



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“LOCALIZACIÓN ANATÓMICA EN TEJIDO PULMONAR
DE OVINO DE UNA HEMAGLUTININA DE *Mannheimia*
haemolytica A1, ESPECÍFICA A RESIDUOS DE ACIDO
SIÁLICO”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:
XOCHITL EVA GONZALEZ GONZALEZ

A S E S O R E S:
M en C LAURA JARAMILLO MEZA
Dr. FRANCISCO TRIGO TAVERA

MÉXICO D. F. 2005

m341726



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.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo el proyecto de investigación con número de registro 31164-B y número de becario 6315.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Como muestra de mi cariño y agradecimiento, por todo el amor y el apoyo brindado y porque hoy veo llegar a su fin una de las metas de mi vida. Agradezco la comprensión y orientación recibidas. Gracias.

A MIS HERMANOS:

Con cariño les dedico esta tesis por apoyarme, por creer en mi y por todos los consejos que constantemente me procuraron. Muchas gracias.

A MIS AMIGOS:

Gracias por sus palabras de aliento en los momentos de flaqueza pero sobre todo por brindarme su amistad.

A G R A D E C I M I E N T O S

A la M en C Laura Jaramillo Meza por darme la oportunidad de trabajar con ella en la realización de esta tesis, y por brindarme su experiencia en el área de la investigación.

Al M en C Francisco Aguilar Romero por su ayuda en la realización de esta tesis.

A mi gran amiga Hanzel Ceballos Prado por su compañerismo y participación.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
HIPÓTESIS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS PARTICULARES	8
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	43
LITERATURA CITADA	44

LOCALIZACIÓN ANATÓMICA EN TEJIDO PULMONAR DE OVINO DE UNA HEMAGLUTININA DE *Mannheimia haemolytica* A1, ESPECÍFICA A RESIDUOS DE ACIDO SIÁLICO.

RESUMEN

Para lograr un completo entendimiento de los mecanismos que inducen daño al tejido pulmonar en las infecciones por *M. haemolytica*, es necesario estudiar las interacciones dinámicas que se establecen entre la bacteria con la célula hospedera o con componentes aislados de ella; en particular con aquellos que le facilitan la adherencia y que son responsables de los eventos tempranos en la patogénesis de la enfermedad, pues existen evidencias de que además de reconocer o interactuar con su receptor, las adhesinas desencadenan efectos biológicos, determinando el desarrollo de la interacción bacteria-célula. Estudios previos muestran la participación de una hemaglutinina específica a residuos de *N*-Ac-glucosamina (GlcNAc) y ácido siálico (ácido *N*-acetil neuraminico, NANA) en el mecanismo de adhesión de la bacteria. Del mismo modo se ha estimado que el lipopolisacárido contribuye significativamente tanto al mecanismo referido como en la patogénesis de la enfermedad de acuerdo a sus propiedades proinflamatorias. En el caso de la hemaglutinina se desconocen los sitios de interacción anatómica a nivel pulmonar, así como su contribución al daño pulmonar. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue identificar su distribución a ese nivel y definir el daño tisular inducido por el componente purificado. Para ello se inocularon intratraquealmente tres corderos de dos meses de edad negativos al aislamiento de la bacteria y a micoplasmas con 3 ml de una suspensión de 10 µg/ ml de la proteína purificada. Como control positivo de daño tisular y con propósito de comparación se inocularon por la misma vía corderos con 3 ml de lipopolisacárido (LPS) purificado a una concentración de 10 µg/ ml; como control negativo se inocularon tres corderos con 3 ml de PBS. Los animales se sacrificaron humanitariamente a las 5 h después y a la necropsia se tomaron muestras de pulmón que se fijaron en formalina al 10% e incluyeron posteriormente en parafina para realizar estudios histopatológicos y de inmunohistoquímica. Para la prueba se emplearon anticuerpos policlonales específicos a la proteína y al LPS producidos

en ratón; como segundo anticuerpo se empleó un anti IgG de ratón conjugado con fluoresceína. Los resultados histopatológicos mostraron que la proteína es capaz de inducir una respuesta inflamatoria con características que corresponden con una neumonía supurativa moderada difusa, en la que se observó congestión difusa de capilares e infiltración de células inflamatorias con predominio de neutrófilos. Mientras que, el daño producido por el LPS se definió como neumonía supurativa con presencia de edema y enfisema pulmonar, en la que fue evidente la congestión de capilares, áreas enfisematosas subpleurales e infiltración mixta de células inflamatorias con predominio de neutrófilos. Por otro lado, el análisis de inmunohistoquímica reveló que la proteína se localiza principalmente a nivel de pared alveolar, superficie endotelial, células epiteliales y macrófagos alveolares. En tanto que, el LPS se distribuyó a nivel alveolar, en el lumen del alveolo, endotelio, neutrófilos y macrófagos alveolares. Con el fin de comparar la distribución de la hemaglutinina en corderos infectados con la bacteria con la que se observó por el depósito intratraqueal; se infectaron experimentalmente corderos con 2 ml de 1×10^9 UFC de la bacteria en fase de crecimiento logarítmico; los corderos se sacrificaron ocho días después para obtener muestras de las lesiones neumónicas y llevar a cabo los estudios de inmunohistoquímica e histopatológico. La distribución anatómica de la hemaglutinina en estos animales fue similar a la que se registró al emplearla como componente purificado, observándose principalmente en la pared bronquioalveolar. De acuerdo a los resultados la proteína posee fuerte capacidad proinflamatoria; considerando su función de adhesina y distribución en el endotelio alveolar es evidente su participación en las etapas tempranas de la enfermedad.

ANTECEDENTES

Estudios a nivel mundial ponen de manifiesto el efecto negativo que tienen las enfermedades respiratorias en la producción pecuaria; pues tan solo en los Estados Unidos de América, las pérdidas se calculan superiores a los 800 millones de dólares anuales.^{1,2} En México, no existen datos al respecto pero las pérdidas pueden ser igualmente importantes, y se deben básicamente a los elevados índices de morbilidad y mortalidad que se presentan en las poblaciones susceptibles, tratamientos contra las enfermedades y retrasos en el crecimiento de los animales aquejados de manera crónica.³ Investigaciones realizadas con el propósito de conocer la incidencia y prevalencia de las neumonías en rumiantes muestran que éstas son mas altas en la etapa de lactancia. En relación a ello, se tienen registros de incidencias de mas del 25 % en becerros; mientras que, en corderos la muerte relacionada con neumonías es de alrededor del 30%.^{4, 5, 6} Las enfermedades respiratorias de los rumiantes se analizan mejor al considerarlas como un síndrome o complejo neumónico, en el cual se encuentran involucrados diferentes factores para su presentación: infecciones previas por virus o micoplasmas, cambios climáticos, situaciones de estrés e infecciones secundarias por bacterias; estas últimas responsables de producir las lesiones graves en tejido pulmonar.^{3, 7}

Mannheimia haemolytica es una de las bacterias que se aísla con mayor frecuencia de los procesos neumónicos y la enfermedad que produce se caracteriza por ser una pleurobronconeumonía fibrinosa aguda.^{1,3} Los microorganismos de *M. haemolytica* pertenecen a la familia *Pasteurellaceae* y se

caracterizan por ser cocobacilos pleomórficos, Gram negativos que muestran coloración bipolar, son anaerobios facultativos, inmóviles, no esporulados y capsulados; debido a sus diferencias en la composición y estructura de sus polisacáridos capsulares se reconocen actualmente doce diferentes serotipos (A1, A2, A5-A9, A12-14, A16 y A17).^{8, 9} Los serotipos A1 y A2 son los que más frecuentemente se recuperan de los procesos neumónicos y tienen una distribución mundial. Sin embargo, el serotipo A1 ha sido sujeto de un mayor análisis y varios de sus factores de virulencia se han identificado y caracterizado por técnicas moleculares que implican la clonación de genes y análisis de secuenciación de DNA.^{9, 10, 11} Los factores hasta ahora identificados son tanto estructurales como de secreción, en el grupo de los estructurales se menciona al lipopolisacárido (LPS), polisacáridos capsulares, proteínas de membrana externa reguladas por hierro y lipoproteínas; mientras que en los de secreción se encuentran enzimas tanto con actividad proteolítica como de remoción de residuos de carbohidratos, así como una toxina con actividad lítica a las diferentes poblaciones de leucocitos de rumiante.^{9, 12, 13, 14} La lisis y degranulación de los neutrófilos y macrófagos por la toxina permite la liberación de enzimas y mediadores químicos de la inflamación que contribuyen con el daño tisular.^{15, 16} El lipopolisacárido como el de otras bacterias Gram negativas posee elevada capacidad para inducir una respuesta inflamatoria aguda, debido a que estimula la expresión y liberación de citocinas y mediadores proinflamatorios, como: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), leucotrienos y ácido araquidónico.^{17, 18} Las citocinas

mencionadas aumentan la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos y células endoteliales, favoreciendo el reclutamiento de los granulocitos. La presencia excesiva de estas células daña el endotelio vascular por la liberación de enzimas lisosomales y radicales de oxígeno durante los procesos de adhesión y activación.^{19, 20} Es así que la leucotoxina al igual que el LPS juegan un papel central en la patogénesis de la enfermedad.^{21, 22} Sin embargo, para lograr un completo entendimiento de los mecanismos que inducen daño al tejido pulmonar en las infecciones por *M. haemolytica*, es necesario estudiar las interacciones dinámicas que se establecen entre el macrófago alveolar, polimorfonucleares y células endoteliales con la bacteria, o con componentes aislados de ella; en particular con aquellos que le facilitan la adherencia y que son responsables de los eventos tempranos en la patogénesis de la enfermedad, pues existen evidencias de que además de reconocer o interactuar con su receptor, las adhesinas desencadenan efectos biológicos a través de la actuación de segundos mensajeros, determinando así el desarrollo de la interacción bacteria-célula, además de afectar los sistemas de defensa del hospedero.^{12, 23, 24, 25, 26} Estudios encaminados a discernir y determinar cuales son las estructuras que facilitan y promueven la unión de *M. haemolytica* a las células epiteliales han sugerido la participación del glucocalix capsular y/o fimbrias en el mecanismo.^{27, 28} Éstas estructuras se demostraron en el serotipo A1 por estudios de microscopia electrónica tanto en condiciones *in vitro* como en el fluido broncoalveolar de animales experimentalmente infectados,²⁹ sin embargo, varios laboratorios han tenido dificultades para observar la presencia de fimbrias en aislamientos recientes, por lo que en ausencia de estructuras fimbriales bien definidas, se cree

que otros componentes de superficie deben fungir como adhesinas, promoviendo la unión de la bacteria.^{30,31}

