



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“Evaluación estructural del tejido pulmonar, linfocitos tisulares
y macrófagos alveolares de ovino, en presencia de
Microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* A2”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

CHRISTIAN ÁVALOS GÓMEZ

ASESORA:

DRA. GONZÁLEZ RUÍZ CYNTHIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	
I.1. Antecedentes generales.....	3
I.2. Factores condicionantes e interacciones en la Mannheimiosis Neumónica.....	5
I.3. Mecanismos de defensa pulmonar Específicos e Inespecíficos.....	7
I.4. Etiología (<i>Mannheimia haemolytica</i>).....	9
I.5. Factores de virulencia de <i>Mannheimia haemolytica</i>	11
I.5.1. Cápsula.....	11
I.5.2. Fimbrias.....	12
I.5.3. Proteínas de Membrana Externa (PME).....	13
I.5.4. Proteínas de Membrana Externa Reguladas por Hierro.....	14
I.5.5. Lipopolisacárido (LPS).....	15
I.5.6. Leucotoxina (LKT).	16
I.5.7. Microvesículas (MVs).....	18
I.5.8. La virulencia de las MVs.....	20
I.6. Signología clínica.....	21
I.7. Patogenia de la Mannheimiosis neumónica.....	22
I.7.1. La adherencia a las células del tracto respiratorio.....	23
I.8. Respuesta inmune hacia la bacteria.....	25
II. JUSTIFICACIÓN.....	27
III. HIPÓTESIS.....	27
IV. OBJETIVOS	
a) Objetivo General.....	27
b) Objetivos Particulares.....	28
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
V.1. Obtención de Microvesículas (MVs).....	29
V.2. Purificación de proteínas en solución, en presencia de detergentes y lípidos.....	31

V.3. SDS-PAGE y Condiciones de corrimiento electroforético.....	31
V.4. Evaluación <i>in vitro</i>	32
V.4.1. Obtención de Macrófagos alveolares mediante LBA.....	34
V.4.2. Obtención de células a partir de tejido pulmonar.....	35
V.4.3. Obtención de linfocitos a partir de nódulo linfoide.....	35
V.4.4. Condiciones de cultivo celular.....	35
V.4.5. Microscopía Electrónica.....	38
V.4.6. Características evaluadas en las diferentes estructuras.....	39
V.4.7. Características tomadas en cuenta para las diferentes evaluaciones.....	39
VI. RESULTADOS.....	41
VI.2. Microscopia electrónica.....	43
VI.2.1. Descripción de los grupos celulares.....	43
VI.2.2. Evaluación de los diferentes tipos celulares según el grado de lesión.....	57
VI.3. Análisis estadístico.....	58
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	64
VIII. CONCLUSIONES.....	71
IX. ANEXOS.....	72
IX.1. Soluciones.....	72
X. BIBLIOGRAFÍA.....	77

RESUMEN

A partir de un cultivo sobrestimulado de *Mannheimia haemolytica* A2, con un antibiótico de amplio espectro y del sobrenadante filtrado y ultracentrifugado se obtuvieron microvesículas (MVs). Se evidenció la presencia de éstas, mediante SDS-PAGE. Los cultivos celulares, se montaron con macrófagos alveolares obtenidos mediante lavado bronquio alveolar (LBA) de pulmón de ovino. Se tomó una porción del parénquima pulmonar y de linfonodos, los cuales se sometieron a digestión enzimática, para obtener células de parénquima pulmonar y linfocitos respectivamente. Los 3 tipos de células se mantuvieron en cultivo celular y se les adicionó diferentes concentraciones de MVs [400, 800 y 1200 µg], incubándose a 37°C / 72 h con 5% de CO₂. Posteriormente, las muestras se procesaron para Microscopía Electrónica. Se observó que los linfocitos, demostraron ser el tipo celular más resistente al manejo en general, por mantener ultraestructuralmente sus características celulares sin aparente alteración, como fueron estructuras nucleares, membrana citoplasmática y/o organelos. Los otros dos grupos de células fueron más susceptibles, dadas las características observadas en las diferentes estructuras celulares evaluadas, entre las cuales se encuentran, la presencia de cuerpos apoptóticos, ausencia de organelos en el citoplasma y gran cantidad de vesículas presentes en el mismo. El análisis estadístico realizado demostró, que las células del grupo control positivo tratadas con Concanavalin A y los grupos tratados con una concentración de 1200 µg de MVs, de los 3 diferentes tipos celulares, presentaron respuestas similares, encontrándose continuidad en las membranas nucleares y citoplasmáticas, cromatina laxa a nivel nuclear, así como ausencia de vesículas en el espacio intracelular. El determinar la mínima concentración de MVs, permitió establecer los cambios que dan paso a las lesiones que ocasionan éstas estructuras bacterianas o bien a la activación celular en presencia de las diferentes concentraciones de antígeno, en células mantenidas *in vitro*.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Antecedentes generales de la enfermedad

La neumonía en los ovinos jóvenes es una de las principales enfermedades que se presenta durante la crianza. Las pérdidas económicas que ésta origina, no son solo por muertes de los animales, sino también por la disminución en las ganancias de peso, menor eficiencia en la conversión alimenticia y costos elevados de tratamiento en animales con neumonía crónica ¹.

Por otro lado, las pérdidas económicas por neumonías para la industria de la carne bovina, son estimadas sobre un billón de dólares por año en Norte América ². El porcentaje de morbilidad en rumiantes en producción por neumonías, es considerado uno de los más severos en la economía de esta industria. A éste, se le atribuye alrededor del 75% de las enfermedades clínicamente visibles. En cuanto al nivel de mortalidad ocasionado por neumonías, los porcentajes varían entre el 45% y 55%. Esto ocasiona que los costos de producción y los gastos médicos generen alrededor del 8% del costo total de producción, sin tomar en cuenta las pérdidas debidas a las prácticas zootécnicas que suman un porcentaje similar a este ³.

Por lo anterior, la disminución de las neumonías en bovinos y ovinos en particular, se ha convertido en una absoluta prioridad, además, se sabe que el costo en gastos médicos tiene el principal impacto en los beneficios de la granja, independientemente del precio de la carne en el mercado ³.

La neumonía que afecta a los bovinos se conoce como Fiebre de Embarque, esta última denominación, hace referencia a uno de los factores que desencadenan el inicio de esta enfermedad. Cuando los animales son transportados, se les somete a un severo estrés, el cual favorece un aumento de cortisol y por ende una baja actividad del sistema inmune, que aunado a la lesión que ejerce un agente viral permite la colonización de las bacterias en vías respiratorias bajas, que al poco tiempo provoca la forma clínica de la enfermedad. La enfermedad en ovinos anteriormente denominada Pasteurelisis Neumónica Ovina llamada así por su

etiología, también se ha visto modificada, debido a que la bacteria ha sido reclasificada a un nuevo género bacteriano, anteriormente denominada *Pasteurella haemolytica* y ahora reclasificada en *Mannheimia haemolytica*. El nombre con el que se denomina a la enfermedad igualmente se vió modificado y actualmente se le designa como Mannheimiosis Neumónica, aunque al referirnos al Complejo Neumónico Respiratorio ya sea bovino u ovino, esta enfermedad invariablemente queda incluida³.

En México, los estudios de rastro han revelado cifras de morbilidad por neumonías en becerros Holstein, hasta del 8.7%. En explotaciones de bovinos lecheros se ha encontrado en animales de desecho, que la presencia de neumonías ha fluctuado del 13 al 21%. En México, los serotipos de *M. haemolytica* involucrados en neumonías de bovinos son A1 (68%) y A2 (18%); los serotipos de *Pasteurella multocida* únicamente incluyen al serotipo A. En otro estudio de un total de 26 aislamientos de *P. multocida*, se encontró 77% del serotipo D¹³.

Los microorganismos asociados al Complejo Respiratorio son virus, bacterias y micoplasmas, sin embargo el sinergismo que conlleva a la interacción virus-bacteria es considerado uno de los factores claves para desencadenar la colonización por *M. haemolytica* en el pulmón. Entre los principales agentes virales involucrados se encuentran el virus de Parainfluenza tipo 3 (VPI3), virus Sincitial Respiratorio (VRS) y Adenovirus⁴.

El virus de PI3 es de suma importancia ya que participa tanto en forma primaria así como sinérgicamente con bacterias en el Complejo Respiratorio de los Ovinos, además puede estar involucrado tanto en procesos agudos, así como crónicos ocasionando pérdidas económicas importantes⁵. Estudios serológicos en México indican que la infección por el virus de PI3 se encuentra ampliamente difundida en los bovinos y ovinos del país, con 16% al 86% de animales seropositivos. En México, se ha identificado la presencia de estos virus en diferentes partes de la República y exámenes serológicos demuestran una prevalencia del 16% al 70% en ganado de carne⁴.

I.2. Factores desencadenantes e interacciones en la Mannheimiosis Neumónica Ovina

Existen factores condicionantes en el desarrollo de la Mannheimiosis Neumónica, tal es el caso de las infecciones de naturaleza viral, como el virus de Parainfluenza 3 (PI-3), virus Respiratorio Sincitial (RSV) y Adenovirus, u otras bacterias como *Pasteurella multocida*, etc. Los agentes vírales como el virus de la PI-3 y el RSV, además de causar un efecto citopático directo en el aparato respiratorio, reducen la remoción bacteriana y la capacidad fagocítica del macrófago alveolar con la cual se le facilita la colonización pulmonar en animales infectados por *M. haemolytica*¹.

Todas las enfermedades causadas por virus se consideran infecciones primarias, y pueden ir desde cuadros neumónicos muy severos hasta enfermedades respiratorias subclínicas¹³. En su gran mayoría las lesiones macroscópicas consisten en áreas multifocales de consolidación craneoventral, aunadas a zonas multifocales de enfisema intersticial y presencia de exudado mucoso o mucopurulento en zonas afectadas. Al examen histológico se observa una neumonía broncointersticial, ya que la lesión se inicia con bronquitis y bronquiolitis y luego se difunde al espacio intersticial con un infiltrado de células mononucleares⁷.

