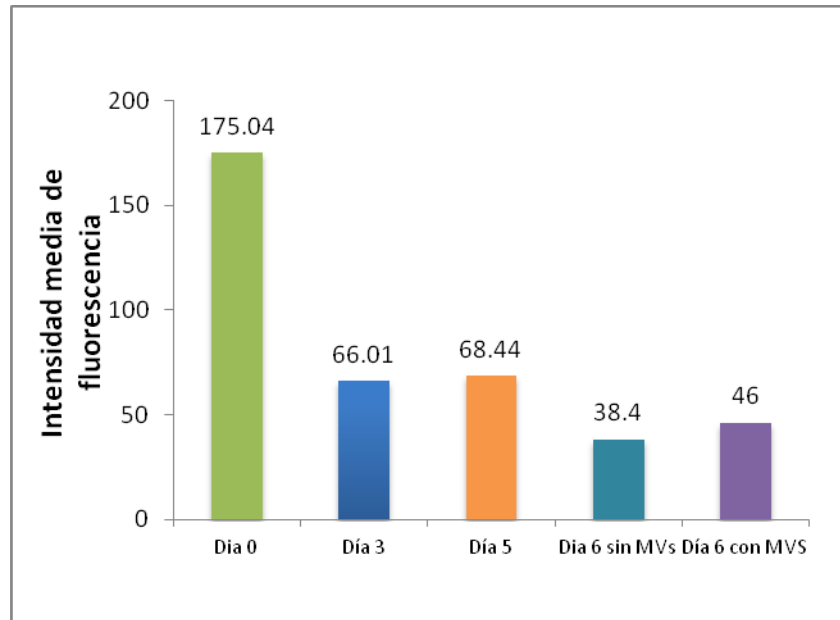
A2

#### Expresión de CD14

A



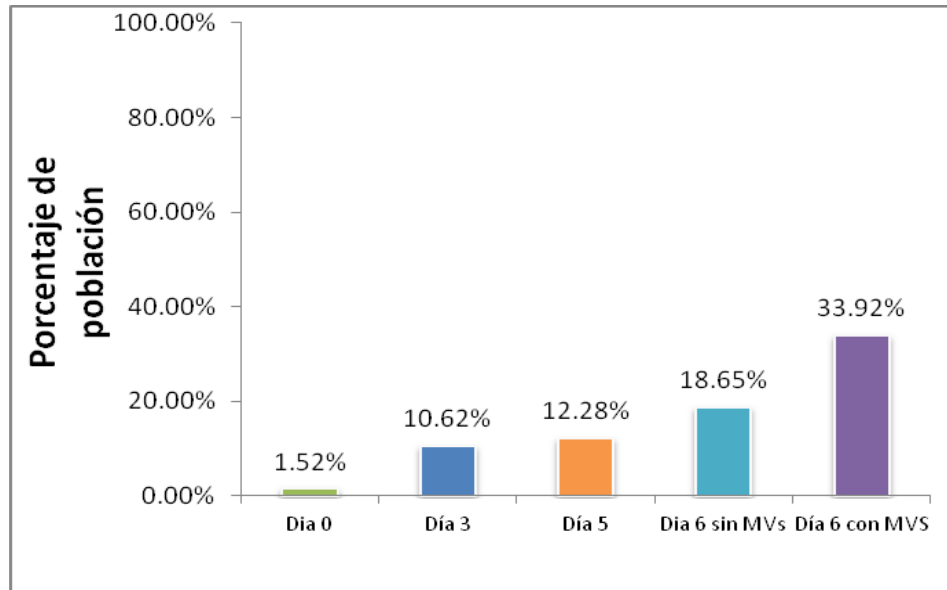
**B**



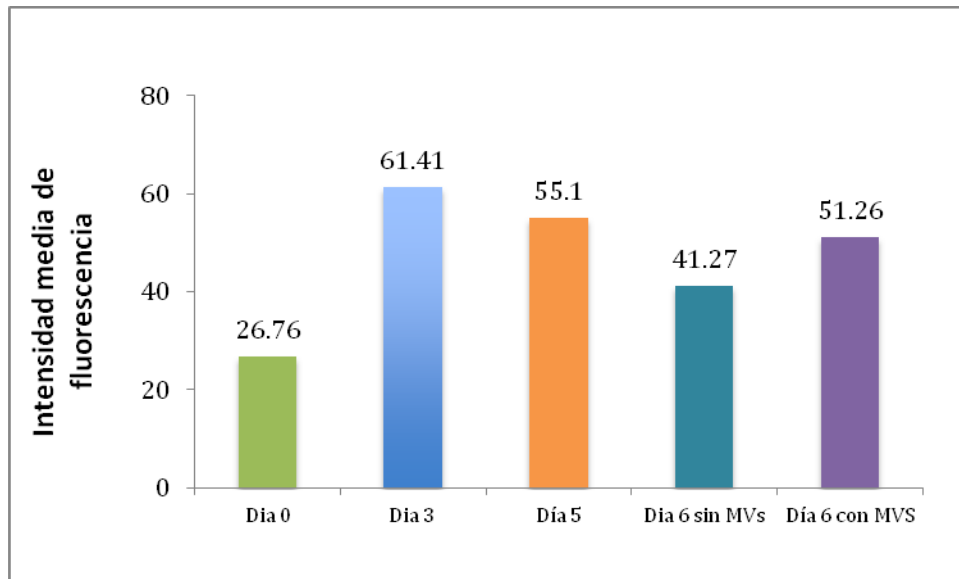
**Fig 12. (A y B) Porcentaje e intensidad media de fluorescencia de la expresión de CD14 en CDs.**

Como mencionamos anteriormente, uno de los marcadores específicos de CDs ovinas es el CD1w2<sup>41,42</sup>. Por tanto, se procedió a analizar este marcador celular y los resultados se muestran en la **Figura 13 (A y B)**. Se observa una tendencia al aumento de expresión de dicho marcador luego de la incubación en presencia del coctel de citocinas durante 6 días para lograr la diferenciación celular de monocitos a CDs Ovinas.

**A**



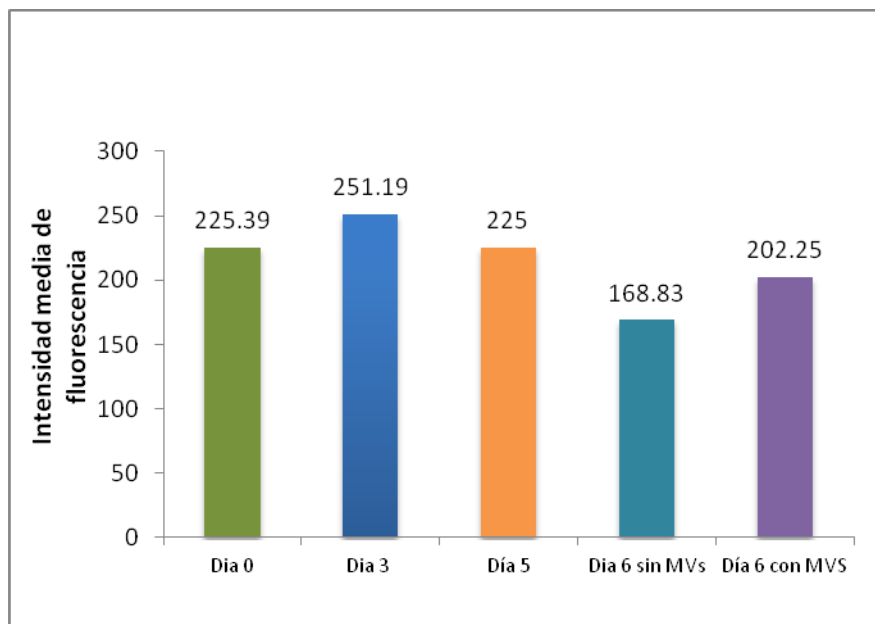
**B**



**Fig 13 (A y B).** Porcentaje e intensidad media de fluorescencia de la expresión de CD1w2 en CD<sub>s</sub> ovinas.

Una vez que se evaluaron los marcadores característicos sobre la superficie celular de CDs ovinas, se midió la expresión del MHC II, la cual es constitutiva en CPA, como las CDs. Estas células, al entrar en contacto con algún antígeno exógeno, inician el procesamiento y degradación del antígeno proteico hasta péptidos. En este trabajo se evaluó la expresión del MHC II durante todo el proceso de diferenciación de monocitos hacia CDs, y se puede observar que conforme transcurre el tiempo, la expresión de dicha molécula disminuye; esto pudiera ser debido a que una CD inmadura expresa una menor cantidad de MHC II en su superficie en relación a una CD madura.<sup>42-45</sup> La expresión del MHC II en CDs expuestas a MVs de *M. haemolytica* A2, muestra una tendencia a aumentar después de 24 h post-tratamiento. A continuación, en la **Fig 14** se muestra en un diagrama de barras el aumento de moléculas de MHC-II después del tratamiento con MVs.