Así, basados en la propiedad que presentan muchas adhesinas bacterianas de aglutinar eritrocitos de manera específica, permitiendo con ello su aislamiento y el estudio de su especificidad de unión, Jaramillo y col³² consiguieron aislar una proteína de 70 kDa del serotipo A1 de la bacteria, la cual posee actividad aglutinante para eritrocitos de conejo específica a residuos de N-Ac-glucosamina (GlcNAc) y ácido siálico (ácido N-acetil neuraminico, NANA) y sugieren por estudios de adherencia a células epiteliales de tráquea, arteria y tejido pulmonar que la proteína tiene un papel importante en el mecanismo de unión de la bacteria a ese tipo de células.^{33, 34} Con el propósito de identificar los sitios de interacción anatómica a nivel pulmonar de la hemaglutinina y de conocer su distribución en el tejido se realizaron estudios de inmunohistoquímica empleando anticuerpos específicos a esta proteína, en animales experimentalmente infectados y en animales inoculados intratraquealmente con el componente purificado; ello permitió obtener información relacionada primeramente con el tipo de células con las cuales interactúa, así como comprobar su participación en la adhesión de la bacteria.

HIPÓTESIS

La hemaglutinina de *Mannheimia haemolytica* A1 se adhiere a células inflamatorias, al endotelio vascular y es una de las moléculas responsables de los eventos tempranos en la patogénesis de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Localizar el sitio o sitios anatómicos de interacción de la hemaglutinina de 70 kDa de *Mannheimia haemolytica* A1 específica a residuos de ácido siálico en pulmones de corderos inoculados intratraquealmente con dicho componente y determinar su contribución en el daño tisular inducido como componente aislado.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Producir anticuerpos específicos contra la hemaglutinina y lipopolisacárido en un modelo animal.

- 2.- Realizar estudios histopatológicos para determinar el daño pulmonar producido por el depósito intratraqueal de la hemaglutinina en corderos.

- 3.- Evaluar el daño pulmonar inducido por el depósito intratraqueal del lipopolisacárido en corderos.

- 4.- Determinar mediante inmunohistoquímica los sitios anatómicos de interacción de la hemaglutinina purificada a nivel pulmonar.

- 5.- Determinar mediante inmunohistoquímica los sitios anatómicos de interacción del lipopolisacárido a nivel pulmonar.

- 6.- Comparar el daño pulmonar inducido por la hemaglutinina con aquel producido por el lipopolisacárido.

MATERIAL Y METODOS

Bacteria.

Se emplearon tres aislamientos del serotipo A1 de *Mannheimia haemolytica*, recuperados de procesos de pleurobronconeumonía en borregos, los cuales se identificaron como 9a, 12a y 113 para obtener extractos salinos de cada uno de ellos y determinar su actividad hemaglutinante; seleccionándose, posteriormente el aislamiento 9a por presentar las características deseadas para purificar la hemaglutinina específica a residuos de GlcNAc y NANA. El mismo aislamiento se empleó para extraer el lipopolisacárido utilizado en las diferentes etapas experimentales.

Obtención de Extractos Proteínicos Salinos.

Se cultivó la bacteria en placas de agar infusión cerebro corazón (ICC) por 18 h a 37°C, al término se cosechó la masa bacteriana en buffer de fosfatos salino (PBS) 0.2 M pH 7.2 y calentó a 41°C durante 1 h en baño María con agitación moderada (Baño María American Optical); posteriormente se centrifugó a 6000 g por 30 min. (Centrifuga Eppendorf 5810R), separando el sobrenadante al cual se le adicionó sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración final del 60%, permitiendo la precipitación por reposo a 4°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo el precipitado se recuperó por centrifugación a 11000 g por 40 min (Centrifuga Eppendorf 5810R), se resuspendió en PBS y dializó primeramente contra agua destilada y posteriormente empleando PBS durante 48 h a 4°C. El extracto así obtenido representa el extracto proteínico salino (EPS), que fue analizado para

determinar su contenido proteínico, perfil electroforético y actividad hemaglutinante a eritrocitos de conejo, células que presentan en su superficie una elevada concentración de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico).

Determinación de la Actividad Hemaglutinante de los Extractos Salinos.

Para evaluar la actividad referida se obtuvo sangre de conejos Nueva Zelanda por punción cardiaca empleando EDTA como anticoagulante. La sangre se almacenó por 3 a 7 días y posteriormente se separaron los eritrocitos por centrifugación a 2500 g por 10 min, los cuales se lavaron tres veces con PBS y finalmente se suspendieron al 0.5 %. La actividad hemaglutinante de los extractos se determinó en placas de microtitulación con fondo en "U", efectuando diluciones dobles seriadas utilizando 25 μ l de los extractos en PBS y agregando el mismo volumen de la suspensión de eritrocitos. El título hemaglutinante se considera como la inversa de la última dilución en la cual se observa aglutinación. En tanto que, la actividad específica de los diferentes extractos se determinó al dividir el título hemaglutinante por ml entre el contenido proteínico expresado en mg.

Evaluación de la Especificidad de los Extractos y de la Hemaglutinina.

La especificidad de la interacción hemaglutinina-eritrocito se determinó por ensayos de inhibición competitiva empleando azúcares sencillos, como: D-glucosamina, D-galactosamina, N-acetil-neuráminico (NANA, o ác. siálico), N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina. Los ensayos de inhibición se realizaron en placas de microtitulación de fondo en "U" colocando 25 μ l de cada

uno de los diferentes azúcares disueltos en PBS como diluyente a una concentración 0.2 M por columna, mientras que, en la primera fila de pozos se colocaron 25µl de los extractos a probar partiendo de un título hemaglutinante inicial de 1:64, efectuando diluciones dobles seriadas. Posteriormente las placas se incubaron a temperatura ambiente por 1 h, después se adicionaron 25 µl de una suspensión de eritrocitos de conejo al 0.5 % e incubó por 2 h; al término se registraron los títulos aglutinantes. El efecto de los carbohidratos en la actividad aglutinante se determinó comparando con un control del extracto en ausencia de azúcares.

Purificación de la Hemaglutinina o Adhesina.

La proteína hemaglutinante se purificó por cromatografía de afinidad a partir de extractos proteínicos salinos con elevada actividad específica, los cuales se aplicaron a razón de 1.5 mg por cada separación a una columna de agarosa unida a residuos de NAcGlu, equilibrada previamente con buffer de acetatos 0.05 M pH 4.5, a una velocidad de flujo de 15 ml/ h, colectándose fracciones de 2 ml en tubos de ensaye de 10 ml durante el proceso de separación y determinándose su contenido proteínico espectrofotométricamente a 280 nm, cuando la densidad óptica (D. O.) fue menor de 0.01; el material retenido se eluyó adicionando una solución 200 mM de GlcNAc disuelta en el mismo buffer. Las fracciones obtenidas después de la elución se concentraron por pervaporación y dializaron contra agua y PBS para eliminar el exceso de azúcar. La proteína purificada fue sujeta a análisis electroforético en SDS-PAGE y posterior tinción de los geles con AgNO₃.

Obtención y Purificación del Lipopolisacárido.

Para la obtención del lipopolisacárido se empleó el método de extracción de Brogden ³⁵ para lo cual la bacteria se cultivó en agar infusión cerebro corazón (ICC) a 37°C por 18 h, al término del periodo de incubación se cosechó y suspendió en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). La suspensión se sonicó aplicando pulsos de 9 segundos cada uno, con una amplitud del 97%, equivalente a 20 kHz., empleando un sonicador (Vibra cell sonicador, Sonic&Material Co., Danbury, Connecticut, USA). Al extracto sonicado se le adicionó una solución de fenol al 90% y se calentó a 66°C por 20 min con agitación constante, posteriormente se enfrió a 4°C recuperando la fase de fenol, la cual se centrifugó a 13,000 g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de un papel filtro Whatman No 3, y se le adicionaron tres volúmenes de una mezcla de metanol-acetato de sodio al 1% , incubando por 18 h a 4°C, al precipitado obtenido se le realizó un lavado con la misma mezcla centrifugando a 6000 g por 15 min a 4°C. Los pellets obtenidos en los diferentes lavados se resuspendieron en agua y los sobrenadantes obtenidos se sometieron a una diálisis contra agua por 24 h a 4°C realizando varios cambios durante el proceso. Para remover las proteínas residuales, se realizó un tratamiento con proteinasa K (PK); para lo cual el LPS se resuspendió en buffer de digestión de la PK (Tris 10mM, NaCl 145 mM, SDS 0.2%, pH 7.2) y adicionaron 27.5 U de PK por ml de solución. La mezcla se incubó primeramente a 60°C por 1 h, seguido de una segunda incubación a 37°C por 18 h, al cabo de las cuales el LPS se precipitó adicionando tres volúmenes de la mezcla de metanol-acetato de sodio al 1%. La precipitación se continuó toda la

noche a 4°C, recuperando el precipitado por centrifugación; terminado el proceso se almacenó a -70°C hasta su uso.