Estudios *in vivo* en donde se han cuantificado las defensas antibacterianas pulmonares durante una neumonía viral han demostrado que durante la fase aguda de la infección, los mecanismos bactericidas del pulmón se encuentran esencialmente normales. Aproximadamente una semana después de la infección viral, la actividad pulmonar antibacteriana es súbitamente bloqueada, hasta el punto en que las bacterias pueden proliferar en el pulmón. Después en el día 9 de postinfección viral, las defensas antibacterianas del pulmón vuelven a recuperarse paulatinamente, para quedar reestablecidas en el día 12. Correlacionando los eventos previamente descritos con la patogénesis de la infección viral, resulta obvio que el periodo de máxima supresión antibacteriana del pulmón no corresponde con el periodo de máxima proliferación del virus en el árbol respiratorio, sino con el periodo de decremento de títulos virales y del desarrollo de lesiones pulmonares. Estas

observaciones hicieron concluir inicialmente a algunos investigadores que las lesiones pulmonares en si facilitaban la invasión bacteriana, basado en destrucción del epitelio ciliado bronquial que impedía la acción del aparato mucociliar; y además, que el exudado alveolar constituía un medio nutritivo excelente para la proliferación bacteriana. Sin embargo, los estudios recientes han indicado que estas alteraciones son sólo factores contribuyentes a la proliferación bacteriana ⁶.

Algunos investigadores han propuesto otro tipo de evidencias de la participación viral en la lesión. Estas evidencias corresponden a la formación de cuerpos de inclusión que se presentan en el citoplasma de las células de epitelio bronquio alveolar, así como en macrófagos, lo que resulta compatible con infecciones por Adenovirus. Además, en estos casos también se aprecia a nivel alveolar la coalescencia de células del epitelio o de macrófagos, a las que se les denomina sincicios, muy posiblemente asociados a RSV o virus de la Parainfluenza ⁶.

Se sabe que el macrófago alveolar juega un papel importante en la defensa del pulmón contra infecciones bacterianas, por lo que en algunos estudios se determinó que la proliferación bacteriana en el pulmón, se debe a anomalías en la ingestión e inactivación intracelular de bacterias por parte del macrófago alveolar. Macrófagos alveolares infectados con virus muestran disminución de receptores en su membrana celular para la porción Fc de IgG, IgM así como para la porción C₃b del complemento, con lo cual no pueden utilizar eficientemente a estas opsoninas. Sin embargo, se sabe ahora que esta disfunción temporal del macrófago alveolar, no se debe exclusivamente a la infección viral. Estudios con anticuerpos fluorescentes indicaron que el antígeno viral se localiza en el árbol respiratorio en las etapas agudas de la infección viral, para después situarse en los macrófagos alveolares. Esto se debe a que los macrófagos alveolares fagocitan restos de células epiteliales contaminadas con virus con lo cual pueden infectarse y ser destruidos por el sistema inmune ⁷.

El medio ambiente también ejerce un poderoso efecto sobre las defensas del aparato respiratorio. Los dos elementos más importantes en este contexto son el frío y la humedad. Las temperaturas bajas causan estasis ciliar y esto a su vez genera baja eliminación del moco traqueobronquial que se acumula e inclusive cae al alveolo,

facilitando la penetración viral. El frío es importante también en la sobrevivencia de los microorganismos suspendidos en aerosoles, sobrevivencia que disminuye rápidamente al aumentar la temperatura ¹³.

El efecto de la humedad ha sido cuidadosamente descrito por diferentes autores. Los aerosoles están constituidos por una o varias bacterias o virus, recubiertas por una película de agua. Cuando la humedad relativa es muy elevada (superior al 90%) las gotas suspendidas se unen entre sí por puentes de hidrógeno, formando partículas muy grandes que sedimentan con rapidez y no son inhaladas. De ser así, su gran tamaño las hace impactarse en las primeras porciones del árbol traqueobronquial, de donde son rápidamente eliminadas por el aparato mucociliar. Por otro lado, las humedades relativas bajas menores al 50% tampoco favorecen la infección respiratoria por que las gotas no pueden permanecer suspendidas al haber poca humedad ambiental ¹³.

I.3. Mecanismos de defensa pulmonar específicos e inespecíficos

El sistema respiratorio está constantemente bombardeado por partículas (microorganismos, polvo, fibras), gases tóxicos (SO₂, NO₂, H₂S, ozono) y vapores (amoníaco, formaldehído, acetona, gasolina). En condiciones normales, los gases inhalados son destoxificados, las toxinas son neutralizadas; las partículas son atrapadas y eliminadas, y los microorganismos son atrapados, destruidos y eliminados. Cada región anatómica-histológica del aparato respiratorio tiene su propio mecanismo de defensa ⁸.

- Sistema de Conducción (Conchas nasales, tráquea, bronquios).

El epitelio mucociliar es el principal mecanismo de defensa del sistema de conducción. Este epitelio está formada por epitelio pseudo-estratificado ciliar y las secreciones de las células caliciformes y glándulas de la submucosa (moco). Las partículas suspendidas en el aire de un tamaño de 3-10 µm son atrapadas en el moco del epitelio mucociliar (deposición) y de aquí son rápidamente eliminadas por el movimiento del moco hacia la faringe en donde son finalmente deglutidas ⁸.

El moco que recubre la carpeta mucociliar juega también un papel preponderante y muchas veces ignorado. Algunos gases (hidrosolubles) se disuelven en el moco reduciéndose de esta manera la concentración tóxica del gas que llega a las partes profundas del pulmón. La IgA es la inmunoglobulina más abundante en el moco y una de sus funciones principales es inhibir la adherencia de patógenos a las células ciliadas⁸.

Sin embargo, la eficiencia del aparato mucociliar puede ser afectada adversamente por la deshidratación sistémica, exposición prolongada al aire frío, exposición a gases irritantes y por infección por ciertos virus respiratorios. La deshidratación sistémica resulta en la secreción de un moco excesivamente grueso que no fluye normalmente ⁸.

➤ Sistema de transición (bronquiolos)

Sólo aquellas partículas de tamaño menor a las dos micras (<2) logran penetrar hasta los bronquiolos terminales y alvéolos. En estas regiones profundas del pulmón, las partículas pequeñas se depositan en la membrana respiratoria mediante sedimentación o movimiento browniano. Los mecanismos de defensa de los bronquiolos son una combinación de los encontrados en los sistemas de conducción y de intercambio, mas secreciones locales principalmente producidas por las llamadas células claras ⁸.

El último bronquiolo que no se subdivide es el bronquiolo terminal que carece de cartílago y de glándulas mucosas, aunque el epitelio que posee continua siendo cilíndrico. La estructura del bronquiolo terminal es similar a la del bronquiolo, solo que su pared es más delgada, esta revestida en su interior por epitelio columnar bajo o cúbico, con células ciliadas y no ciliadas, Los bronquiolos terminales poseen también células clara no ciliadas, que presenta gránulos secretores de función poco conocida⁸.

➤ Sistema de intercambio (alvéolos)

El principal mecanismo de defensa en el alveolo lo constituyen los macrófagos alveolares, ya que estos carecen de cilios y moco. Estas células altamente fagocíticas se originan en la médula ósea de donde pasa a la sangre como monocitos sanguíneos para después llegar al pulmón en donde pasan un tiempo de “maduración” en el intersticio pulmonar. Durante el tránsito en el intersticio pulmonar adquieren la capacidad de fagocitar en un medio aeróbico ⁸.

La IgG / IgM son las inmunoglobulinas preponderantes en los líquidos alveolares y estos anticuerpos juegan un papel importante en la opsonización y fagocitosis por macrófagos alveolares. Las secreciones alveolares, particularmente el surfactante producido por los neumocitos tipo II, también contienen sustancias que favorecen la fagocitosis y actúan como antioxidantes para prevenir el daño celular causado por el estrés oxidativo ⁸.

Estudios experimentales con aerosoles han mostrado que en condiciones normales es posible someter animales a dosis masivas de bacterias patógenas (3×10^6 bacterias / gr de pulmón) sin que estas logren colonizar el pulmón y causar enfermedad. Sin embargo, cuando los mecanismos de eliminación mucociliar son deprimidos y los macrófagos alveolares no logran eliminar las bacterias inhaladas, estas colonizan fácilmente el pulmón causando infecciones respiratorias ⁸.

I.4. Etiología: *Mannheimia haemolytica*

La etiología de esta neumonía es multifactorial e incluye una combinación de estrés e infección viral, que resulta en una enfermedad aguda final donde *Mannheimia haemolytica* es el principal agente involucrado. *M. haemolytica* es un cocobacilo hemolítico débil, Gram negativo que pertenece a la familia *Pasteurellaceae* y al género *Mannheimia* ³.

M. haemolytica crece en agar sangre en forma de pequeñas colonias con un engrosamiento central. En agar sangre de caballo, oveja o conejo forma colonias

circulares rodeadas por una zona estrecha de β -hemolisis, mientras que en las placas hechas con sangre de corderos muy jóvenes (1 mes de edad) da una doble zona de β -hemolisis ⁹.

M. haemolytica ha sido el tema de una extensa reclasificación en el pasado, en 1885, Theodore Kilt ¹⁰ la llamo "*Bacterium multocidum*", y fue retitulada como *Pasteurella haemolytica* en 1932, al mismo tiempo fue clasificada en 2 biotipos A y T, basados en su capacidad de fermentar azúcares, arabinosa y trealosa respectivamente. Hasta ese momento existían identificados 13 serotipos A y 4 serotipos T, estos últimos fueron reclasificados como *Pasteurella threalosi* en 1990. En 1999, Angen y col. ¹¹, basados en una extensa evaluación cuantitativa de fenotipo y características geonómicas, proponen un nuevo género en la familia *Pasteurellaceae* para las trealosas negativas llamado *Mannheimia*, así como también 5 nuevas especies para éste. Las nuevas especies son, *M. haemolytica*, *M. glucosida*, *M. ruminalis*, *M. granulomatis* y *M. varigena* ³⁻⁹.

Nueve años después, estudios basados en hibridaciones de DNA condujeron a retitular los serotipos anteriores A (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) como *Mannheimia haemolytica*, mientras que el serotipo restante A11 se convirtió en *M. glucosida*. El nombre de *Mannheimia* se otorgó en tributo a Walter Mannheim, biólogo alemán que investigó y mejoró la comprensión de la taxonomía de la familia *Pasteurellaceae* ³.

Su crecimiento es mesófilo y anaerobio facultativo o microaerófilico. Todas las cepas de *Mannheimia* fermentan manitol, glucosa, maltosa, sorbitol y sucrosa sin producción de gas. Indol, urea, azul de Metilo (MB) y Voges-Proskauer (VP) son reacciones negativas. Oxidasa y catalasa son siempre positivas ⁹.

M. haemolytica coloniza la cavidad nasal y las criptas de tonsilas de ganado bovino y ovino sano. Sin embargo, después de estrés y una infección viral, *M. haemolytica* se incrementa rápidamente en número y desciende a los pulmones, desencadenando rápidamente un cuadro de neumonía aguda ^{12,13}.