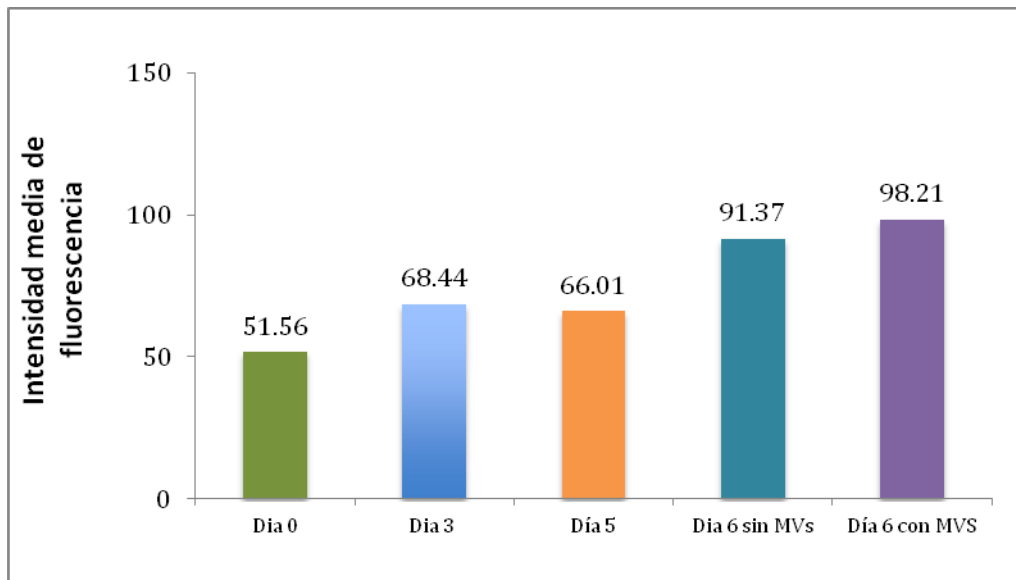
### Expresión de MHC II



**Fig 14.** Aumento en la expresión de MHC II en CDs ovinas debido a la interacción con MVs de *M. haemolytica*.

Además se evaluó la expresión de CD86, molécula coestimuladora que es pieza fundamental para la presentación antigénica. En este trabajo se evaluó CD86 durante todo el proceso de diferenciación de monocitos hacia CDs, y se pudo observar que conforme va transcurriendo el tiempo, la expresión de dicha molécula se estabiliza. Es importante mencionar que el nivel de expresión de CD86 en una CD inmadura es menor en comparación de una CD madura. Así mismo, la expresión de CD86 en CDs expuestas a MVs de *M. haemolytica* A2, muestra una tendencia a aumentar después de 24 h post tratamiento. Lo anterior pudiera ser debido a que dicha molécula se expresa paralelamente con el MHC II durante el procesamiento y presentación de antígenos.<sup>29</sup> A continuación, en la **Fig 15** se muestra el diagrama de barras en donde se observa un ligero aumento de moléculas de CD86 con el tratamiento con MVs.