Análisis Electroforético de los Componentes Bacterianos.

Para comprobar la pureza de los componentes bacterianos aislados, se realizaron análisis electroforéticos en presencia de SDS al 0.1% (SDS-PAGE), empleando un gel concentrador al 5% y un gel separador al 12.5% de acrilamida. Los corrimientos se efectuaron a 30 mA usando un buffer de corrimiento (Tris-glicina, SDS 0.1%, pH 8.3). Los geles se tiñeron con nitrato de plata según el método de Tsai y Frasch,³⁶ empleando además la fijación con azul de alciano y la oxidación por ácido periódico para el lipopolisacárido.^{37, 38} Mientras que, los geles para el análisis de los extractos solubles y la proteína purificada se tiñeron por tinción de plata de acuerdo al método de Merrill.³⁹

Producción de Antisueros Específicos a los Componentes Bacterianos Purificados.

Para tal propósito se emplearon ratones Balb/ c de tres meses de edad, de los cuales se formaron tres grupos con tres ratones cada uno. Un grupo se inoculó con el LPS; otro, con la proteína, y el último permaneció como control, siguiendo un protocolo de siete inoculaciones intramusculares con intervalos de siete días y considerando el empleo del adyuvante incompleto de Freund en proporción 1:1 con el antígeno, **Cuadro 1**. Al final de la serie de inoculaciones los animales se sangraron para evaluar los sueros por ensayos de ELISA, a fin de comprobar su utilidad.

Cuadro 1. PROTOCOLO DE INMUNIZACIONES APLICADA EN RATONES BALB/C PARA LA OBTENCIÓN DE SUEROS ESPECÍFICOS A LA HEMAGLUTININA Y AL LPS DE *M. haemolytica*

Grupo	No de inoculaciones	Vía de inoculación	Antígeno inoculado	Cantidad
1	7	IM	LPS + AIF*	0.1 ml
2	7	IM	H + AIF	0.1 ml
3	---	---	---	---

* Adyuvante incompleto de Freund

Evaluación de los Antisueros al LPS y a la Hemaglutinina por ELISA.

Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Maxisorb-Nunc) con diluciones dobles seriadas de los antígenos diluidos en buffer de carbonatos (pH 9.6), hemaglutinina (1:5 hasta 1:80) y LPS (1:25 hasta 1:400) incubando la placa toda la noche a temperatura ambiente. Finalizado el periodo de incubación las placas se lavaron tres veces con PBST (PBS adicionado con Tween al 0.1 %), seguido se bloquearon los sitios libres de unión con una solución de PBS-gelatina 3% por una hora; a continuación, se lavaron dos veces con PBST y una vez con PBS. Se adicionaron los sueros respectivos diluidos 1:50 y 1:100 en solución bloqueadora en volúmenes de 100 µl, dejando incubar a 37°C por 1 h; al término las placas se

lavarón cinco veces con solución de lavado (PBST). Posteriormente se adicionaron a cada uno de los pozos 100 µl del conjugado, anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (SIGMA) diluido 1:10 000 se incubó por 1 h a 37°C. Al término, se realizaron nuevamente cinco lavados con PBST, y a continuación se agregaron 100 µl la solución de revelado (orto-fenilendiamina en buffer de citratos pH 4.5 más 4 µl de H₂O₂ al 3%). La reacción se detuvo a los 10 min por la adición de 50 µl de una solución de H₂SO₄ 2M; finalmente, las placas se leyeron en un lector de ELISA a 492nm.

Depósito Intratraqueal de la Hemaglutinina y Lipopolisacárido en Corderos.

Para esta fase se emplearon un total de nueve corderos de dos meses de edad negativos al aislamiento de *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* o micoplasmas, los cuales se dividieron en tres grupos de tres corderos cada uno para llevar a cabo el depósito de los componentes purificados por grupo, dejando un grupo como control. Los animales estuvieron en observación una semana antes de los tratamientos y en ayuno un día antes de iniciarlos. Además se midieron sus constantes fisiológicas para determinar cualquier cambio durante la fase experimental. Los animales tratados con la adhesina recibieron 3 ml de una suspensión de la proteína referida a una concentración de 10 µg/ ml vía intratraqueal, que se administró lentamente con ayuda de una jeringa de 5 ml y aguja de 21G x 32 mm luego de localizar y puncionar entre el espacio de un anillo y otro de la traquea. De igual forma, se administró el LPS en los animales del grupo correspondiente, los cuales recibieron 3 ml de éste a una concentración de

10 µg/ ml. Mientras que, el grupo control se inoculó con 3 ml de PBS. El tratamiento de los diferentes grupos se realizó el mismo día y durante la misma hora. A continuación y pasadas las primeras 4 ½ horas se midieron nuevamente sus constantes fisiológicas y finalmente media hora después se sacrificaron humanitariamente. A la necropsia se evaluó el daño pulmonar visible y se tomaron muestras de las áreas afectadas, de las que parte de ellas fueron embebidas en una solución crioprotectora (Tissue-tek –OCT, Miles Inc.) para realizar posteriormente los cortes en criostato y las otras se fijaron en formalina amortiguada al 10 % para inclusión posterior en parafina, de donde se realizaron cortes para estudios histopatológicos y de inmunohistoquímica.

Infección Experimental de Corderos con *Mannheimia haemolytica* A1.

A fin de determinar si existen diferencias en la distribución a nivel pulmonar de la hemaglutinina y lipopolisacárido como componentes aislados con su distribución al formar parte de la bacteria se inocularon intratraquealmente 9 borregos de la misma edad con 2×10^9 UFC/ ml de la bacteria en fase de crecimiento logarítmico suspendida en 2 ml de PBS pH 7.2 con 0.1% de gelatina; como control se inocularon 2 borregos con 2 ml de PBS estéril por la misma vía de inoculación. Durante el proceso infeccioso se midieron las constantes fisiológicas de los animales y posteriormente se sacrificaron humanitariamente a los 10 días de haberse infectado. A la necropsia se tomaron muestras de tejido pulmonar de las áreas visiblemente afectadas, las cuales se destinaron y procesaron similar a

lo descrito en la fase anterior. Además se efectuó el análisis bacteriológico de las mismas a fin de confirmar el proceso infeccioso por la bacteria.

Examen Histopatológico.

Las muestras de pulmón colectadas de ambas fases experimentales fueron procesadas y teñidas por la técnica de hematoxilina-eosina para observación microscópica y evaluación del daño tisular.

Inmunofluorescencia Indirecta en Cortes de Criostato.

Se efectuaron cortes de 5- 6 μm de grosor en criostato (Ames Cryostar) de las muestras de pulmón previamente embebidas en el medio crioprotector y almacenadas a -70°C hasta el momento de su uso; los cortes se depositaron en portaobjetos perfectamente limpios y fijaron con etanol frío al 90 %. Posteriormente se lavaron dos veces con solución amortiguada de Tris-HCl (TBS) 0.02 M, pH 7.4. Enseguida se adicionó el anticuerpo policlonal específico correspondiente al LPS ó a la hemaglutinina producidos en ratón previa estimación de la dilución óptima de trabajo, que para el suero anti LPS fue de 1: 100 y para el de la hemaglutinina 1: 100; permitiendo que se cubriera completamente el corte. El sistema se incubó a 37°C por 1 h en cámara húmeda para evitar que se seicara, a continuación se lavó tres veces con TBS y después se adicionó y cubrió completamente con el segundo anticuerpo marcado 1: 200 (anti-IgG completa de ratón producido en cabra y conjugado con isotiociano de fluoresceína, SIGMA), se incubó nuevamente a 37°C por 1 h en cámara húmeda y por último se lavó tres

veces. El sistema se monto y aclaró depositando unas gotas de solución de glicerina amortiguada y cubriendo con un portaobjetos; finalmente las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Axioskop 40, Zeiss) conectado al software Pinnacle Studio versión 8.0

Inmunofluorescencia Indirecta en Cortes Desparafinados.

Se efectuaron cortes de los tejidos embebidos en parafina de 4 μ m y depositaron en portaobjetos tratados con solución de poli- L-lisina para permitir su fijación a la superficie. Los cortes se desparafinaron sumergiéndolos en una cámara de tinción conteniendo xileno por 30 min, con un segundo cambio por otro periodo igual. Posteriormente se hidrataron con cambios sucesivos de 10 min cada uno en alcohol etílico absoluto, alcohol al 90 %, alcohol al 80 % y alcohol al 70%. Los procedimientos de reconocimiento y marcaje se continuaron tal como se describe para los cortes de criostato, empleando los mismos reactivos.

RESULTADOS.

Análisis Electroforético de los Extractos Salinos.

Los extractos de los diferentes aislamientos mostraron un perfil proteico similar entre si en geles SDS-PAGE teñidos con plata, presentado 14 -16 bandas proteicas principales y varias proteínas estimadas como menores comprendidas entre los 220 y 14 kDa. Las bandas principales tuvieron pesos moleculares aparentes de 220, 205, 105, 100, 96, 71, 70, 55, 42, 35, 30, 31, 29, 28, 26, 14 y 12 kDa. De este grupo de proteínas la banda de los 70 kDa es una de las que se observo con mayor intensidad en las diferentes preparaciones y corresponde con la movilidad electroforética relativa de la hemaglutinina, **Figura 1**.