En ovinos el serotipo más importante a nivel de mucosa respiratoria es el A2; los estudios realizados en México han demostrado mayor incidencia de los serotipos A1, A2, A5 y A9 en corderos y los serotipos A1 y A2 en bovinos ¹.

I.5. Factores de virulencia

Los miembros del género de *Mannheimia* producen diversos factores que están asociados a la virulencia de este grupo de microorganismos. La especie más virulenta de este género es *M. haemolytica*. Esta bacteria es patógena para ganado bovino, ovino y cabras, pero apatógena para animales de laboratorio por la vía usual de infección (vía aerosol, contacto directo) ⁹.

Entre los importantes antígenos producidos por *M. haemolytica* se encuentra la cápsula, lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana externa, proteínas reguladas por hierro, adhesinas, leucotoxina (LKT), hialuronidasa y neuraminidasa ⁹.

1.5.1. CÁPSULA

La estructura de la cápsula de *M. haemolytica* fue identificada como una estructura básica de polisacárido producido durante la fase logarítmica de crecimiento y se puede visualizar en organismos crecidos *in vitro* e *in vivo*. La cápsula afecta negativa y severamente la interacción entre este microorganismo y los macrófagos alveolares. Además, está reportado que el material capsular puede interactuar con la sustancia surfactante pulmonar, de tal modo que facilita la adherencia local de los organismos en las diferentes células huésped ¹⁴.

La diferenciación de serotipos se basó en la composición del azúcar de la cápsula, así como de la composición del LPS. Este mismo material parece ser un medio de enlace para células epiteliales y otras superficies así como para resistir la actividad de fagocitosis y del complemento ¹¹.

Se han realizado estudios para determinar si el material capsular de *M. haemolytica* incrementa la virulencia bacteriana, de igual manera que la cápsula de

muchas otras bacterias Gram negativas. Mientras que a la cápsula no se le considera responsable de las lesiones típicas de la Mannheimiosis neumónica, se menciona que si pudiera participar en la patogenia mediante diferentes mecanismos. La cápsula puede estar involucrada en la adherencia de la bacteria a la mucosa del pulmón, generar atracción de neutrófilos a los sitios de infección, inhibición de la fagocitosis por neutrófilos y resistencia a la lisis mediada por complemento ¹⁶.

La cápsula del serotipo A2 está compuesta de ácido siálico, comúnmente encontrado en las membranas del hospedero, este componente no es inmunogénico. Por otra parte el polisacárido capsular puede ser fuertemente antigénico si contiene proteínas de superficie que constituye los antígenos inmunogénicos potenciales ¹⁵.

I.5.2. FIMBRIAS

Las fimbrias son estructuras filamentosas presentes sobre la superficie de las bacterias Gram negativas que pueden estar involucrados en la iniciación de la infección. Las fimbrias se unen a receptores específicos sobre las células epiteliales de las superficies mucosas tal como la cavidad nasal, permitiendo que las bacterias se adhieran y no sean barridas por las secreciones respiratorias. No se ha observado respuesta de anticuerpos hacia las fimbrias por lo que el papel de estas en la patogénesis no es totalmente definida ¹⁶.

Estas estructuras fueron descritas en *M. haemolytica* serotipo A1 aislada de vacas infectadas experimentalmente y además en bacterias crecidas en el laboratorio. La expresión fenotípica de las fimbrias es variable y dependiente de las condiciones que existan en el medio en el que la bacteria está creciendo ¹⁷.

Las fimbrias pudieran ser requeridas para iniciar la adherencia de *M. haemolytica* a las células del tracto respiratorio superior, además este efecto puede verse reforzado por el glucocálix de la bacteria que permite la formación de microcolonias de bacteria en las células ¹⁴.

Morck y col., en 1987, realizaron estudios sobre fimbrias y glucocálix, donde además de demostrar que las fimbrias están presentes en la superficie de *M. haemolytica*, los resultados en las diferentes técnicas sugirieron que podrían existir por lo menos dos tipos de fimbrias en *M. haemolytica*. La primera es larga (aproximadamente 12nm de diámetro) y rígida, una estructura no flexible la cuál puede verse en un tipo de preparaciones de sombreado. Y la segunda es una pequeña (aproximadamente 5 nm de diámetro), más flexible que puede verse en preparaciones de células teñidas negativamente. Lo cual pudiera coincidir con la expresión de fimbrias en otras especies bacterianas, ya que se sabe que este proceso es altamente dependiente de las condiciones ambientales de laboratorio ¹⁸.

I.5.3. PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME)

La evaluación de las Proteínas de Membrana Externa (PME) mediante SDS-PAGE, ha mostrado diferencias entre las cepas aisladas de *M. haemolytica* en especies hospederas similares o diferentes. Ésta metodología ha sido utilizada para distinguir los patrones proteicos entre los diferentes aislamientos. Los componentes de la fracción de PME difieren su expresión según las condiciones de crecimiento de los microorganismos, es decir *in vivo* o *in vitro*. Sin embargo, los antígenos expresados al crecimiento *in vivo* son reconocidos por suero de animales vacunados con *M. haemolytica* muerta. Esto sugirió que estos antígenos son precursores o comparten determinantes antigénicos con otras proteínas que expresa *M. haemolytica* cuando está viva ²¹.

De la misma manera, se ha reportado que la composición de la proteína de superficie de *M. haemolytica* se modifica por la disponibilidad de hierro y por lo tanto de las proteínas que regulan su expresión en presencia de este mineral pudiéndose expresar *in vivo*. El aislamiento e identificación de las PME de *M. haemolytica* A1 permitió la identificación de sus proteínas más importantes ¹⁶.

Las PME son candidatos potenciales como inmunógenos, especialmente aquellas que se exponen en la superficie ¹⁹. Sobrenadantes de cultivo de fase de

crecimiento logarítmico de *M. haemolytica* A1, han sido utilizados como vacuna, mostrando resultados satisfactorios, específicamente contra este serotipo ²⁰.

Las proteínas de membrana externa de las bacterias Gram negativas tienen un importante papel en el proceso de infección. Algunas PME tienen función de porinas que permiten el transporte de sustancias a través de la membrana externa, mientras que la fosfolipasa A, una PME de las bacterias Gram negativas, es esencial en ciertos patógenos para la invasión a las células del hospedador. Otras PME pueden actuar como receptores de alta afinidad para obtener hierro del hospedador ²¹.

Se sabe además que las PME aisladas de *M. haemolytica* inducen alteraciones en la actividad biológica de los leucocitos polimorfonucleares, por ejemplo, bajos niveles de PME pueden estimular quimiotaxis y adherencia de neutrófilos favoreciendo la acumulación de estos en el sitio inicial de lesión, además de que pueden inducir alteraciones en la superficie y por consiguiente en la fagocitosis de estos ²². Estas proteínas han recibido mucho interés por parte de diversos grupos de investigación; sin embargo, de momento no se conoce mucho de éstas y de sus mecanismos de patogenicidad, aunque inmunológicamente tienen un importante significado en la inmunidad protectora contra la Mannheimiosis neumónica causada por el serotipo A2 ²³.

I.5.4. PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA REGULADAS POR HIERRO (PMERH)

Las proteínas de membrana externa reguladas por hierro (PMERH), son productos de la bacteria en crecimiento en un ambiente restringido de hierro, como lo es el pulmón. Las PMERH, están involucradas en el proceso de adquirir hierro del ambiente, el cual es un nutriente esencial para la sobrevivencia de todas las células de mamíferos y las bacterias, pero la disponibilidad de hierro en el tejido de un animal infectado está restringida por proteínas fijadoras de hierro, propias del hospedador.

Las PMERH de las bacterias, trabajan específicamente compitiendo con éstas proteínas del hospedador, para quitarles el hierro. Sin proteínas reguladas por hierro,

la célula bacteriana no podría adquirir suficiente hierro para multiplicarse, crecer y serían fácilmente removidas por el hospedador. Es importante mencionar, que el hierro es requerido en el medio para la producción de leucotoxina por parte de la bacteria. Actualmente, se han descubierto 3 PMERH en *M. haemolytica* creciendo en condiciones restringidas de hierro ^{13, 20}.

La mayoría de las bacterias Gram negativas tienen aproximadamente 20 PME consideradas como principales, pero solo de 4 a 6 de éstas, constituyen la mayor parte del contenido proteico de la membrana externa ²⁴.

En estudios recientes se demostró el papel patológico que juegan las PMERH producidas durante el crecimiento *in vivo* de *M. haemolytica*, ya que estas proteínas pueden ser importantes inmunógenos que generan protección en el desarrollo de la Mannheimiosis neumónica. Los anticuerpos contra estas PMERH se encuentran presentes en suero de becerros recuperados después de una infección por *M. haemolytica* ¹³.

I.5.5. LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

Otro de los factores de virulencia de *M. haemolytica* es el lipopolisacárido (LPS), el cual ha sido mejor estudiado en el serotipo A1 y comprende del 10 al 25% del peso seco de la bacteria. El LPS es considerado como uno de los componentes de la bacteria con alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria. Las lesiones que induce, constan de grandes áreas de hiperemia y edema, que abarcan zonas de deposición de células inflamatorias invadiendo en ocasiones lóbulos adyacentes, además, también pueden observarse focos de hemorragia y adherencias fibrinosas. La apoptosis o la muerte de las células endoteliales de los vasos sanguíneos del pulmón no es el único componente responsable de la pérdida de fluidos vasculares asociados con la neumonía por *M. haemolytica*, la migración y la activación de neutrófilos en el pulmón pueden también contribuir significativamente a la pérdida vascular ^{1, 19}.

También, se ha observado que el LPS es directamente citotóxico para células endoteliales de bovino. McClenahan y col. en 2007, demostraron que el LPS induce apoptosis de células endoteliales de bovino. Ellos examinaron el efecto de dos de los principales factores de virulencia de *M. haemolytica*, el LPS y la LKT, en células epiteliales y endoteliales de pulmón. Como control de la citotoxicidad del LPS, previamente demostraron su efecto en células epiteliales y células de endotelio capilar de diferentes fuentes que eran sensibles a LPS, experimentando apoptosis a las 12 horas de exposición ²⁵. Los cambios morfológicos y la apoptosis ocurrieron en células de endotelio microvascular de pulmón bovino (BPMEC) tratadas con LPS y no así en células de epitelio pulmonar bovino. La apoptosis no fue la única reacción que ocurrió en las BPMEC expuestas al LPS; también se incrementaron los niveles de mRNA para varias citocinas inflamatorias. En particular se observó un aumento substancial en la Interleucina 8 (IL-8), la cual se sabe que es un potente quimiotáctico de neutrófilos bovinos ²⁵.