### Expresión de CD86

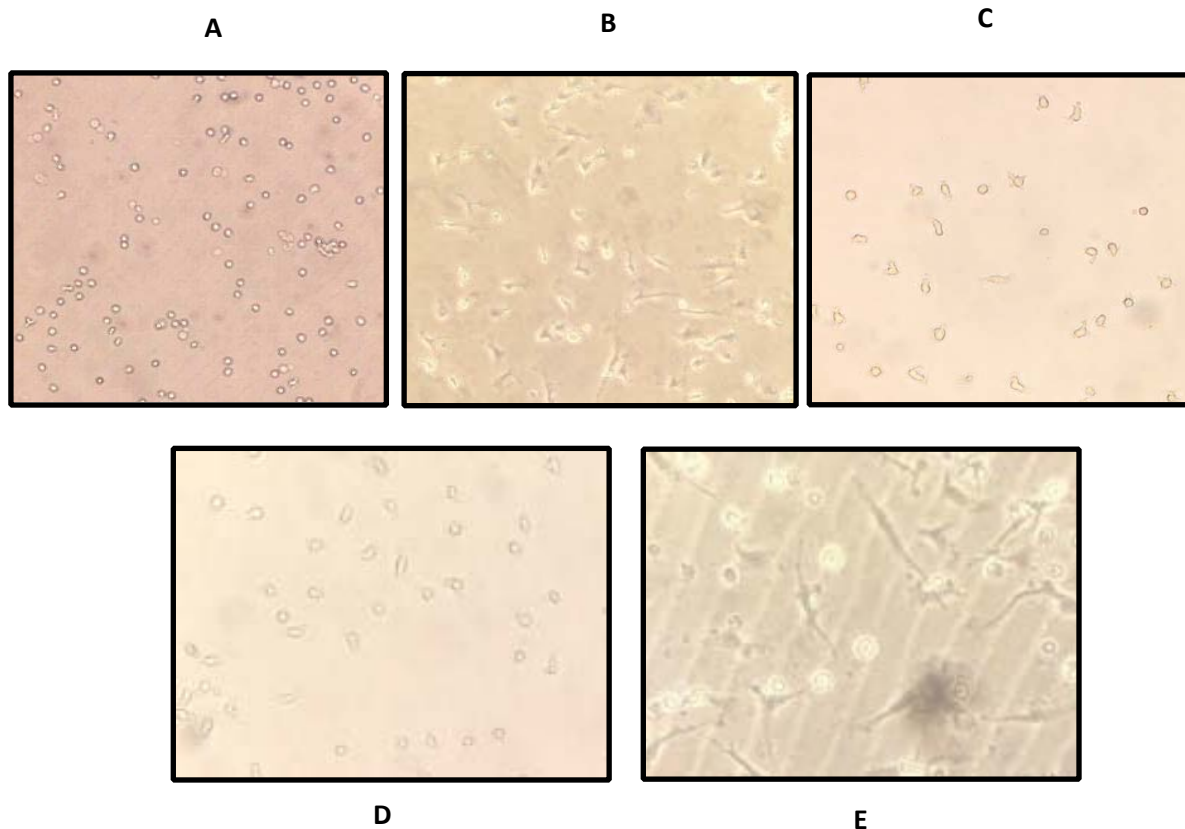


**Fig 13 . Aumento en la expresión de CD86 en CDs ovinas debido a la interacción con las MVs de *M. haemolytica*.**



### 6.3.7 MORFOLOGÍA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

A continuación se muestran fotografías durante la diferenciación celular de monocitos hasta células dendríticas de ovino.



**Fig. 14 Microscopía óptica de las células en diferentes estadios de diferenciación.** Panel A: Monocitos recién purificados; B: Tercer día de cultivo, se observan células adheridas al fondo de la placa que pudieran corresponder a macrófagos, pero además se observan células redondeadas que corresponden a CDs; C: Quinto día, se aprecia que no hay células adherentes, su morfología es más redonda y con prolongaciones. D: Células al sexto día sin tratamiento con MVs; E: Células al sexto día de cultivo con tratamiento de MVs, se puede observar el aumento de tamaño.

## 7.0 DISCUSIÓN

Las bacterias Gram negativas han desarrollado diferentes mecanismos para la secreción de sus factores de virulencia, los cuales tienen efecto directo sobre las células tisulares y de defensa del huésped, provocándoles cambios que favorecen la colonización bacteriana. La secreción extracelular de sus productos, es el principal mecanismo por el cual los patógenos Gram negativos generan daño al huésped. Estos sistemas de secreción extracelular incluyen los tipos I-VIII, que transportan diversos factores de virulencia activos tales como proteasas, adhesinas, hemolisinas y toxinas. Además, algunos de estos factores pueden ser secretados en vesículas de membrana externa bacteriana (MVs) como productos biológicamente activos.<sup>46</sup> En 2007, González y col. caracterizaron los principales Ags acarreados en MVs de *M. haemolytica* A2.