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE EXTRACTOS SALINOS DE *Mannheimia haemolytica* A1

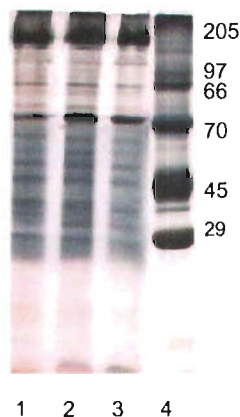


Figura 1, Análisis electroforético en SDS al 11.5 % de extractos salinos de diferentes aislamientos de *M. haemolytica* A1. Carriles 1 → 3 aislamientos 113,12a y 9a (10µg); Carril 4, marcadores de peso molecular. Tinción de plata.

Evaluación de la Actividad Hemaglutinante de los Extractos.

Se evaluó la actividad hemaglutinante de los diferentes extractos a eritrocitos de conejo a fin de seleccionar aquel que presentara la mayor actividad específica para realizar el aislamiento de la proteína. De acuerdo a los resultados el extracto del aislamiento 9a presentó una actividad tres veces más alta que los otros aislamientos estudiados, por lo cual fue seleccionado para llevar a cabo el propósito perseguido, **Cuadro 2**. Por otro lado, el análisis de especificidad indica el reconocimiento de residuos de ácido siálico y de GlcNAc en la interacción, evaluado así por la reducción en los títulos hemaglutinantes observados al inhibir competitivamente la actividad con los azúcares mencionados.

Cuadro 2. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *Mannheimia haemolytica* A1, Y EVALUACIÓN DE SU ESPECIFICIDAD

AISLAMIENTO	UNIDADES HEMAGLUTINANTES (UHA)	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (mg/ ml)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (UHA/ mg)	NANA* (ácido siálico)	GlcNAc*
113	2560	0.17	15058	2**	4**
9a	5120	0.12	42666	4	2
12a	2560	0.18	14222	4	4

* Los azúcares se ensayaron a una concentración de 200 mM

** Los extractos se probaron a partir de 64 UH

Purificación de la Hemaglutinina.

La proteína se purificó por cromatografía de afinidad empleando una columna de agarosa unida a GlcNAc seleccionada de acuerdo a la especificidad de la proteína; de donde se recuperó después de la adición del azúcar homólogo, tal como lo señalan los registros de contenido proteínico efectuados durante el proceso. Las diferentes fracciones colectadas después de la adición de la GlcNAc se dializaron a fin de eliminar el azúcar empleado en la elución, posteriormente se neutralizó el pH para evaluar la actividad hemaglutinante, coincidiendo dicha actividad con los picos más altos de registro proteínico después de la adición del azúcar. **Figura 2.**

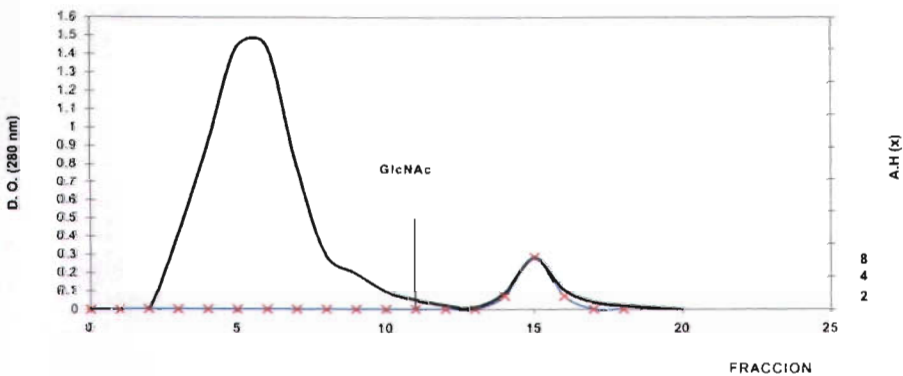


Figura 2. Elución de la hemaglutinina de *M. haemolytica* A1 en columnas de agarosa unida a GlcNAc. Se aplicaron 0.1 mg de un extracto salino con elevada actividad hemaglutinante (5120 UH/ml). Fluyendo a una velocidad de 10 ml/ h, el material retenido se recobró adicionando GlcNAc 0.2 M en buffer de acetatos pH 4.5.

Análisis Electroforético de la Hemaglutinina Purificada.

Las diferentes fracciones colectadas después de la adición de la GlcNAc se mezclaron, dializaron y concentraron para efectuar su análisis electroforético en SDS-PAGE al 11.5 % teñidos con plata, en donde se observó una sola banda proteica con peso molecular aparente de 70 kDa bajo condiciones no reductoras, correspondiendo con las características reportadas para esta proteína. **Figura 3.**

ANALISIS ELECTROFORÉTICO DE LA HEMAGLUTININA DE *Mannheimia haemolytica* A1

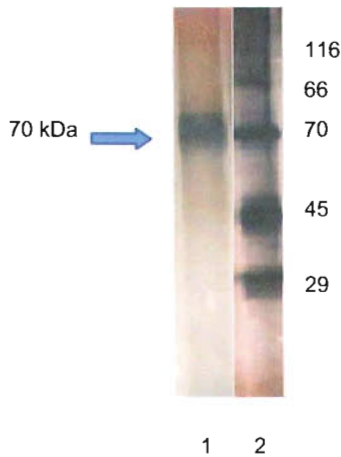


Figura 3. Análisis electroforético en SDS_PAGE al 11.5 % de la hemaglutinina de *Mannheimia haemolytica* A1, aislada por cromatografía de afinidad en columnas de agarosa GlcNAc. Carril 1, proteína purificada. Carril 2. estándares de peso molecular. Tinción de plata.

Análisis Electroforético del Lipopolisacárido Purificado.

El lipopolisacárido extraído de la bacteria fue analizado electroforéticamente en geles SDS-PAGE teñidos con nitrato de plata para comprobar su grado de pureza previa fijación con azul de alciano y oxidación de residuos carbohidrato con ácido periódico. El análisis mostró una sola banda intensamente teñida comprendida dentro del rango de los 14-16 kDa. **Figura 4**

ANALISIS ELECTROFORETICO DEL LIPOPOLISACRIDO DE *Mannheimia haemolytica* A1

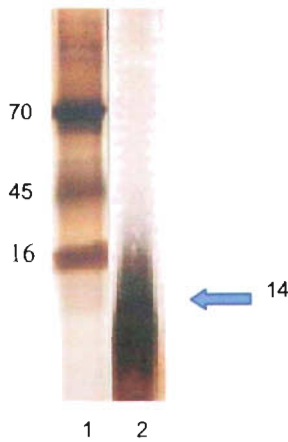


Figura 4. Análisis electroforético en SDS-PAGE al 11.5 % del lipopolisacárido de *Mannheimia haemolytica* A1. Carril 1 estándares de peso molecular. Carril 2.lipopolisacárido. Tinción de plata de acuerdo al método de Tsai and Frash, previa fijación con azul de alciano y oxidación con ácido peryódico.

Resultados de la Prueba de ELISA para Evaluar los Sueros Policlonales Específicos a la Hemaglutinina y Lipopolisacárido.

Los sueros de los diferentes grupos de ratones inmunizados con los componentes purificados se evaluaron mediante ensayos de ELISA empleando el antígeno correspondiente y un conjugado anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa. De acuerdo a los resultados el pool de los sueros de los diferentes grupos inmunizados presentaban un nivel significativo de anticuerpos en comparación con los sueros de ratones sin inmunizar, por lo que fueron empleados en las fases requeridas. **Cuadro 3**

Cuadro 3. EVALUACIÓN DE LOS SUEROS POLICLONALES ESPECÍFICOS A LOS COMPONENTES PURIFICADOS POR ENSAYOS DE ELISA

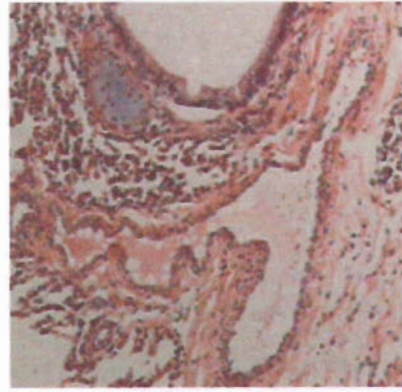
Antisueros	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
LPS	1.615	1.390	1.118	1.010	0.890
Control	0.045	0.030	0.033	0.030	0.030
Hemaglutinina	1.225	1.020	0.880	0.640	0.480
Control	0.046	0.035	0.035	0.033	0.033

Evaluación del Daño Tisular Inducido por el Depósito Intratraqueal de la Hemaglutinina.

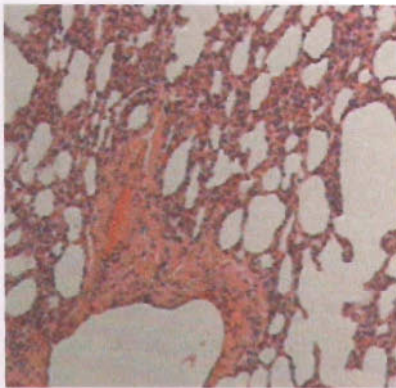
Se observó un ligero incremento en la temperatura corporal de los corderos inoculados intratraquealmente con la proteína purificada a las pocas horas de la inoculación, indicando así su capacidad pirogénica e inflamatoria. A la necropsia se observaron pequeñas áreas de consolidación localizadas principalmente en los lóbulos craneoventrales, mientras que, el análisis histopatológico mostró que el componente por si solo puede inducir una respuesta inflamatoria caracterizada como neumonía supurativa moderada en la que se observa congestión difusa de capilares, infiltración de células inflamatorias con predominio de neutrófilos y en menor número linfocitos, plasmocitos y macrófagos. **Figuras 5a, 5b, 5c y 5d** El análisis bacteriológico, indicó ausencia de bacterias y micoplasmas en las muestras, señalando entonces que el daño histológico observado fue consecuencia de la respuesta inflamatoria inducida exclusivamente por la proteína.