La endotoxina libre de *M. haemolytica* y otras bacterias Gram negativas, interactúa con numerosos tipos de células y sistemas mediadores iniciando una amplia variedad de respuestas patofisiológicas. La interacción del LPS con los macrófagos puede determinar muchos de los efectos patológicos asociados. Los macrófagos interactúan con LPS y son activados para producir citocinas proinflamatorias, sustancias procoagulantes, radicales de oxígeno y proteasas involucradas en la respuesta inflamatoria. Tanto la LKT (exotoxina) como el LPS (endotoxina) inducen la expresión de genes para citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 y TNF- α en los macrófagos alveolares pulmonares del bovino lo que contribuye a una mayor respuesta inflamatoria, fiebre y en consecuencia daño tisular²⁵.

I.5.6. LEUCOTOXINA (LKT)

El producto celular bacteriano de mayor importancia en la patogénesis de la enfermedad causada por *M. haemolytica* es la leucotoxina (LKT), la cual tiene la habilidad de lisis leucocitos de rumiantes. *Mannheimia spp* requiere una alta

concentración de hierro para la producción de esta citotoxina que libera durante su fase de crecimiento logarítmico ⁹.

Esta leucotoxina es una proteína de 104-KDa que pertenece a la familia de las toxinas RTX, llamadas así debido a la característica en común de repeticiones de secuencias ricas en glicina dentro de la proteína. La LKT produce numerosos efectos biológicos. Las bajas concentraciones de LKT, producen la activación de leucocitos y las altas concentraciones la muerte de los mismos por apoptosis, disminuyendo la regulación del Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (CMH II), disminuyendo las proteínas en la superficie del macrófagos, afectando así su habilidad para presentar antígenos ⁹.

La mitad de la cadena N-terminal de la toxina consiste en cuatro dominios hidrofóbicos, que se cree están implicados en la formación de poros en la membrana de las células blanco. Así mismo, un tercio de la cadena C-terminal de la toxina contiene un número de repeticiones de nano péptidos ricos en glicina, este dominio está involucrado en el acarreamiento de Ca⁺ que es necesario para la actividad biológica de la toxina. Un dominio compuesto por aproximadamente 50 a 60 aminoácidos del extremo C-terminal también está involucrado en el transporte de la toxina a través de la envoltura bacteriana (cápsula) ²⁶.

La LKT es citotóxica para todos los subconjuntos de linfocitos, pero los leucocitos polimorfonucleares (PMN) son los más susceptibles a los efectos de la LKT. La LKT induce lisis y degranulación de los PMN y ha sido implicado como la causa primaria de inflamación aguda en el pulmón característica de la neumonía causada por *M. haemolytica*. Por lo que la identificación y caracterización del receptor para LKT en leucocitos de borrego es un importante prerrequisito para entender la patogénesis de esta enfermedad ²⁶.

La activación de macrófagos da lugar a la liberación de citocinas proinflamatorias, como la interleucina-1 (IL-1) así como también estimula a leucocitos polimorfonucleares a la liberación de H₂O₂, el cual alternadamente es convertido por células endoteliales alveolares en la presencia de Fe²⁺ a radicales de hidroxilo. Los

radicales hidroxilo matan a las células, resultando esto, en la acumulación de líquido en el espacio intersticial (edema) y fibrina ⁹.

La LKT parece jugar un papel importante en la patogénesis de la infección por *M. haemolytica*. Ya que se presume que esta función de destruir leucocitos, principalmente macrófagos alveolares, en el sitio de infección, reduce la capacidad del hospedador de establecer una respuesta inmune eficiente, induciendo eventos de inflamación que desencadenan un severo daño al pulmón. En adición a esto, las enzimas liberadas por leucocitos lisados en el tejido pulmonar, contribuyen a la severa necrosis observada en las infecciones por *M. haemolytica*. La LKT por sí misma, no es tóxica para el epitelio bronquial; la severidad de las lesiones en los septos alveolares depende en su mayor parte de la acumulación de leucocitos ³.

Ha sido postulado que la especificidad de la LKT hacia la célula blanco delimita el hospedero específico de la infección de *M. haemolytica*, recientemente se demostró que las β -integrinas son los receptores para esta LKT. Análisis de restricción de endonucleasa, junto con estudios de neutralización de la actividad de anticuerpos monoclonales, han demostrado la variación de los determinantes de la LKT entre serotipos de *M. haemolytica*, pero el significado de la diversidad de alelos para la patogénesis de la Mannheimiosis neumónica y para la especificidad del hospedero aun no se conoce con exactitud ²⁷.

I.5.7. MICROVESÍCULAS (MVs)

Todas las bacterias Gram negativas producen Microvesículas (MVs), uno de los mecanismos más frecuentemente mencionados por los autores, para su explicación, es la sobre estimulación del crecimiento de la bacteria, que da como consecuencia el aumento en el tamaño de su membrana externa, el pliegue de la misma y su posterior formación, para que finalmente estas sean emitidas al ambiente circundante ²⁹.

Por otra parte, se ha propuesto que las MVs son emitidas por la bacteria mediante un mecanismo que implica la liberación de su pared celular. De cualquier

modo, las MVs conservan normalmente los constituyentes de la membrana externa, de la pared celular que les dió origen, incluyendo proteínas, LPS, ácido murámico, cápsula y fimbrias. Muchos de estos componentes juegan un papel crucial en la patogenicidad de las bacterias ²⁸.

Como ya se mencionó anteriormente, no se sabe con exactitud cuál es el mecanismo exacto que realiza la bacteria para liberar estas estructuras al medio, aunque algunas de las posibles hipótesis al respecto, sugieren que, de los diferentes sistemas de secreción y transporte proteico que tienen las bacterias Gram negativas, la liberación de MVs podría sugerirse como un sexto mecanismo de secreción ²⁹.

La secreción de factores de virulencia por patógenos Gram negativos es compleja, debido al hecho de que la bacteria está envuelta por dos capas lipídicas, la membrana externa e interna y el periplasma entre ambas. Los patógenos Gram negativos tienen varias estrategias que permiten la activación de los factores de virulencia para que posteriormente, ganen acceso al medio extracelular. 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 Tipo II y V son procesos mediante los cuales las proteínas pasan en dos pasos ²⁹. 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 ³⁰.

Por otro lado en las vías de secreción Tipo I, III y IV el material es transferido directamente hacia el medio extracelular o hacia el interior de otra célula ³⁰. Se cree que la proteína puede cruzar las membranas internas y externas en un solo paso posiblemente a través de los sitios de adhesión de la membrana. Aunque este modelo tiene ciertas características que lo pudieran hacer confiable, la existencia de tales sitios de contacto ha sido cuestionada ²⁹. Todos estos sistemas de secreción secretan proteínas individuales o complejos de tamaño pequeño. Se especula, que el mecanismo de secreción de las MVs es de Tipo VI, es decir, este permite a la bacteria

secretar proteínas de alto peso molecular y grupos de proteínas y lípidos hacia el medio extracelular ²⁹.

La pared celular de las bacterias Gram negativas tiene una dinámica característica de la que carecen las bacterias Gram positivas. A diferencia de estas últimas, las MVs de las Gram negativas están en constante liberación en la superficie de la célula durante su crecimiento bacteriano. Durante el proceso de formación y liberación, las MVs encierran algo de periplasma subyacente, de modo que son partículas realmente pequeñas formadas a partir de la pared celular de éstas bacterias. Las MVs presentan los antígenos como normalmente se encuentran en una bacteria, pero en una escala mucho más pequeña. Estas estructuras esféricas de 50 a 250 nm de diámetro están directamente relacionadas con la superficie de todas las bacterias Gram negativas. Reportes de estas vesículas datan de 30 años atrás y reportes adicionales han sido publicados recientemente. La importancia general de su liberación ha sido recientemente reconocida y han sido nombradas vesículas de membrana o MVs ³⁰.

Estudios realizados en *Pseudomonas aeruginosa* comprobaron que la Gentamicina induce la producción de MVs en esta bacteria. La actividad bactericida de éste antibiótico en la bacteria media parcialmente la alteración de la superficie celular, la membrana externa se une y se pliega deliberadamente en sitios específicos formando las MVs, éstas son expulsadas de la célula y se mantienen libres en el entorno externo ³¹.

I.5.8. LA VIRULENCIA DE LAS MVs

La patogenicidad de distintas bacterias Gram negativas en parte se basa en su habilidad para secretar numerosos factores de virulencia en el medio que las rodea (por ejemplo: hemolisina, aerolisina, verotoxina). Estos factores difunden en el tejido e inician su destrucción ²⁴.

Las MVs pueden proveer de una ruta alterna para la liberación de estos 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 empaquetados dentro del lumen de las MVs cuentan con la ventaja de estar protegidos contra la acción inactivante de las enzimas ambientales ²⁹.

Una posible aplicación médica de las MVs es como agentes vacunales, por que cuando las MVs son liberadas de las bacterias, estas contienen la identidad de superficie de la bacteria donadora, por lo cual importantes antígenos de virulencia están presentes. Serotipos de *P. mirabilis* y *S. marcescens*, poseen adhesinas (pilis o fimbrias) y tienen estas estructuras asociadas a sus MVs. Claramente, las MVs son potentes estructuras antigénicas que pueden poseer cualidades para aumentar la respuesta inmune del hospedador ²⁹. A pesar de todos estos estudios la evaluación de estos biológicos aun están a nivel de campo, por lo que los productos comerciales no están circulantes en el mercado.

M. haemolytica elimina múltiples proteínas de interés inmunogénico, contenidas en MVs una vez que se les somete a estrés, por lo que la capacidad inmunogénica de éstas, es capaz de despertar una adecuada respuesta inmune humoral, que evita que los individuos que se expongan a las cepas de campo desarrollen cuadros patológicos característicos de la enfermedad ³².

En un trabajo realizado por González y Col. en el 2007 se demostró que animales inmunizados por vía intramuscular con MVs de *M. haemolytica* A2 y desafiados experimentalmente con una cepa de campo patógena de *M. haemolytica* del mismo serotipo, desarrollaron únicamente neumonías intersticiales inducidas por el virus utilizado durante el desafío, lo cual sugirió que las MVs protegen contra el desarrollo de lesiones neumónicas características de la enfermedad ³².