Por otra parte, se han reportado en numerosos estudios la capacidad inmunogénica de las MVs. En el 2013, Roier y col., inocularon MVs de *M. haemolytica* serotipo A1 via intranasal en ratones, para evaluar el aumento de títulos de inmunoglobulinas: IgM, IgG e IgA, demostrando que estas estructuras son capaces de inducir respuestas inmunes humorales y de mucosas.<sup>47</sup>

Asimismo, las MVs se han reportado como potentes inmunomoduladores de la respuesta inmune innata. En 2013, Alaniz y col., determinaron que las MVs de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium estimulan a las CPAs en condiciones *in vitro*, en niveles similares a como lo hacen las células bacterianas. Células dendríticas y macrófagos de ratón estimulados con MVs presentaron un aumento en la expresión de MHC-II y CD86. Asimismo, reportan el aumento en la producción de mediadores pro-inflamatorios como: óxido de nitrógeno (NO), factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina 12.<sup>29</sup>

El objetivo del presente trabajo, fue determinar la estimulación *in vitro* de CDs ovinas debido a la interacción con MVs de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2. Por lo que se procedió a analizar los perfiles proteínicos de las MVs y las proteínas de membrana externa bacteriana (PME) mediante SDS-PAGE, encontrando que las PME están presentes en el perfil de bandeo de las MVs, debido a la biogénesis de estas últimas. Lo anterior

concuerta con lo reportado por Gonzalez y col. y también se ha descrito para *Haemophilus influenzae* y *Pasteurella multocida*.<sup>47</sup>

La presencia de MVs se demostró mediante microscopía electrónica de transmisión y se observó la formación de estas estructuras a partir de la membrana bacteriana. La morfología de las MVs de *M. haemolytica* A2 observadas al microscopio electrónico muestra similitud con lo ya reportado en *P. aeruginosa*, *Avibacterium paragallinarum*, *E. coli*, *Francisella novicida* y *Brucella melitensis*, entre otras.<sup>22,23,48,49</sup>

Además, también fue corroborada la pureza de las MVs obtenidas por ultracentrifugación. En 1999, Beveridge y col., reportaron que las MVs de *P. aeruginosa* miden de 50 a 250 nm de diámetro. En el presente trabajo, hemos demostrado que las MVs de *M. haemolytica* entran en dicho rango<sup>46</sup>.

Actualmente se han estudiado los mecanismos que regulan la producción y el papel de las MVs en la fisiología bacteriana; sin embargo, las interacciones entre MVs y las defensas del huésped se conocen parcialmente. Esto es particularmente importante porque las bacterias Gram-negativas interactúan con el sistema inmune del hospedero en varias etapas del ciclo infeccioso.

La primera línea de defensa del hospedero corresponde al sistema inmune innato, del que forman parte las células dendríticas (CDs). Las CDs, son fundamentales también en el inicio de una respuesta inmune adaptativa en contra de patógenos microbianos *in vivo*. Debido a que las CDs son consideradas células profesionales presentadoras de Ag (CPAs), es necesario tener un modelo de interacción entre CDs y MVs en condiciones *in vitro*. Por lo anterior, se realizó la diferenciación de monocitos sanguíneos de ovino a CDs.

En el presente estudio, se realizó inicialmente la diferenciación celular de monocitos a CDs humanas, con el fin de estandarizar la técnica para células ovinas y se evaluaron las diferencias entre CDs de ambas especies, esto se hizo a través de la medición de distintos marcadores de superficie celular mediante citometría de flujo. En la primera etapa, (en ambas especies), se realizó la purificación de monocitos por perlas magnéticas como anteriormente fue descrito y mediante citometría de flujo se confirmó la purificación celular al obtener un 98% de células CD14 positivas, cabe mencionar que este último es un

marcador de monocitos. La población de monocitos humanos y ovinos purificados mediante perlas magnéticas fue cultivada en presencia de IL-4 y GM-CSF.<sup>50</sup> En el presente estudio se comprobó que las interleucinas recombinantes humanas: IL4 y GM-CSF no funcionan con monocitos ovinos para llevar a cabo la diferenciación a Células dendríticas, contrario a lo reportado por Fach y col . en el año 2006.<sup>51</sup>

En el 2002, Chan y col., establecieron el uso de interleucina 4 (IL-4) y del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) recombinante de ovino para la generación de CDs, por lo que en este trabajo se utilizaron ambas interleucinas.