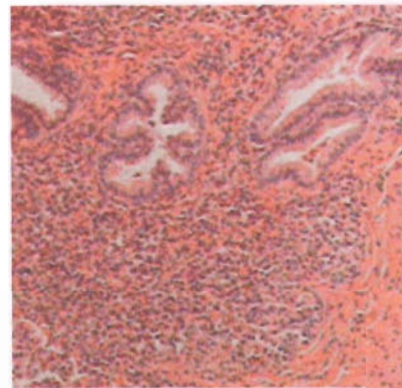
(a)



(b)



(c)



(d)

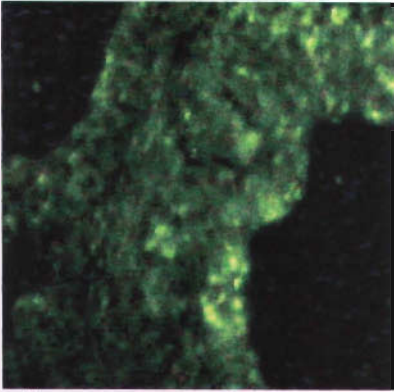
Figuras 5a, 5b, 5c y 5d. Cortes histológicos de pulmón de corderos inoculados intratraquealmente con la hemaglutinina purificada. (a) y (b) infiltración de células inflamatorias con predominio de neutrófilos alrededor del bronquiolo (4x) y (10x); (c) enfisema y congestión discreta de vasos (10x); (d) infiltración severa de neutrófilos y macrófagos en los alvéolos (4x).

Localización y Distribución de la Hemaglutinina en Pulmón.

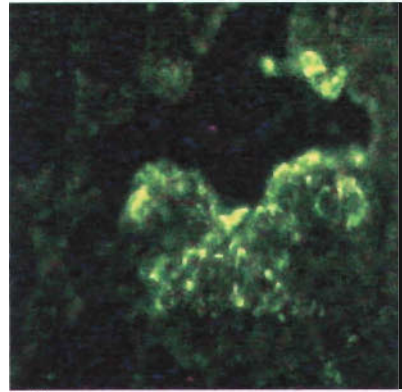
No fue posible determinar una distribución específica del componente en cortes de pulmón realizados en criostato debido básicamente a que el grosor del corte no permitía distinguir claramente las estructuras anatómicas del pulmón. A diferencia de los cortes realizados en parafina donde sí se observó una mejor definición de las estructuras. Los estudios de inmunofluorescencia indirecta mostraron que la hemaglutinina se localizó principalmente en el epitelio de la pared alveolar, en la pared bronquioalveolar y en los septos interlobulillares en el tiempo evaluado. **Figuras 6a, 6b, 6c y 6d.**

Evaluación del Daño Tisular Inducido por el Depósito Intratraqueal del Lipopolisacárido.

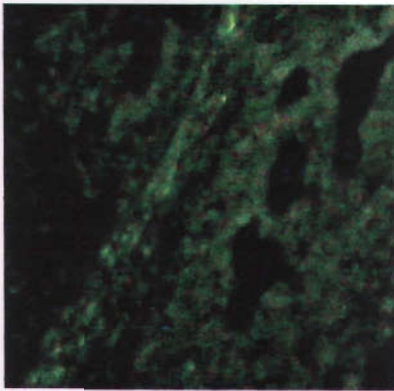
En los corderos inoculados con el lipopolisacárido se observó un ligero incremento tanto en temperatura corporal como en la frecuencia respiratoria a las pocas horas de la inoculación, a diferencia de los corderos inoculados con la proteína en los cuales no hubo variación en este último parámetro evaluado. A la necropsia se observaron áreas enfisematosas en los lóbulos craneoventrales; mientras que el análisis histopatológico de las muestras reveló congestión de capilares, áreas enfisematosas subpleurales, infiltración mixta de células inflamatorias con predominio de neutrófilos y en menor grado linfocitos y macrófagos; en tanto que, los nódulos linfoides peribronquiales y peribronquiolares se observaron notablemente reactivos, indicando con ello el desarrollo de una neumonía supurativa con presencia de edema y enfisema pulmonar. **Figuras 7a, 7b y 7c.**



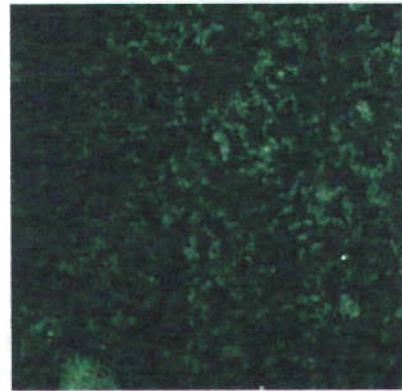
(a)



(b)

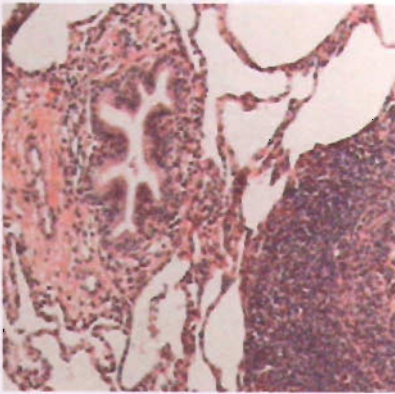


(c)

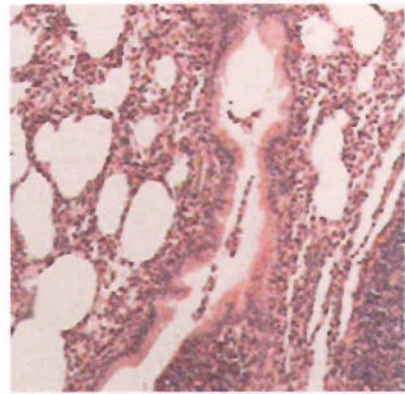


(d)

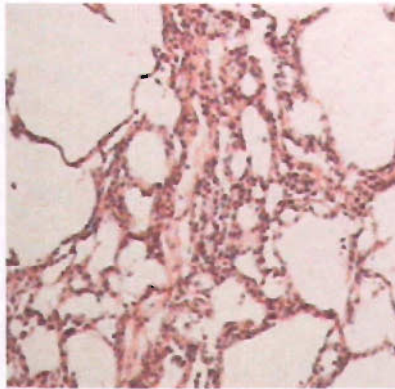
Figuras 6a, 6b, 6c y 6d. Localización de la hemaglutinina de *M. haemolytica* A1 mediante inmunofluorescencia indirecta a nivel pulmonar en corderos inoculados intratraquealmente. (a) Pared bronquiolar mostrando fuerte fluorescencia verde brillante en células epiteliales (40x); (b) fluorescencia positiva a nivel alveolar (40x); (c) septos interlobulillares en los que se observan focos fluorescentes (10x); (d) zona alveolar mostrando la presencia de la proteína (4x).



(a)



(b)



(c)

Figuras 7a, 7b y 7c Cortes histológicos de pulmón de corderos inoculados intratraquealmente con el lipopolisacárido de *M. haemolytica* A1 por HE. (a) Fuerte reactividad linfocitaria en tejido linfoide asociado a bronquiolo (10x); (b) infiltración moderada de células inflamatorias a nivel peribronquial y a la luz del bronquiolo (10x); (c) enfisema y presencia de exudado discreto a nivel alveolar por neutrófilos (10x).

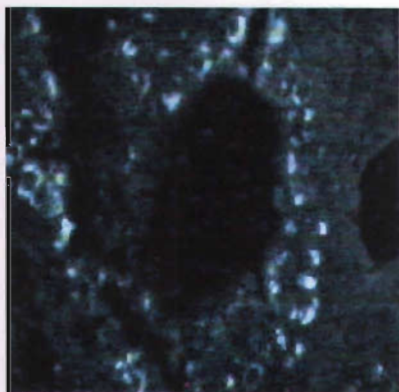
Localización y Distribución del Lipopolisacárido en Pulmón.

El análisis de distribución del LPS por inmunofluorescencia indirecta mostró su localización principalmente en la pared alveolar, en el lumen del alveolo, en la pared bronquioalveolar, neutrófilos y macrófagos alveolares durante el tiempo evaluado, **Figuras 8a, 8b, 8c y 8d.**

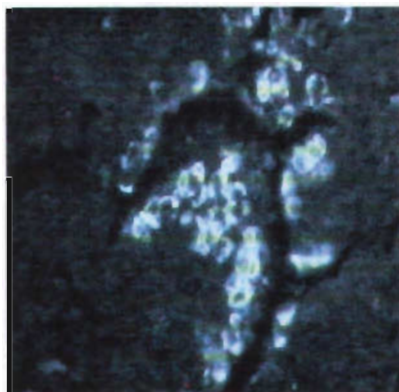
Los cortes histopatológicos de los corderos control no presentaron cambios morfológicos evidentes, **Figuras 9a y 9b,** y en el análisis de inmunohistoquímica empleando los anticuerpos contra la hemaglutinina o LPS no se observaron zonas con fluorescencia brillante en ninguno de los sitios de interacción determinados para los componentes purificados. **Figuras 10a y 10b.**

Evaluación del Daño Pulmonar en Animales Experimentalmente Infectados con *Mannheimia haemolytica* A1.