I.6. Signología clínica

La severidad de los signos clínicos pueden variar de inaparentes a una enfermedad rápida y fatal pero algunas características pueden ser mencionadas permanentemente: hay siempre un cierto grado de depresión y anorexia, fiebre de

hasta 42°C, ritmo cardiaco aumentado hasta cinco veces lo normal, una sustancial pérdida de peso y rinitis, resultando en una descarga nasal mucopurulenta o seca. A veces, están presentes, lagrimación incrementada, blefaritis y tos. El ritmo respiratorio incrementa en los estadios tempranos, seguido por disnea de similar gravedad. La auscultación revela sonidos vesiculares y bronquiales incrementados en la zona anteroventral, progresando de húmedos a secos, en algunas ocasiones pueden ser escuchados roces pleurales. Los becerros pueden colocarse con los codos doblados y el cuello alargado, y en algunos animales puede desarrollarse diarrea³.

Exudados en los senos nasales, por gravedad y por la hiperventilación de aerosoles infectados dada la polipnea compensatoria, caen por la tráquea hacia los pulmones, complicando los cuadros clínicos. Por esta razón la distribución de las lesiones en los pulmones suele ser anteroventral en casos severos puede llegar a haber una septicemia fatal¹.

I.7. Patogenia de la Mannheimiosis neumónica

Mucha de la patología del pulmón observada en la neumonía por Mannheimiosis neumónica es atribuida a la LKT de *M. haemolytica*. La LKT lisa leucocitos y plaquetas de ovinos. Mientras *M. haemolytica* permanece como flora normal del tracto respiratorio superior del ganado bovino y ovino, los efectos destructivos de la LKT, no se observan. La patogenicidad de *M. haemolytica* está marcada por la rápida replicación en vías respiratorias altas y subsecuente inhalación del microorganismo en los pulmones y la expresión de la LKT. Por lo tanto, la investigación de la regulación de LKT podría ayudar a comprender cómo *M. haemolytica* cambia su estado no patógeno al de un organismo virulento³³.

En adición a otros mediadores inflamatorios, se incluyen productos liberados por leucocitos que pueden inducir la migración de más leucocitos. Estos son productos de la 5-lipoxigenasa del ácido araquidónico e incluyen al leucotrieno B4 y al ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico, que son potentes agentes quimiotácticos. Se sabe que estos agentes inducen el reclutamiento de células, además de exacerbar los eventos inflamatorios en las lesiones microvasculares. Los mecanismos inducidos por

la LKT, mediante los cuales se activan los leucocitos, no han sido totalmente determinados, pero se sabe que es requerido un incremento en el calcio intracelular. Se han realizado estudios asociados al fenómeno de apoptosis como un elemento más en la respuesta del hospedador. Muchos investigadores han descrito que ciertas toxinas RTX pueden inducir a bajas concentraciones la muerte celular de leucocitos y puede jugar un papel significativo en la iniciación y persistencia de la infección, dándole al patógeno diversas ventajas contra los mecanismos de respuesta del hospedador ¹.

Las células de *M. haemolytica* también expresan una proteína, similar a las adhesinas de alto peso molecular de *Haemophilus influenzae*, pero su actividad funcional e interacción con las células blanco no han sido reportadas. Una adhesina de 68 kDa con actividad hemoaglutinante para eritrocitos de conejo reconoce específicamente glicoproteínas que contienen N-acetilglucosamina (GlcNAc) en neutrófilos de bovino y células epiteliales de tráquea. La adhesión de esta adhesina de 68 kDa induce un estallido oxidativo en neutrófilos de bovinos ¹⁹.

I.7.1. La adherencia a las células del tracto respiratorio

M. haemolytica coloniza la mucosa de la cavidad nasal y las criptas tonsilares en el ganado sano. La adherencia del patógeno respiratorio al epitelio pulmonar es un paso crítico en la colonización y la infección en el hospedador. Cuando se expone al animal a la acción de los virus estos causan una alteración de los mecanismos de defensas naturales del aparato respiratorio, existe destrucción de cilios, alteración de las membranas mucosas respiratorias y afección de los procesos de inmunidad local a nivel alveolar, por lo que se produce una colonización explosiva de la bacteria en el tracto respiratorio superior y utilizando factores de virulencia como las fimbrias y la cápsula la bacteria desciende hasta el tracto inferior. Una vez colonizado el pulmón, es allí en donde produce lesión del tejido a través de sus toxinas ¹⁷.

Estudios previos demostraron la habilidad de *M. haemolytica* de adherirse a las células epiteliales *in vitro* y a la superficie de la mucosa del tracto respiratorio superior. *M. haemolytica* produce varios componentes de superficie que potencialmente

pueden contribuir a la adherencia. Las fimbrias y el glicocálix fueron identificados en células de *M. haemolytica* crecidas en cultivos, asociadas a tejido traqueal de vacas experimentalmente infectadas. Aunado a estos componentes y similar a otras bacterias Gram-negativas, *M. haemolytica* produce una proteína de membrana externa A (OmpA) muy relevante para la adhesión de esta bacteria a su célula blanco¹⁷.

Esta proteína ha sido también referida como una proteína de membrana externa termomodificable en *M. haemolytica*. La OmpA participa en la adhesión específica a los receptores celulares y media la adherencia de varias bacterias patógenas a las células hospederas. Basado en una secuencia de homología se ha sugerido que la OmpA de *M. haemolytica* juega un papel importante en la colonización del tracto respiratorio de bovinos y ovinos. La OmpA es una de las principales proteínas de membrana externa en las bacterias Gram negativas. Se ha reportado que participa en la adherencia e invasión bacteriana y también en la activación de los mecanismos de defensa del hospedero para diferentes bacterias Gram negativas¹⁷.

En un estudio realizado por Dagmara y col. en el 2008, demostraron la adherencia de *M. haemolytica* a las células del epitelio bronquial bovino (BBEC). Ellos observaron proteínas de superficie de *M. haemolytica* con pesos moleculares aproximados a 30 kDa en SDS-PAGE y señalaron que estas proteínas se adhieren selectivamente a BBEC. En su estudio, ellos demostraron, lazos entre la OmpA de *M. haemolytica* con la adhesión a las BBEC. La preincubación de células de *M. haemolytica* con anticuerpo Anti-OmpA reduce significativamente la adhesión a las BBCE, sugiriendo que la interacción de la OmpA con las BBEC es importante para la adherencia de *M. haemolytica*¹².

Estos autores, también identificaron otra proteína de *M. haemolytica* con adherencia a las BBEC, a la que nombraron Lpp1, la cual migra junto con OmpA en SDS-PAGE. La Lpp1 de *M. haemolytica* (también conocida como P1pA o P1p1) representa una de las tres membranas similares de lipoproteínas con pesos moleculares que van de los 28 a 30 kDa observadas en SDS-PAGE. Cada una de

estas lipoproteínas fueron inmunogénicas y reconocidas por sueros de ganado bovino expuesto naturalmente a *M. haemolytica* o vacunados con *M. haemolytica* viva o muerta. Además, el anticuerpo sérico responde contra la recombinación de Lpp1 o Lpp3 correlacionado con la resistencia del ganado bovino desafiado por *M. haemolytica*¹².

I.8. Respuesta inmune hacia la bacteria

Algunos de los mecanismos más importantes en la inmunidad de los ovinos hacia *M. haemolytica*, están mediados por el complemento, la opsonización de la bacteria y la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos alveolares¹.

Una infección viral activa puede aumentar severamente la susceptibilidad del ganado ovino a las neumonías por *M. haemolytica*. Uno de los mecanismos implicados durante la infección viral, es la liberación de citocinas inflamatorias. Algunas de las citocinas más importantes, secretadas por las células de defensa del tracto respiratorio son interleucina 1 (IL-1 β), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α) e Interferón Gamma (INF- γ), que pueden estimular la migración leucocitaria y la activación funcional de las β - integrinas de leucocitos pulmonares³⁴.

Los macrófagos realizan una labor de gran importancia, ya que son los principales productores de las citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL- 12 y TNF- α y además liberan otras moléculas como: la enzima activadora de plasminógeno y fosfolipasa, radicales de oxígeno, peróxido, factor activador de plaquetas, óxido nítrico y mediadores lipídicos de inflamación, tales como prostaglandinas y leucotrienos³⁵.

La infección por *M. haemolytica* se establece en el pulmón y la continúa liberación de estas citocinas inflamatorias puede estar sostenida por los factores de virulencia de la bacteria (LKT y LPS)³⁴.

Los macrófagos funcionan como una célula presentadora de antígenos. En este sentido, los receptores de macrófagos, tienen un papel importante en el secuestro y procesamiento antigénico, así como en la transmisión de señales que

inducen la expresión de moléculas coestimuladoras. De esta manera, los macrófagos al liberar ciertos tipos de citocinas determinan la forma de la respuesta inmune. Las endotoxinas, tales como LPS, estimulan la producción de interleucinas por parte de los macrófagos y otras células. Las citocinas IL-1 y TNF- α promueven la expresión de moléculas de superficie tales como Moléculas de Adhesión Intercelular (ICAM) y selectinas sobre células endoteliales para la acumulación de leucocitos en sitios locales de inflamación. Por su parte los polimorfonucleares (PMN) contribuyen en gran medida a la patología del pulmón observada en la Mannheimiosis neumónica ³⁴.

Un potente mediador inflamatorio de la neumonía por *M. haemolytica* en rumiantes es la interleucina-8 (IL-8). La IL-8 se produce por células endoteliales, epiteliales, macrófagos activados y neutrófilos, causando la activación y quimiotaxis de estos últimos al sitio de lesión. La producción de IL-8 es inducida por otras citocinas, IL-1 y TNF- α siendo estas dos últimas las más potentes. Los neutrófilos también liberan elastasa, la cual induce síntesis de IL-8 en células epiteliales ³⁶.

II. JUSTIFICACIÓN

Las MVs de *M. haemolytica* A2 han sido utilizadas como biológico en ovinos, induciendo una respuesta inmune humoral protectora ³². Considerar la respuesta inmune celular que el tejido pulmonar y sus células de defensa pudieran generar, permitirá establecer si ésta respuesta inmune, participa o interacciona con la inmunidad humoral para evitar la colonización de *M. haemolytica* A2 en el pulmón de ovinos en presencia de MVs. Estableciendo la actividad y cambio estructural que sufren las células expuestas a la presencia de diferentes concentraciones de MVs.