Transcurrido el tiempo del cultivo, la expresión de marcadores fue evaluada mediante citometría de flujo y se observó pérdida en la expresión de CD14 para el caso de CDs humanas. En el caso de las CDs ovinas, éstas solamente mostraron una disminución en la expresión de CD14. Lo anterior concuerda con lo reportado en la generación *in vitro* de CDs bovinas y porcinas, las que se encontró que presentan un patrón de expresión de la molécula como CD14<sup>low</sup>. En el año 2000, Ryan y col. reportaron que al aislar CDs ovinas de ganglios linfáticos aferentes, estas células tuvieron una expresión CD14<sup>-</sup> o CD14<sup>low</sup>.<sup>52</sup>

Se evaluó también un marcador específico de CDs, en el caso de seres humanos es CD1a y para los rumiantes es denominado CD1w2, y se observó que luego de la incubación en presencia del cóctel de citocinas durante 6 días (CDs humanas) y 5 días (CDs ovinas), la expresión de dichos marcadores aumentó, indicando que si se logró la diferenciación a CDs. En el caso de CDs humanas, también fue posible evaluar la expresión de las moléculas CD19, CD3 y CD11c, que son características de Linfocitos B, Linfocitos T, y CDs humanas, respectivamente. Lamentablemente en el mercado no existen estos últimos marcadores para ovinos.<sup>52</sup>

Asimismo, la diferenciación de monocitos a CDs se evaluó a través de microscopía óptica. Se encontró que al primer día las células estaban redondas y no adherentes, las cuales correspondían a monocitos. En el tercer día se observaron células adherentes y aumentadas de tamaño, lo cual nos habla de una transición en la etapa de diferenciación celular y finalmente, al quinto día, se observaron células no adherentes con prolongaciones citoplásmicas sobre la superficie de su membrana. Se estableció que es

hasta el quinto día en el cual se logra la diferenciación a CDs ovinas, debido a su morfología y fenotipo por citometría de flujo.<sup>53</sup>

Una vez diferenciadas, se procedió al tratamiento de las CDs ovinas con MVs de *M. haemolytica* serotipo A2. En los histogramas de citometría de flujo se encontró que las CDs tratadas con MVs, muestran un aumento en la expresión de MHC-II, en comparación a las células sin tratamiento. También se evaluó la expresión de CD86, debido a que es una molécula fundamental para el correcto procesamiento y presentación de Ags y se determinó que su expresión sobre la superficie celular de las CDs también estaba aumentada. La molécula CD1w2, característica de CD de rumiantes, a su vez mostró el mismo comportamiento. Todos estos resultados nos indican que las células generadas a partir de monocitos corresponden a CDs inmaduras en una etapa inicial, pero al interactuar con MVs de *M. haemolytica* serotipo A2, se diferenciaron a CDs maduras, capaces de realizar adecuadamente el procesamiento y presentación del Ag.

## 8.0 CONCLUSIONES

- 1) En el presente trabajo se identificaron los patrones proteínicos y la presencia de las vesículas de membrana externa bacteriana (MVs) de *M. haemolytica* serotipo A2 por microscopía electrónica.
- 2) Se logró la estandarización en la técnica de obtención y purificación de monocitos sanguíneos ovinos, además se comprobó que es necesario el uso de interleucinas recombinantes ovinas, para la correcta diferenciación a células dendríticas (CDs) mediante el uso de IL-4 y GM-CSF.
- 3) Los resultados de citometría de flujo sobre la expresión de marcadores de superficie celular característicos de CDs ovinas, como CD1w2, MHC-II, así como la ausencia del marcador CD14 y los cambios morfológicos observados por microscopía óptica durante el periodo de diferenciación celular, nos permitió corroborar la correcta obtención de CDs a partir de monocitos sanguíneos.
- 4) Se determinó el nivel de expresión de MHC-II, CD86 y CD1w2 por citometría de flujo en CDs ovinas tratadas con MVs. La diferencia con respecto a las células que no fueron tratadas nos permitió afirmar la eficiente estimulación de las CDs y el importante papel inmunomodulador de las MVs de *M. haemolytica* serotipo A2 sobre la respuesta inmune innata de ovinos.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Jaramillo, A., C., J., Suárez, G., F., Trigo, J., F., 2009. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. Veterinaria México. 40 (3)
2. J. A. Rice, L. Carrasco-Medina, D. C. Hodgins and P. E. Shewen (2007). *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. Animal Health Research Reviews, 8 , pp 117-128 doi:10.1017/S1466252307001375
3. VM Nava-López, J Oliva-Hernández, JA Hinojosa-Cuellar. Mortality of hair sheep during three climatic seasons in a commercial flock in the Chontalpa, Tabasco, Mexico. UJUAT. Publicaciones/uciencia 22 (2):119-129 2006
4. Esslemont RJ, Kossaibati MA. The cost of respiratory diseases in dairy heifer calves. Bov Pract 1999;33:174-178.
5. Scott Philip R. Treatment and Control of Respiratory Disease in Sheep Veterinary Clinics Of North America-Food Animal Practice Mar 2011 Vol. 27 pp175-+
6. Juan Antonio Chávez Durón Pau Pijoan Aguadé. Cost in pneumonia in dairy calves lodged under two housing systems. Vet. Méx., 34 (4) 2003
7. Maiga, S. 1992. Small ruminant morbidity and mortality in the Delta of Niger, Mali. Small Ruminant Research. 9:181-188.
8. Tefera, G., Smola, J., 2001. *Pasteurella haemolytica* Complex of *Pasteurella* sensu stricto as new genus *Mannheimia*: changes in taxonomy. Vet. Med. 46:119-124.
9. Angen, O., Mutters, R., Caugant, D. A., Olsen, J. E., Bisgaard, M., 1999. Taxonomic relationship of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16 s rRna sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen.nov, *Mannheimia granulomatis* comb.nov., *Mannheimia glucosida* sp. Nov., *Mannheimia ruminalis* sp. Nov. and *Mannheimia varigena* sp. Nov., Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 67-86.
10. González, R. C., Tenorio, G. V., De la Garza, A. M. G., Trigo, T. F., 2007. Evaluación y caracterización de vesículas de membrana externa (MVs) de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 para su posible utilización como vacuna en ovinos. Tesis de Doctorado; UNAM. FES-Cuautitlán.
11. P. Tauro, K.K. Kapoor, K. S. (1986) An Introduction to Microbiology, New Age Publishers, ISBN:0852268785

12. Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Mårild S, Svanborg C (September 1996). «Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract». Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (18): pp. 9827–32
13. Burrows, L., L., Olah-Winfield E., Lo, R., Y., 1993. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. Immun, 61. Infect. Immun. 61, 5001-5007
14. Henderson, I.R., Navarro, G.F., Desvaux M., Fernandez R.C., and Ala 'Aldeen D. 2004. Type V protein secretion pathway: The autotransporter store. Microbiol. Mol. Rev. 68: 692-744
15. Terry, J., B., 2000. Minireview. Structures of Gram-Negative Cell Walls and their derived membrane vesicles J. Bacter. 181:4725-4733
16. Stock JB, Rauch B, Roseman S. 1977. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 252:7850–61
17. Koch AL. 1998. The biophysics of the gram-negative periplasmic space. Crit. Rev. Microbiol. 24:23–59
18. Raivio TL. 2005. Envelope stress responses and gram-negative bacterial pathogenesis. Mol. Microbiol. 56:1119–28
19. Atsuo Amano, Hiroki Takeuchi, Nobumichi Furuta Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions Department of Oral Frontier Biology, Osaka University Graduate School of Dentistry, 1-8 Yamadaoka, Suita-Osaka 565-0871, Japan
20. Deatherage, B. L.; et al. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. Mol. Microbiol. 2009, 72 (6), 1395–407.
21. Mashburn LM, Whiteley M. 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. Nature 437:422–25
22. Tony Pierson, Demetrios Matrakas, Yuka U. Taylor, Ganiraju Manyam, Victor N. Morozov, Weidong Zhou, Monique L. van Hoek. Proteomic Characterization and functional Analysis of Outer Membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as vaccine. Journal of proteome.
23. Kadurugamuwa, J. L., and T.J. Beveridge. 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal grow and exposure to gentamicin: A novel mechanism of enzyme secretions. J. Bacteriol. 177 p: 3998-4008