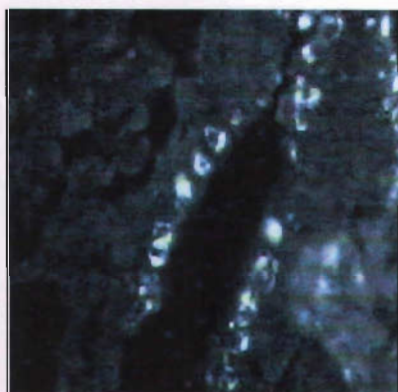
En los corderos infectados se observaron variaciones en temperatura y frecuencia respiratoria en los días posteriores de la inoculación intratraqueal alcanzando un máximo en los días cuarto y quinto comparado con el control, clínicamente los animales se observaron deprimidos e inapetentes con escurrimiento nasal y tos, indicando así el desarrollo de la enfermedad. **Figuras 11a y 11b.**



(a)



(b)

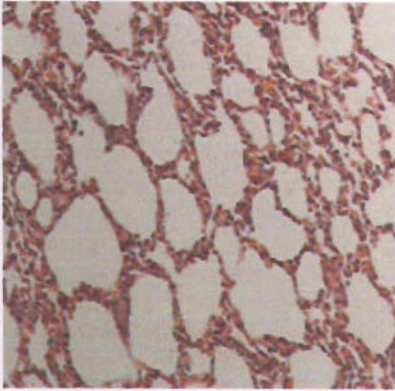


(c)

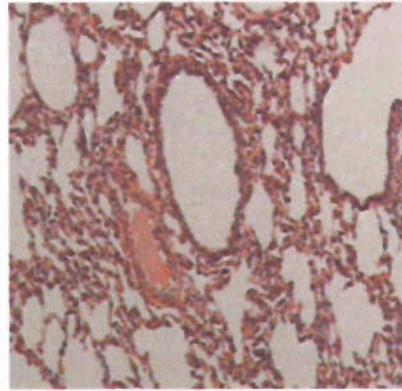


(d)

Figuras 8a, 8b, 8c y 8d. Localización del lipopolisacárido de *M. haemolytica* A1 mediante inmunofluorescencia indirecta a nivel pulmonar en corderos inoculados intratraquealmente con el componente purificado (a) Pared alveolar mostrando fuerte fluorescencia verde brillante en los neumocitos (40x); (b) fluorescencia positiva en el epitelio de los bronquiolos (40x); (c) parte de un bronquiolo presentando fluorescencia dentro de las células (40x); (d) zona bronquiolar mostrando la presencia del lipopolisacárido (4x).

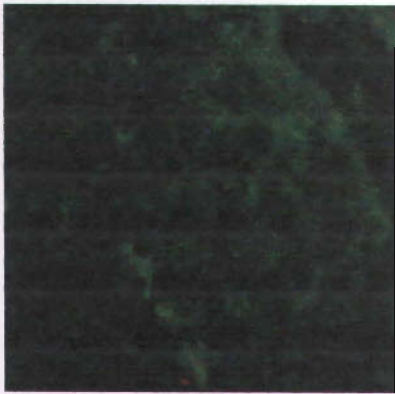


(a)



(b)

Figuras 9a y 9b Cortes histológicos de pulmones de los corderos del grupo control, en los que no se observaron cambios morfológicos. (10x).

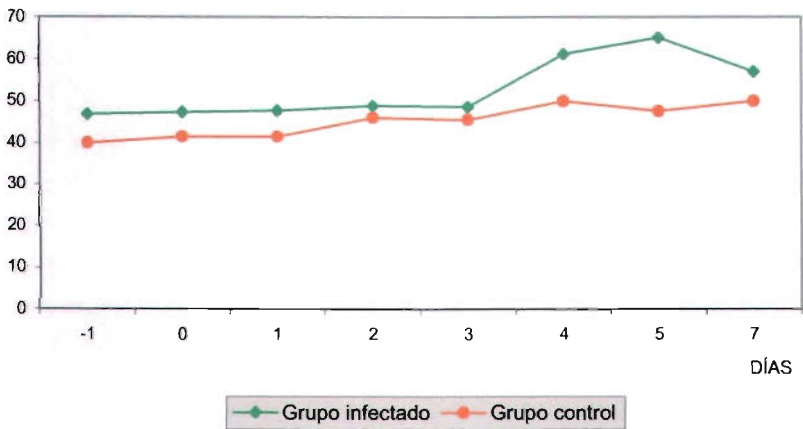
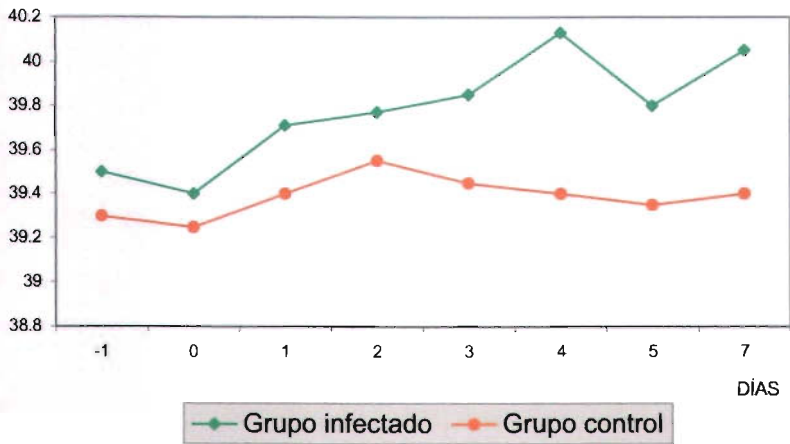


(a)



(b)

Figuras 10a y 10b. Apariencia de los cortes histológicos de los pulmones de los corderos control mediante inmunohistoquímica, mostrando ausencia de fluorescencia brillante (10x).



Figuras 11a y 11b. Variación de temperatura y frecuencia respiratoria en corderos infectados intratraquealmente con una suspensión de 2 ml de 2×10^9 UFC/ ml de *Mannheimia haemolytica* A1.

A la necropsia se observaron moderadas lesiones neumónicas en los lóbulos craneoventrales con adhesiones fibrinosas a nivel de pleura y pericardio en algunos corderos; en la **Figura 12** se presenta de manera esquematizada la extensión y distribución del daño pulmonar observado en los animales infectados.

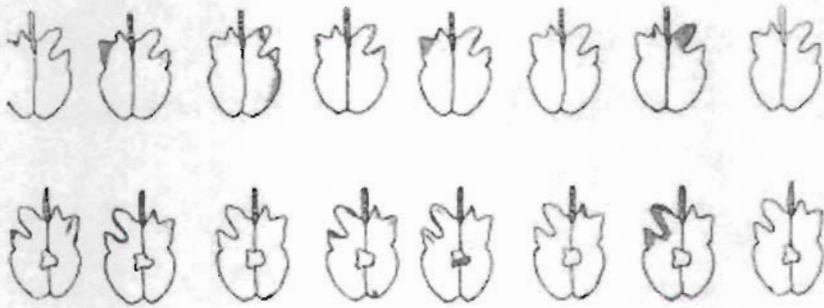
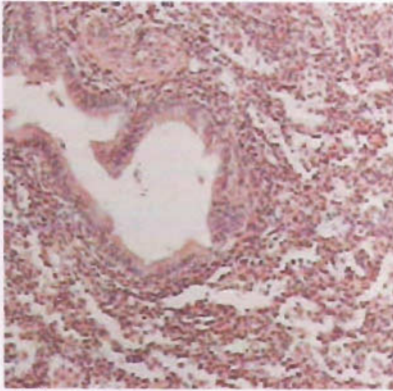


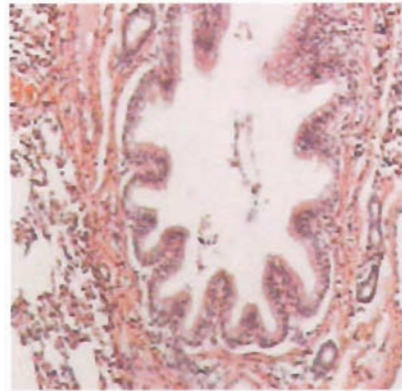
Figura 12. Distribución y extensión de las lesiones neumónicas desarrolladas en corderos infectados experimentalmente con *M. haemolytica* A1.

El estudio histopatológico mostró en algunos casos moderado engrosamiento de la pleura, congestión difusa de capilares e hiperplasia de nódulos linfoides peribronquiales, así como enfisema subpleural. Mientras que en otros casos, se

observo congestión capilar, hiperplasia de nódulos linfoides peribronquiales e infiltración de neutrófilos, linfocitos y macrófagos a nivel bronquiolar y edema alveolar. **Figuras 13a y 13b, 14, 15, 16 y 17.**

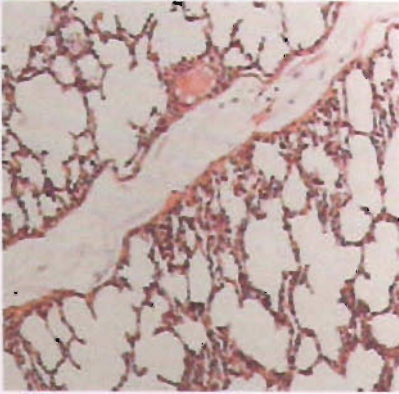


(a)

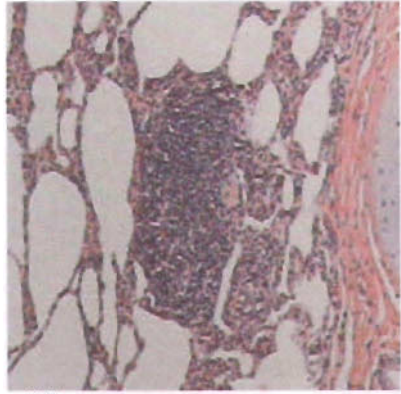


(b)

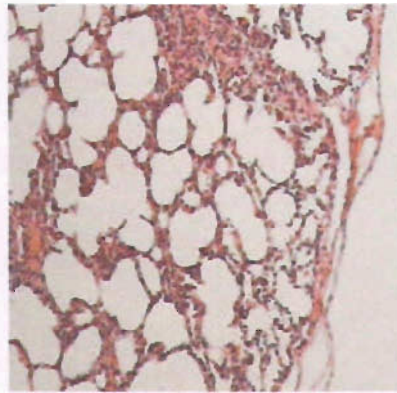
Figuras 13a y 13b, Cortes histológicos por HE de los pulmones de corderos infectados con *M. haemolytica* A1. (a) Infiltrado moderado de células inflamatorias a nivel bronquioalveolar (4x); (b) Lumen bronquial mostrado la presencia de polimorfonucleares y macrófagos (10x).