III. HIPÓTESIS

Si las Microvesículas (MVs) de *M. haemolytica* A2 inducen una buena respuesta inmune humoral cuando se administran como biológico inmunizante por vía parenteral en ovinos, es posible que las células inmune específicas del pulmón, puedan desarrollar una respuesta celular que se traduzca en cambios estructurales y funcionales en las mismas y que interaccione con la respuesta humoral, evitando o reduciendo la colonización de la bacteria de campo a nivel pulmonar.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Evaluar cambios estructurales del tejido pulmonar, de macrófagos alveolares y linfocitos tisulares de ovino *in vitro*, al interaccionar con diferentes concentraciones de MVs de *M. haemolytica* A2.

IV.2. Objetivos particulares

- a) Obtener MVs a partir de sobrenadantes de cultivo de *M. haemolytica* A₂.
- b) Obtener membrana interna, externa y citosol de *M. haemolytica* A₂ mediante sonicado y ultracentrifugación.
- c) Determinar la concentración y presencia de MVs de *M. haemolytica* A₂ mediante las técnicas de Bradford ³⁸ y SDS-PAGE ³⁹ respectivamente.
- d) Obtener macrófagos alveolares a partir de lavados bronquio alveolares (LBA) de pulmones de ovinos sanos, linfocitos tisulares y células epiteliales de tejido pulmonar, para montar cultivos celulares con las mismas.
- e) Determinar mediante microscopia electrónica, cambios estructurales en macrófagos alveolares, células epiteliales de tejido pulmonar y linfocitos tisulares, al interactuar con diferentes concentraciones de MVs.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

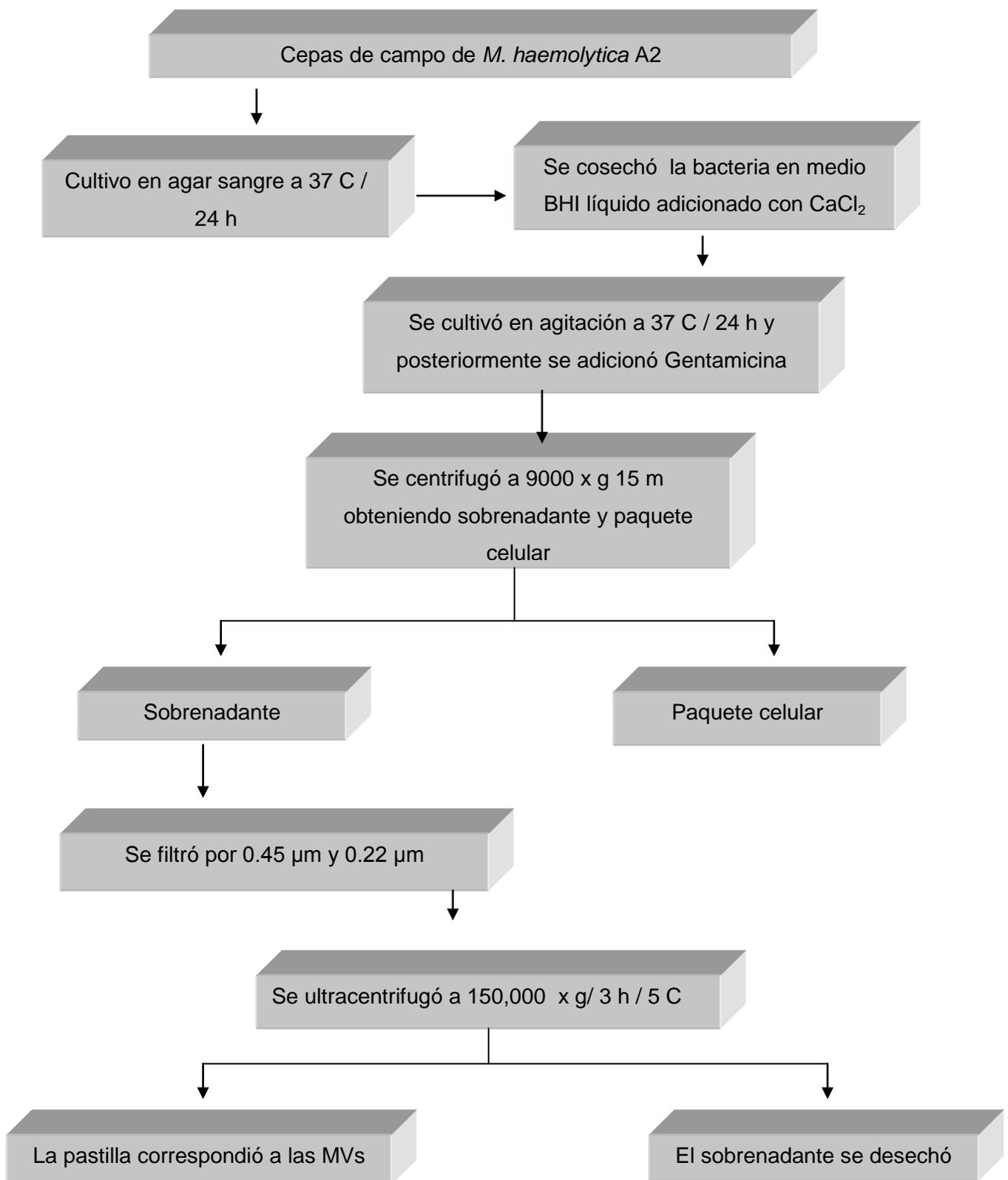
En el **Esquema 1** se muestra el diagrama de flujo para la obtención de las MVs de *M. haemolytica*. Se realizó el crecimiento bacteriano en 4 placas de agar sangre mediante estría cerrada, incubándose a 37 C / 24 h. Para este paso se utilizó una cepa de *M. haemolytica* A2 de campo, obtenida a partir del aislamiento de un pulmón neumónico, de un animal muerto por la enfermedad recuperada en un trabajo previo³⁷. Se realizó tinción de Gram y un análisis bioquímico para corroborar la morfología e identidad bacteriana respectivamente.

V.1. Obtención de Microvesículas (MVs)

Posteriormente al cultivo de la bacteria, se cosecharon las placas en 500 ml de BHI adicionado con Cloruro de Calcio (1ml / 250 ml BHI), a 37 C / 24 h / en agitación suave. Al cabo del tiempo, se adicionó Gentamicina^{31, 37} a una dosis de 25 µg/ml de cultivo, se incubó nuevamente el cultivo en las condiciones antes mencionadas. Paralelamente, se realizó tinción de Gram para verificar morfología bacteriana.

El cultivo anterior se centrifugó a 9000 x g / 15 m y en este paso, se separó la biomasa y el sobrenadante se filtró por membranas Millipore, primero por 0.45 µm y posteriormente por 0.22 µm. El producto de la filtración se ultracentrifugó a 150 000 g / 3 h / 5 C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla resultante, se resuspendió en Hepes 10 mM con inhibidores de proteasas, finalmente la pastilla que contenía las MVs se conservó a -70 C hasta su uso³⁷.

Esquema 1: Metodología para la obtención de MVs de *M. haemolytica* A2.



V.2. Purificación de proteínas de MVs, ME y MI en solución, en presencia de detergentes y lípidos

Se colocaron 200 µl de la muestra problema (MV, PME, PMI) conservada en congelación más 400 µl de metanol, esta solución se sometió a vortex para mezclar y se centrifugó por 10 s / 9,500 x g, al resultado de éste paso se le adicionaron 200 µl de cloroformo y se sometió nuevamente al vortex y se centrifugó por 10 seg / 9,500 x g. A esta muestra se le adicionaron 300 µl de agua desionizada y se siguió el mismo procedimiento que con las muestras anteriores. La fase superior se removió cuidadosamente y fue desechada, se adicionó 300 µl de metanol al resto de la fase clorofórmica y la interfase con las proteínas precipitadas, esta última muestra se mezcló con vortex y se centrifugó por 2 m, el sobrenadante se retiró y el pellet se secó bajo rocío de aire. El pellet se conservó a -70°C hasta su uso ³⁷.

V.3. SDS-PAGE y condiciones de corrimiento electroforético

Para corroborar la presencia de MVs y conocer la concentración de estas, se realizaron dos metodologías caracterizadas en trabajos previos para, se realizaron dos técnicas. La técnica de Bradford ³⁸ permitió determinar la concentración de proteína que contenía cada muestra, cuantificando con exactitud mediante una curva estándar de albúmina y regresión lineal la cantidad de µg por µl contenidos en la muestra.

Posteriormente, mediante SDS-PAGE ³⁹ en geles de Poliacrilamida al 12%, (**Esquema 2**), se observó la presencia de las proteínas que acarrean las MVs. Se colocó un marcador de peso (MP) en el primer carril y para los siguientes carriles se colocaron las muestras de MVs, previamente solubilizadas en buffer de muestra y hervida durante 10 m. Se dejó correr el gel en una cámara de electroforesis, conectada a una fuente de poder a 120 Volts / 2 h. Finalmente se tiñó el gel con azul de Comassie, colocando el gel en la solución de tinción, a temperatura ambiente y en agitación suave (1-3 h), posteriormente el gel se destiñó con una solución desteñidora (metanol 50% - ác. acético 7% - agua) por 3 veces, con intervalos de 30 m cada uno hasta visualizar las bandas deseadas. Cabe mencionar que para este paso se utilizó

también una cepa de referencia de la bacteria (National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa 50010). Finalmente el gel se conservó en ácido acético al 10%. En otro de los casos, el gel se tiñó con tinción de plata utilizando un Kit comercial (Silver Stain Plus, BIO-RAD, 161-0449) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para poder asegurarse de que las MVs acarrean proteínas de interés inmunogénico contenidas en las diferentes fracciones de membrana, se comparó en geles de poliacrilamida al 12%, las proteínas de membrana externa, interna y citosol, por lo que se procedió a la extracción de las mismas.