24. Renelli M, Matias V, Lo RY, Beveridge TJ. 2004. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* 150:2161–69
25. Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Fukuda M, Kawakami H, et al. 2009. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol.* 9:197184 Kulp
26. Satsuki, K., Yusuke, K., Donald, R. D., 2001. Outer membrane like vesicles secreted by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. Elsevier Science Ltd.
27. Sahlu Ayalew, Anthony W. Confer, Binu Shrestha, Amanda E. Wilson and Marie Montelongo. 2012. Proteomic Analysis and Immunogenicity of *Mannheimia haemolytica* Vesicles. *Clinical and Vaccine Immunology* p. 191–196 [cvi.asm.org](http://cvi.asm.org)
28. Sandro Roier, Judith C. Fenninger, Deborah R. Leitner, Gerald N. Rechberger, Joachim Reidl, Stefan Schild. 2013. Immunogenicity of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* outer membrane vesicles. *International Journal of Medical Microbiology*.
29. Robert C. Alaniz, Brooke L. Deatherage, Jimmie C. Lara and Brad T. Cookson. 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*. *The Journal of Immunology*.
30. J. H.L. Playfair and B.M. Chain. 2004. *Immunology at a Glance*. Seventh Edition. Blackwell Publishing.
31. Abul K. Abbas. Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober. 2005 *Inmunología celular y molecular*. Tercera Edición Mc Graw Hill.
32. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. New York: Garland Science; 2001.
33. Mayer, Gene . 2006. *Microbiology and Immunology On-Line Textbook*. USC School of Medicine.
34. Peter Wood. 2006 *Understanding immunology*. Second Edition. Pearson education.
35. J. H.L. Playfair and B.M. Chain. 2004. *Immunology at a Glance*. Seventh Edition. Blackwell Publishing.
36. Ian R. Tizard. *Introducción a la Inmunología veterinaria*. Octava Edición. Elsevier Saunders.

37. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271–96.
38. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767–811.
39. 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
40. Laemmli, W. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227:680-685
41. C. Miranda de Carvalho C, Bonnefont-Rebeix a,b, D. Rigal a, L. Chabanne. 2006. Dendritic cells in different animal species: an overview. *Pathologie Biologie* 54 (2006) 85–93
42. Simon S. M. Chan, Ian Mcconell, Barabara A. Blacklaws. 2006. Generation and characterization of ovine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. Department of Clinical Veterinary Medicine, University of Cambridge, Cambridge, UK. Blackwell Science Ltd
43. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1999; 392:245–52.
44. Reyes-Martínez JE, Nieto-Patlán E, Nieto-Patlán A, Gonzaga-Bernachi J, Santos-Mendoza T, Serafín-López J, Chávez-Blanco A, Sandoval-Montes C, Flores-Romo L, Estrada-Parra S, Estrada-García I, Chacón-Salinas R. Differential activation of dendritic cells by *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype.
45. Howard CJ, Naessens J. Summary of workshop findings for cattle *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 39:25–47.
46. Beveridge, T. J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 1999, 1181 (16), 4725–33.
47. Roier, S., Leitner, D.R., Iwashkiw, J., Schild-Prüfert, K., Feldman, M.F., Krohne, G., Reidl, J., Schild, S., 2012. Intranasal immunization with nontypeable *Haemophilus influenzae* outer membrane vesicles induces cross-protective immunity in mice. *PLoS ONE* 7, e42664.
48. Rocha M., García O., Pérez A., Ibarra J., Perez VM., Vaca S. Negrete-Abascal. 2006 Membrane vesicles released by *Avibacterium paragallinarum* contain putative virulence factors. *ederation of European Microbiological Societies* Published by Blackwell Publishing Ltd.

49. Kyong-Su Park, Kyoung-Ho Choi, You-Sun Kim, Bok Sil Hong, Oh Youn Kim, Ji Hyun Kim, Chang Min Yoon, Gou-Young Koh, Yoon-Keun Kim, Yong Song Gho. 2010. Outer Membrane Vesicles Derived from *Escherichia coli* Induce Systemic Inflammatory Response Syndrome. PLoS ONE.
50. David W. O'Neill and Nina Bhardwaj. 2005. Differentiation of Peripheral Blood Monocytes into Dendritic Cells. Current Protocols in Immunology (2005) 22F.4.1-22F.4.9
51. Hein, W. R. et al.1991. Comparison of reactivity of monoclonal antibodies on Bovine, ovine and caprine tissues and on cells from other animal species:Vet. Immunol. Immunopathol. 27: 3234.
52. Sasha J. Fach a,b, Susan L. Brockmeier b, Lea Ann Hobbs b, Howard D. Lehmkuhl b, Randy E. Sacco . 2006. Pulmonary dendritic cells isolated from neonatal and adult ovine lung tissue. Veterinary Immunology and Immunopathology 112 (171–182)
53. Yuen-Fen TAN BSc (Hons), MSc, Chooi-Fun and Soon-Keng Cheong. 2010. Observation of dendritic cell morphology under light, phase-contrast or confocal laser scanning microscopy. Malaysian J Pathol