(14)



(15)

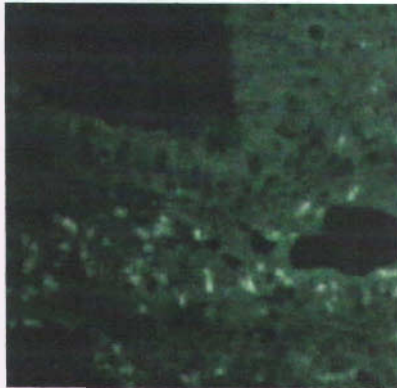


(16)

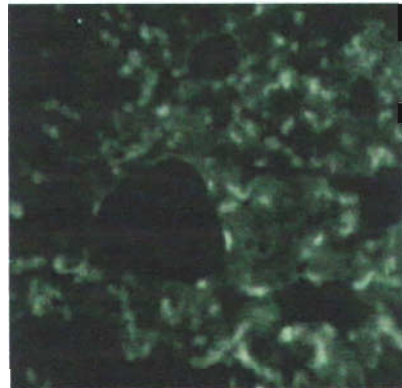
Figuras 14, 15 y 16. Cortes histológicos por HE de pulmones de corderos infectados con *M. haemolytica* A1. (14) Infiltrado discreto de células inflamatorias a nivel alveolar y presencia de enfisema. (4x). (15) Se observa reactividad del BALT e infiltrado de células inflamatorias. (10x). (16) Congestión de capilares e infiltración de polimorfonucleares (10x).

Localización y Distribución de la Hemaglutinina en Pulmones de Corderos Infectados.

La distribución de la hemaglutinina a nivel pulmonar de los corderos experimentalmente infectados con la bacteria mostró ser similar a la que se observó empleando la proteína purificada, localizándose a nivel bronquio alveolar y en septos interlobulillares, **Figura 17a y 17b.**



(a)



(b)

Figuras 17a y 17b. Localización de la hemaglutinina de *M. haemolytica* A1 mediante inmunofluorescencia indirecta a nivel pulmonar en corderos infectados experimentalmente. (a y b) Zona alveolar mostrando la presencia de la proteína (10x).

DISCUSIÓN.

La adhesión y colonización de las bacterias patógenas a la superficie de la mucosa representa la etapa crítica e inicial para el establecimiento de la infección, debido a ello existe un interés generalizado por definir las estructuras involucradas en el mecanismo, así como estudiar y analizar las interacciones dinámicas que resultan de la unión de la bacteria con sus células blanco, debido a que en esta relación se desencadenan diversos efectos biológicos inducidos y regulados por la actuación de mediadores inflamatorios o citocinas que determinan el desarrollo de la asociación bacteria-célula, además de afectar los sistemas de defensa del hospedero.^{24, 25, 26} De la misma forma, el evento de unión induce la expresión de nuevos genes en el microorganismo que son relevantes en la patogénesis de la enfermedad.⁴⁰ En el caso particular de *Mannheimia haemolytica* se ha sugerido la participación de diferentes componentes en el mecanismo de adhesión, uno de los cuales es el lipopolisacárido reconocido por su elevado potencial proinflamatorio debido a su estrecha asociación con el endotelio vascular neutrófilos y macrófagos alveolares;^{19, 27, 29} mientras que, para la proteína ahora en estudio se desconocía su capacidad proinflamatoria y sitios de interacción anatómica a nivel pulmonar. La presente disertación muestra evidencia de estas particularidades, señalando la contribución de la hemaglutinina en los mecanismos de adhesión y patogenia de la bacteria de acuerdo a los resultados obtenidos mediante los estudios de inmunohistoquímica y análisis histopatológicos realizados a muestras de pulmón de corderos inoculados intratraquealmente con el componente purificado. Por inmunohistoquímica empleando anticuerpos policlonales específicos fue posible

observar la presencia de la proteína en los septos interlobulillares, en el endotelio de las paredes alveolares y epitelio bronquioalveolar a las pocas horas de su inoculación en los corderos; contiguo a estos sitios de distribución se apreciaron cambios morfológicos caracterizados por congestión alveolar, congestión capilar e infiltración de células inflamatorias con predominio de neutrófilos, y en menor proporción linfocitos, plasmocitos y macrófagos. Estas observaciones señalan una moderada capacidad proinflamatoria de la hemaglutinina y sugieren su contribución al daño pulmonar inducido por la bacteria. Como parámetro de comparación y seleccionado por su potencial proinflamatorio se inocularon y trataron de igual modo corderos con el lipopolisacárido purificado de la bacteria; en cortes de pulmón de este grupo de animales se determinó que el componente referido se localizó principalmente en el endotelio alveolar, en el lumen del alveolo, en la pared bronquioalveolar, en neutrófilos y macrófagos alveolares, mostrando así su interacción con un mayor número de células de conocida capacidad inflamatoria; una distribución similar a nivel pulmonar del lipopolisacárido de *M. haemolytica* fue determinada por Whiteley y col.,¹⁹ mediante estudios de inmunohistoquímica empleando anticuerpos monoclonales específicos en pulmones de bovinos experimentalmente infectados con la bacteria. Por otro lado, las lesiones pulmonares observadas en los corderos inoculados con LPS en este experimento correlaciona con lo señalado por Brogden y col.⁴¹ quienes también evaluaron el daño pulmonar inducido por el componente referido al depositarlo directamente en el órgano por broncoscopia, observando reacciones fibrinopurulentas, edema, hiperemia, hemorragia y necrosis focal del epitelio alveolar. Los mecanismos mediante los cuales el LPS genera los diferentes

efectos patológicos se han identificado y estudiado extensamente tanto a nivel molecular como celular; por ejemplo en células endoteliales induce diferentes mediadores proinflamatorios tales como: el factor de activación plaquetaria (PAF), metabolitos del ácido araquidónico, prostaglandinas, el factor tisular (TF), un inhibidor de activación del plasminógeno y la IL-1.^{10,12, 13} Por otro lado, se ha determinado que existe una relación directa de los efectos del LPS sobre los neumocitos tipo II con la producción o alteraciones en la composición del surfactante pulmonar, de igual modo puede incrementar la tensión superficial a nivel alveolar generando la formación de edema, hemorragia y atelectasia alveolar.^{42, 43} Mientras que, la activación de los macrófagos alveolares por el LPS ya sea de manera directa o mediada por los componentes liberados por efecto de la activación del complemento induce la expresión de moléculas de adhesión tanto en neutrófilos como en células endoteliales y promueve la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6, IL-8 y TNF, citocinas que generan un estado procoagulante.^{9, 17, 18} Así, los mecanismos mencionados ejemplifican la plétora de alteraciones que se generan a través de la interacción de este componente bacteriano con las diferentes poblaciones celulares, incluyendo aquellos que son generados tras la activación del complemento, los cuales de manera conjunta conducen a un daño severo del tejido pulmonar.¹² Brogden y col, han estudiado la contribución de otros componentes aislados de la bacteria además del LPS en la patogénesis de la enfermedad, en particular de los polisacáridos capsulares y de un complejo proteínico asociado al LPS (LPS-AP), constituido por algunas proteínas de membrana externa y el LPS; mostrando que los polisacáridos capsulares poseen una menor capacidad proinflamatoria e inducen lesiones

menos severas, en las que se observan edema a nivel alveolar y en los septos interlobulares, con infiltración moderada de neutrófilos en conductos aéreos y alvéolos.^{44,45} Mientras que, las lesiones inducidas por el LPS-AP se caracterizaron por la infiltración de linfocitos, neutrófilos y macrófagos alrededor de bronquiolos y pequeños vasos sanguíneos con presencia de líquido serofibrinoso en los espacios alveolares.⁴⁴ Así, el estudio individual de diferentes productos asociados a la pared celular de la bacteria ha ayudado a definir y evaluar su contribución en los procesos inflamatorios involucrados en la patogénesis de la neumonía producida por *M. haemolytica*, destacando la participación de aquellos que facilitan su unión y establecimiento a nivel pulmonar como el LPS, los polisacáridos capsulares y ahora la hemaglutinina, de la cual se muestra su moderado potencial inflamatorio en relación a aquel observado por el LPS; en tanto su función de adhesina ha sido demostrada con anterioridad en estudios de unión a células epiteliales de traquea, cortes de arteria y tejido pulmonar de ovino.^{33,34} Principalmente, esta investigación muestra su interacción con el endotelio alveolar en específico con los neumocitos tipo I, indicando su participación en las fases tempranas de colonización de la bacteria a ese nivel. Estudios de microscopía electrónica realizados por otros investigadores muestran la asociación de la bacteria a la superficie de este tipo de células y sugieren que los polisacáridos capsulares podrían ser en parte responsables de la interacción, la cual no obstante puede estar mediada por una reacción tipo lectina que involucra la proteína A del surfactante pulmonar con residuos *N*-acetil manosamina.¹² Brogden y col., sugieren que si esta interacción ocurre *in vivo* no solo se favorece la unión de la bacteria a la cubierta del alveolo, sino que el microorganismo puede

recubrirse con el surfactante y evadir los mecanismos de defensa pulmonar, para comprobar esta interacción incubaron el surfactante con azúcares sencillos y encontraron que éste precipita con GlcNAc y en menor proporción con GalNAc pero no con N-acetil manosamina, constituyente principal de la cápsula de *M. haemolytica* A1 como ellos habían considerado.^{12, 35} De acuerdo a sus resultados y tomando el hecho de que el surfactante reacciona fuertemente con GlcNAc insinuamos que la hemaglutinina podría ser uno de los componentes responsables de tal interacción debido a su estrecha asociación con las células alveolares mostrada y a su naturaleza glicoproteínica, hipótesis que deberá no obstante comprobarse.