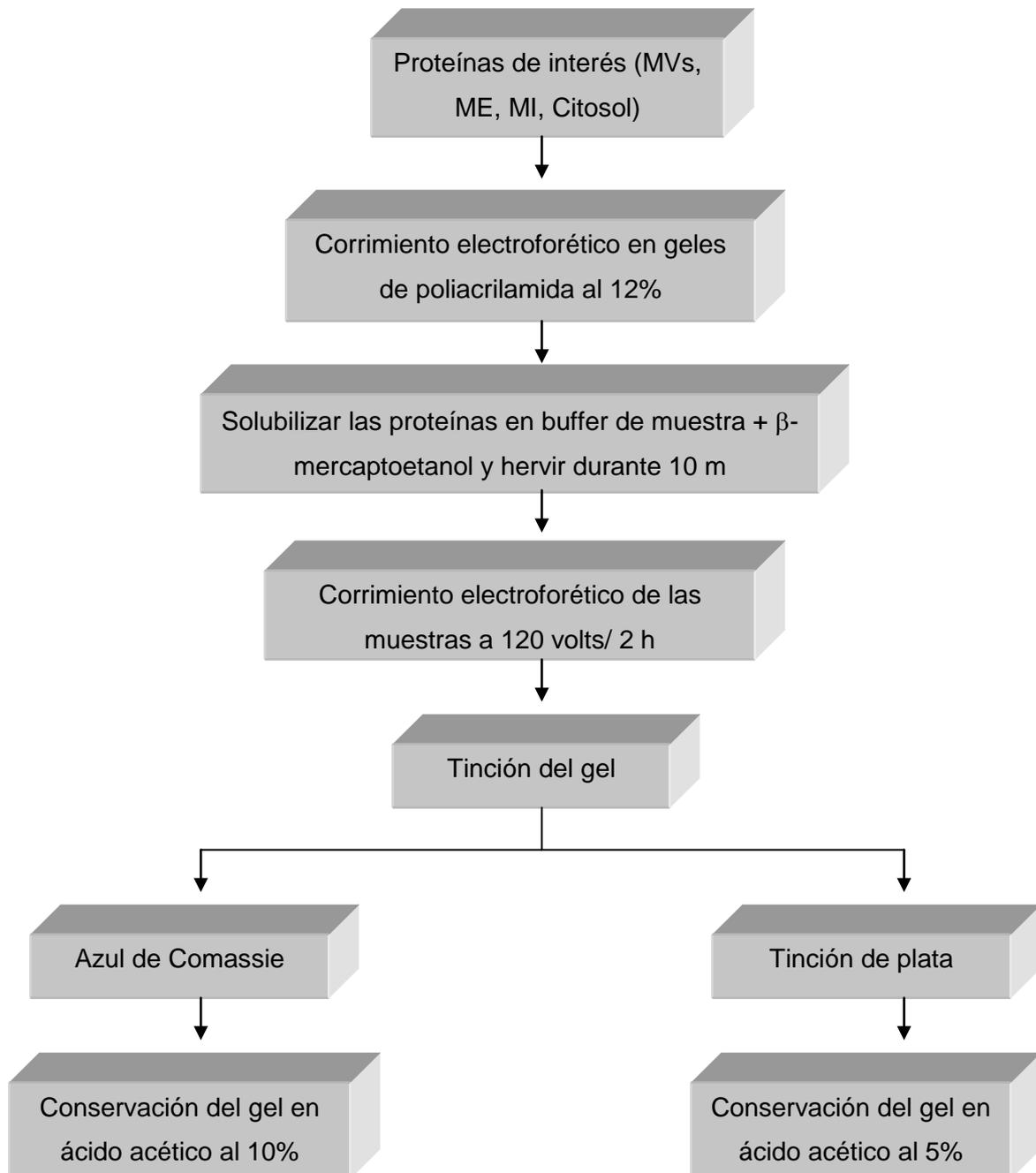
Para esta metodología se utilizó el botón de células completas. Se descongeló la pastilla conservada a -70 C y se distribuyó la muestra en varias alícuotas a las que posteriormente se les realizó 10 pulsares de 30 a 60 s con 1 m de descanso en baño de hielo con sonicador de punta (Ultrasonic Processor, VC 130, SONICS & MATERIAL INC). Posteriormente se centrifugó la muestra sonicada a 1,000 x g / 15 m para la remoción de restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 100,000 x g / 2 h. La pastilla que se obtuvo correspondía a una fracción de la envoltura celular cruda que contenía membrana externa y membrana interna y el sobrenadante al citosol. La pastilla de membranas totales se disolvió en amortiguador + Sarcosyl al 1% y se colocó en agitación suave por 30 m / T° ambiente ³⁷.

Finalmente se centrifugó la muestra a 100,000 x g /1 h donde el paquete resultante que correspondía a la membrana externa se disolvió en HEPES más inhibidores de proteasas y el sobrenadante correspondió a la membrana interna, la cual se conservó en congelación a -70 C hasta su uso. Es importante mencionar que para el corrimiento electroforético se necesitaba que las muestras a utilizar hubieran sido previamente limpiadas por el método de purificación de proteína en presencia de detergentes y lípidos, que fue ya descrito con anterioridad ³⁷.

V.4. Evaluación *in vitro*

Para realizar la evaluación *in vitro* primeramente se obtuvieron los diferentes tipos celulares y posteriormente se les dio el proceso que se menciona en el **Esquema 3**.

Esquema 2: Metodología para el corrimiento electroforético por el método de SDS-PAGE.



V.4.1. Obtención de Macrófagos alveolares mediante Lavado Bronquio Alveolar (LBA)

Para obtener los macrófagos alveolares (**Esquema 3**) se obtuvieron pulmones de ovino sanos de aproximadamente 2 meses de edad, incluyendo el corazón y sus grandes vasos controlando las condiciones de obtención para mantener la mayor esterilidad posible. Fueron mantenidos en baño de hielo y procesados en un tiempo máximo de 30 m pos-sacrificio. Se lavaron perfectamente por fuera con agua estéril, con el cuidado de que no se introdujera ningún material contaminante. Después de enjuagar, se comenzó con el lavado interno, se introdujeron por tráquea aproximadamente 2 litros de SSF estéril con una jeringa de 60 ml para limpiar los pulmones de los restos de sangre, evitando así la contaminación de la muestra con eritrocitos ⁴⁰.

Después de que los pulmones se encontraban completamente limpios, se introdujeron 40 ml de SSF nueva, estéril y limpia con una nueva jeringa y se hicieron movimientos de succión en 3 ocasiones recolectando la SSF obtenida en tubos cónicos estériles, este paso se repitió de 5 a 8 veces. La solución que contenía los macrófagos alveolares se centrifugó por 10 m / 24,000 x g, se retiró el sobrenadante y el botón celular de todos los tubos se homogenizó en un solo tubo, a este tubo se le agregó tris-NH₄Cl al 0.17 M y se mantuvo 5 minutos en baño con hielo (esta solución tiene la capacidad de lisar eritrocitos sin afectar globulos blancos), este paso se realizó con la finalidad de lisar los eritrocitos contaminantes en la muestra. Se centrifugó nuevamente la muestra anterior por 24,000 x g / 5 m y se retiró el sobrenadante; el botón se resuspendió agregando 10 ml de PBS citrato pH 7.4 y centrifugándose nuevamente 18,000 x g / 5 m. Se repitió este paso 3 veces y al terminar la ultima centrifugación se retiró el sobrenadante y se agregó medio RPMI 1640 enriquecido (adicionado con L-glutamina, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio) para su uso en cultivo celular ⁴⁰.

V.4.2. Obtención de células a partir de tejido pulmonar

Para la evaluación *in vitro* (**Esquema 3**) se obtuvieron macrófagos de tejido pulmonar, primeramente se cortó un trozo de aproximadamente 15 g del tejido pulmonar, éste se fragmentó con una hoja de bisturí hasta que el tejido quedó disgregado casi por completo, posteriormente se sometió a una digestión enzimática con colagenasa IV (150U / ml) y se colocó en agitación suave a 9,000 x g / 37 C durante 1 h, posteriormente el tejido se filtró con organza para obtener únicamente la parte líquida donde se encontraban las células y eliminar los restos de estroma, el producto de la filtración se lavó con PBS citrato por centrifugación a 24,000 x g / 5 m y el botón resultante se resuspendió en 5 ml de buffer lisis y se mantuvo en baño de hielo / 5 m, se detuvo la lisis con PBS 1x y se lavó 3 veces por centrifugación a 24,000 x g / 4 C / 5 m, finalmente se agregó el medio RPMI 1640 enriquecido, para su uso en cultivo celular ⁴¹.

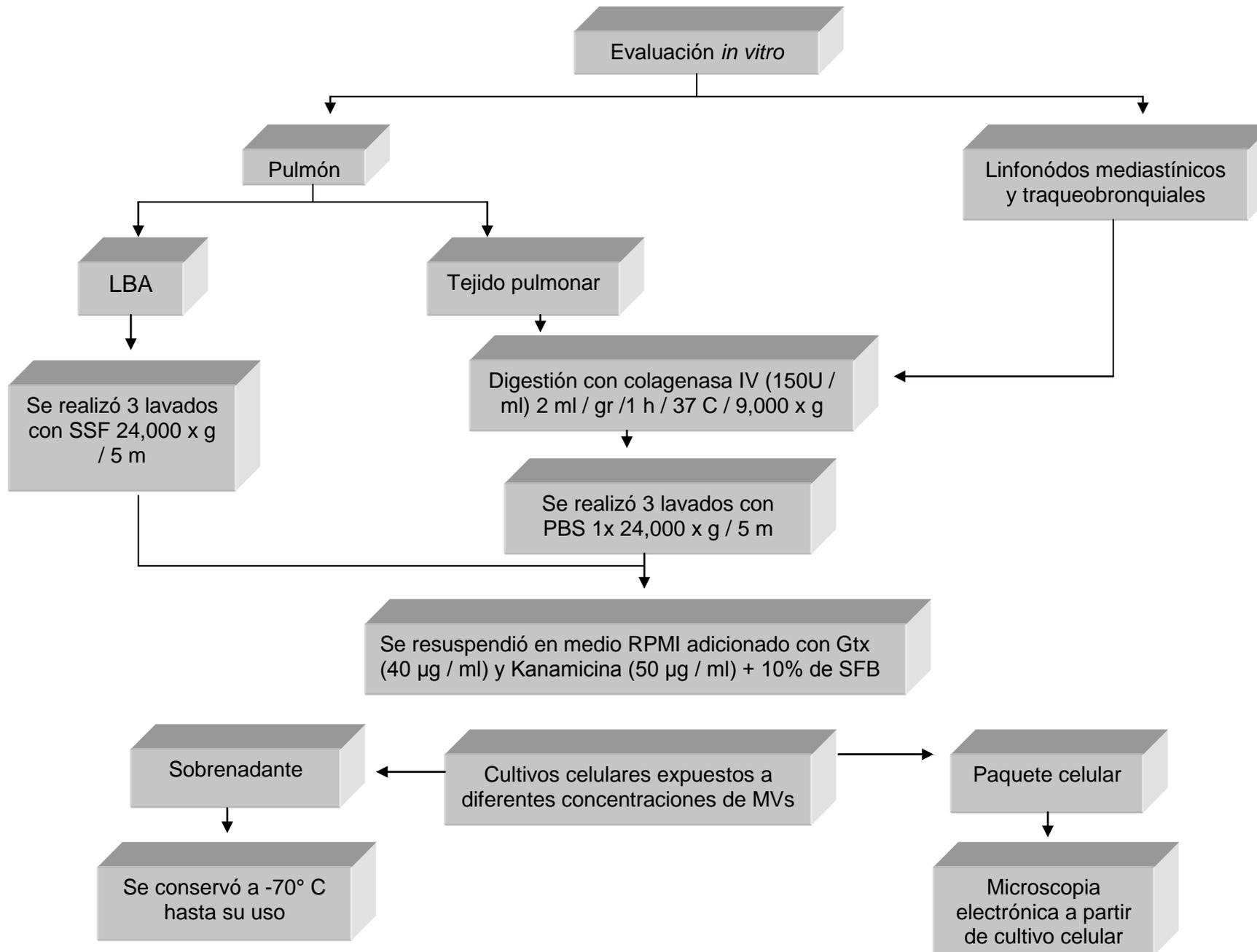
V.4.3. Obtención de linfocitos a partir de nódulo linfoide

Para la obtención de linfocitos se siguió la misma metodología antes mencionada (**Esquema 3**) para células epiteliales a partir de tejido pulmonar, con la diferencia de que en esta ocasión el tejido que se sometió a digestión enzimática fue linfonodos traqueobronquiales y mediastínicos. Al igual que las células anteriores, al finalizar la extracción se les agregó medio RPMI y se les dió el mismo tratamiento y constantes para cultivo celular ⁴¹.