Derivado de los resultados obtenidos en este estudio se sugiere que la hemaglutinina específica a residuos de GlcNAc y ácido siálico podría tener un papel importante en las etapas tempranas de la enfermedad debido a su función de adhesina, distribución y asociación con células fagocíticas y endotelio favoreciendo la activación y liberación de mediadores químicos del proceso inflamatorio.

CONCLUSIONES.

1.- La hemaglutinina de *Mannheimia haemolytica* A1 posee moderada capacidad proinflamatoria que conlleva a daño histológico a nivel pulmonar.

2.- La hemaglutinina interactúa o se localiza principalmente en el endotelio del alveolo y en el epitelio de los bronquiólos y septos interlobulillares.

3.- El lipopolisacárido de la bacteria se distribuyó a nivel bronquioalveolar, a nivel alveolar, y dentro de macrófagos y neutrófilos.

4.- El lipopolisacárido indujo mayores alteraciones a nivel pulmonar en animales inoculados intratraquealmente.

5.- En corderos infectados con la bacteria la distribución de la hemaglutinina fue similar a la observada por el depósito del componente purificado.

LITERATURA CITADA.

1. Yates WDG. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med.* 1982; 46: 225.
2. Martin WB. Respiratory infections of sheep. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1996; 19 (3):171-9.
3. Trigo TJF. El Complejo Respiratorio Infeccioso de los Bovinos y Ovinos. *Ciencia Veterinaria.* 1987; 4:1-36
4. Aguilar TC, Tórtora PJ. Mortalidad de corderos en dos sistemas de producción ovina en Milpa Alta, D.F. *Memorias del II Congreso Nacional de Producción Ovina.* 1989; p. 146.
5. Murguía OL. Mortalidad de Corderos de razas tropicales del nacimiento al destete. *Memorias del 1er Congreso Nacional de Producción Ovina.* México. 1988; p. 173.
6. Trigo TFJ, Romero J. La relevancia de las neumonías como causa de mortalidad en corderos. *Vet. Méx.* 1986; 17, 116-119.
7. Trigo TJF. Diagnóstico, patogénesis y control de las neumonías en ovinos (línea de investigación): *Memoria de la Reunión de Investigación Pecuaria en México,* 1984; p.
8. Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Taxonomic relationships of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. Nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 67-86
9. Highlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Frontiers in Bioscience* 2001; 6: 1128-1150.
10. Gonzalez CT, Maheswaran SK. The role of induces virulence factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurelosis: review and hypotheses. *Br Vet J.* 1993; 149:183-190.
11. Lo RYC. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet Microbiol* 2001; 83: 23-35

12. Ackermann MR, Brogden KA. Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Microbes Infection*. 2000; 2: 1079-1088.
13. Sang YH, Maheswaran SK, Lin G, Townsend EL, Ames TR. Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1995; 63 (2): 381-388
14. Breider MA, Kumar S, Corstvet RE. Bovine Pulmonary Endothelial Cell Damage Mediated by *Pasteurella haemolytica* Pathogenic Factors. *Infect Immun*. 1990; 58:1671-1677.
15. Brown JF, Leite F, Czuprynski CJ. Binding of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin to bovine leukocytes. *Infect Immun* 1997; 6: 3719-3724.
16. Adusu ET, Conlon DP, Shewen EP, Black DW. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces histamine release from bovine pulmonary mast cells. *Can J Vet Res* 1994; 58:1-5.
17. Ramírez-Romero R, Brogden KA. Patogénesis del daño pulmonar provocado por *Pasteurella haemolytica*. *Rev Latinoamer Microbiol* 1995; 35: 353-365.
18. Yoo HS, Maheswaran SK, Lin G, Townsend EL, Ames TR. Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1995; 63(2):381-388.
19. Whiteley LO, Maheswaran SK, Weiss DJ, Ames TR. Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* A1 derived endotoxin, leukotoxin and capsular polysaccharide in experimental bovine *Pasteurella* pneumonia. *Vet Pathol*. 1990; 27: 150-161
20. Paulsen DB, Mosier DA, Clinkenbeard KD, Confer AW. Direct effects of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide on bovine pulmonary endothelial cells *in vitro*. *Am J Vet Res*. 1989; 50: 1633-1637
21. Li J, Clinkenbeard KD. Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun*. 1999; 67: 2920-2927
22. Czuprynski CJ, Welch R A. Biological effects of RTX toxins: the possible role of lipopolysaccharide. *Trends Microbiol*. 1995 ; 3: 480-483.
23. Hoepelman AIM, Tuomanen EI. Consequences of microbial attachment Directing host cell functions with adhesin. *Infect Immun*. 1992; 60: 1729-1732

24. Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microb Reviews* 1996; 60 (2): 316-341.
25. Boyle EC, Finlay BB. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 633-639.
26. Niemann HH, Schubert WD, Heinz DW. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microb Infect.* 2003;
27. Morck DW, Raybould TJG, Acres DD, Babiuk LA, Nelligan J, Costerton JW. Electron microscopic description of glycocalyx and fimbrial on the surface of *Pasteurella haemolytica* A1. *Can J Vet Res.* 1987; 51: 83-88.
28. Potter AA, Ready K, Gilchrist J. Purification of fimbriae from *Pasteurella haemolytica* A-1. *Microb Pathog* 1988; 4: 311-316
29. Morck DW, Olson ME, Acres SD, Daoust P, Costerton, JW. Presence of bacterial glycocalyx and fimbrial on *Pasteurella haemolytica* in feedlot cattle with pneumonic pasteurellosis. *Can J Vet Res.* 1989; 53: 167-171
30. Jacques M, Paradais S. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. *FEMS Microb Rev.* 1998 ; 22 : 45-59.
31. Jaramillo ML, Zenteno E, Trigo FJ. Mecanismos de Patogenicidad y Adherencia de *Pasteurella haemolytica*. *Rev Latinoamer Microbiol.* 1999; 41:105-116.
32. Jaramillo ML, Díaz F, Hernández P, Debray H, Trigo TJF, Mendoza G, Zenteno G. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiology.* 2000; 10 (1): 31-37.
33. Jaramillo ML. Aislamiento de una hemaglutinina de *Pasteurella haemolytica* A1 y el estudio de su especificidad por carbohidratos. Tesis de Maestría, Fac. de Medicina-UNAM. 1998. Ciudad Universitaria, México DF.
34. Serrano R. L. E., 2003. Participación de Componentes aislados de *Mannheimia haemolytica* A1 en el mecanismo de adhesión a cortes de tejido y arteria pulmonar de ovino, y a una línea celular Vero. Tesis de Maestría. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México D. F.
35. Brogden KA, Adlam C, Lehmkuhl HD, Cutlip RC. Effect of *Pasteurella haemolytica* A1 capsular polysaccharide on sheep lung in vivo and on pulmonary surfactant in vitro. *Am J Vet Res.* 1989; 50: 555-559.

36. Tsai C, Frasch EC. A sensitive Silver Stain for Detecting Lipopolysaccharides in Polyacrilamide Gels. *Anal Biochem.* 1982; 119: 115-119.
37. Apicella AM, Griffiss JM. Isolation and Characterization of Lipopolysaccharides, Lipooligosaccharides, and Lipid A. *Methods. Enzymol.* 1994; 235: 242-252.
38. Corzo J, Pérez GR, León BM, Gutiérrez NA. Alcian Blue fixation allows silver staining of the isolated polysaccharide component of bacterial lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 1991;12: 439-441.
39. Merrill CR, Switzer RC, Van Keuren ML. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76:4335-4339.
40. Soto EG, Scott JH. Bacterial adhesins: Common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol.* 1999; 181(4): 1059-1071.
41. Brogden KA, Cutlip RC, Lehmkuhl HD. Response of sheep after localized deposition of lipopolysaccharide in the lung. *Exp Lung Res.* 1984;7(2):123-132.
42. Brogden KA, Cutlip RC, Lehmkuhl HD. Complexing of bacterial lipopolysaccharide with lung surfactant. *Infect Immun.* 1986; 52(3):644-649.
43. Brogden KA, Rimler RB, Cutlip RC, Lehmkuhl HD. Incubation of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide with sheep lung surfactant. *Am J Vet Res.* 1986; 47(4):727-9.
44. Brogden KA, Ackermann MR, Debey BM. *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-associated protein induces pulmonary inflammation after bronchoscopic deposition in calves and sheep. *Infect Immun.* 1995;63(9):3595-3599.
45. Brogden KA, Debey BM, Cutlip RC. Lesions induced in vivo by cell-associated products of *Pasteurella haemolytica* and their role in the pathogenesis of bovine respiratory disease. *Memorias Monterrey Nuevo León.*