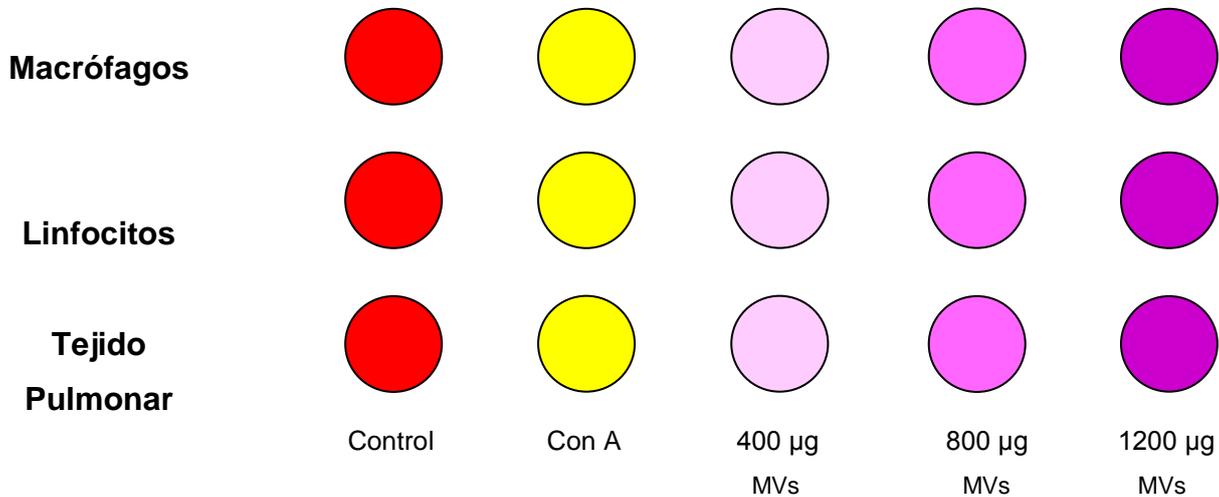
V.4.4. Condiciones de cultivo celular

Cuando ya se tenían todos los tipos celulares en medio RPMI 1640 se procedió al conteo de cada una con Azul de Tripán en cámara de Neubauer, verificando la viabilidad de las células y ajustando la concentración de estas a 1×10^6 células viables por pozo (eliminando las muertas mediante lavados) a excepción de las células de tejido pulmonar donde la concentración fue de 3×10^6 , utilizando placas de 18 pozos en los que se colocaron las células como se muestra en el **Esquema 4** ⁴¹.

Esquema 3: Metodología para la evaluación *in vitro* de distintos tipos celulares expuestos a diferentes concentraciones de MVs



Esquema 4: Esquematación de la placa de cultivo celular (grupos controles y diferentes tratamientos).



Finalmente se le adicionaron a las células con antibiótico (Kanamicina 50 µg / ml y Gentamicina 40 µg / ml) y SFB al 10%. Cabe mencionar que como se muestra existió un grupo control negativo al que no se le añadió nada y un grupo control positivo al que se le agregó Concanavalin A, esta es una lecitina que induce la proliferación de linfocitos, esto se hizo con la finalidad de observar cambios celulares de activación en este grupo y así poder comparar con los cambios que pudieran inducir las diferentes concentraciones de MVs de *M. haemolytica*. Se dejaron incubar las células durante 72 h. La bibliografía, reporta adherencia celular a placas de cultivo variante según el tipo celular que en promedio se da en un tiempo de 1 h, por lo que el tiempo proporcionado a las células fue suficiente para que estas pudieran adherirse. Posteriormente, se procedió a la cosecha de las mismas, colocándolas en tubos cónicos y se centrifugaron a 24,000 x g / 5 m, el sobrenadante se congeló a - 4 C. El paquete celular se lavó 3 veces por centrifugación con PBS citrato 24,000 x g / 5 m para eliminar los restos de medio, finalmente se agregó glutaraldehído al 2.5% para fijar las células y se procedió con la metodología para microscopía electrónica. Cabe mencionar que antes de incluir las células se realizó una observación mediante microscopio invertido con la única finalidad de observar la ausencia de contaminantes en el cultivo.

V.4.5. Microscopía Electrónica.

Para la evaluación de cambios estructurales en las células en presencia de diferentes concentraciones de MVs previamente obtenidas, se realizó microscopía electrónica, primero se procedió a realizar la resina tipo Spurr.; en un vaso de precipitados limpio con acetona se agregaron los siguientes reactivos:

ERL-4206	5 g
DER-736	3 g
NSA	13 gr
DMAE	0.2 g

La resina se guardó en refrigeración hasta su uso. Una vez que las células habían sido incubadas por 72 h, éstas se desprendieron de la placa con pipeta y se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en PBS 1x (pH 7.4) por una h, se mantuvieron en agitación suave y después de la primera media hora se centrifugaron durante 1 m / 6,000 x g, continuando en agitación hasta el término de la h; después se realizaron 3 enjuagues de 5 m cada uno con PBS pH 7.4, una vez fijadas las muestras se procedió a la pos-fijación con tretaóxido de osmio al 1%, colocándose 300 µl del mismo por muestra durante 1 h en agitación suave, la primera media hora se mantuvo en hielo y la segunda media h a temperatura ambiente; se volvieron a lavar las muestras 3 veces con PBS pH 7.4 de 5 m cada lavado y después de este paso se deshidrató la muestra a partir de alcoholes al 60%, 70%, 80%, 90% y 100% haciendo cambios de 10 m cada uno. Por último se realizó la infiltración en la resina previamente preparada en una relación 1:1 y 3:1, (resina:agua) por 2 h y con 3 cambios en resina pura, se incubaron las muestras en estufa de CO₂ / 60 C / 48 h ⁴².

Posterior a las 48 hrs de la incubación las muestras se retiraron de la estufa y se procedió al corte, se montaron las mismas sobre rejillas para microscopía electrónica, y se procedió a contrastarlas. Primero se contrastaron con uranilo / 1 h, una vez concluido el tiempo se enjuagaron las muestras con agua destilada-desionizada-filtrada por 3 ocasiones en intervalos de 1 m cada uno y posteriormente se contrastaron con plomo por 5 m, se volvieron a enjuagar 3 ocasiones y finalmente se observaron al microscopio electrónico de transmisión (Marca Jeol, JEM 2000 EX) ⁴².

V.4.6. Características evaluadas en las diferentes estructuras

1. Membrana citoplasmática:
 - * Continuidad e integridad de membrana
 - * Salida de contenido citoplasmático

2. Citoplasma:
 - * Presencia o ausencia de vacuolas
 - * Aspecto del citoplasma
 - * Salida de contenido citoplasmático
 - * Presencia o ausencia de organelos

3. Membrana nuclear:
 - * Continuidad e integridad de membrana
 - * Salida de contenido nuclear hacia el citoplasma

4. Núcleo:
 - * Tipo de cromatina (condensada, dispersa)
 - * Presencia de núcleo

V.4.7. Características tomadas en cuenta para las diferentes evaluaciones

- ✓ **Integridad de la membrana citoplasmática y nuclear:**

(-) Sin alteración: Son aquellas células que no sufrieron alteraciones en la continuidad de su membrana.

(+) Leve: Son las células que perdieron la continuidad de una parte de su membrana pero que a pesar de esto, conservaron la morfología celular y no hay salida de elementos celulares hacia el exterior de la misma.

(++) Moderada: Células que perdieron ligeramente la continuidad de sus membranas y en donde además se aprecia ligera salida del contenido celular al exterior de la misma. Sin alterar la forma celular.

(+++) Severa: Son las células que presentaban escasa o nula presencia de sus membranas, con salida de contenido hacia el espacio extracelular y por consiguiente en algunos de los casos, desarrollaron alteración de su estructura celular.

✓ **Presencia de vacuolas citoplasmáticas:**

Sin alteración: Son aquellas células que no presentaron vacuolas en su citoplasma.

Leve: Células en las que se observaron escasas vacuolas (2-5) en el citoplasma, tanto lipídicas como fagocíticas.

Moderada: Denominación asignada a células con aproximadamente el 50% de su citoplasma cubierto de vesículas.

Severa: Células que se encontraron con marcada alteración de la membrana citoplasmática, evidenciando en su interior una gran cantidad de vacuolas así como aparente ausencia de organelos y núcleo

VI. RESULTADOS

VI.1. Caracterización de antígenos en Mvs.

Se realizó corrimiento electroforético mediante SDS-PAGE al 12% (**Figura 2**) para comparar los patrones proteicos entre las diferentes fracciones de membrana de *M. haemolytica* y sus MVs. De esta manera se evidenció la presencia de proteínas antigénicas acarreadas por las MVs de la bacteria que se caracterizaron en trabajos anteriores³², con pesos moleculares de 104, 60, 54, 45 y 25 kDa respectivamente, señaladas con flechas sobre el último carril del gel que corresponde a las MVs (**Fig. 2**). Así mismo, se aprecian una gran cantidad de proteínas de las diferentes fracciones que se comparten entre estructuras. Se utilizó un patrón estándar de proteínas de pesos moleculares conocidos, que permitió establecer los tamaños moleculares de las diferentes proteínas identificadas.

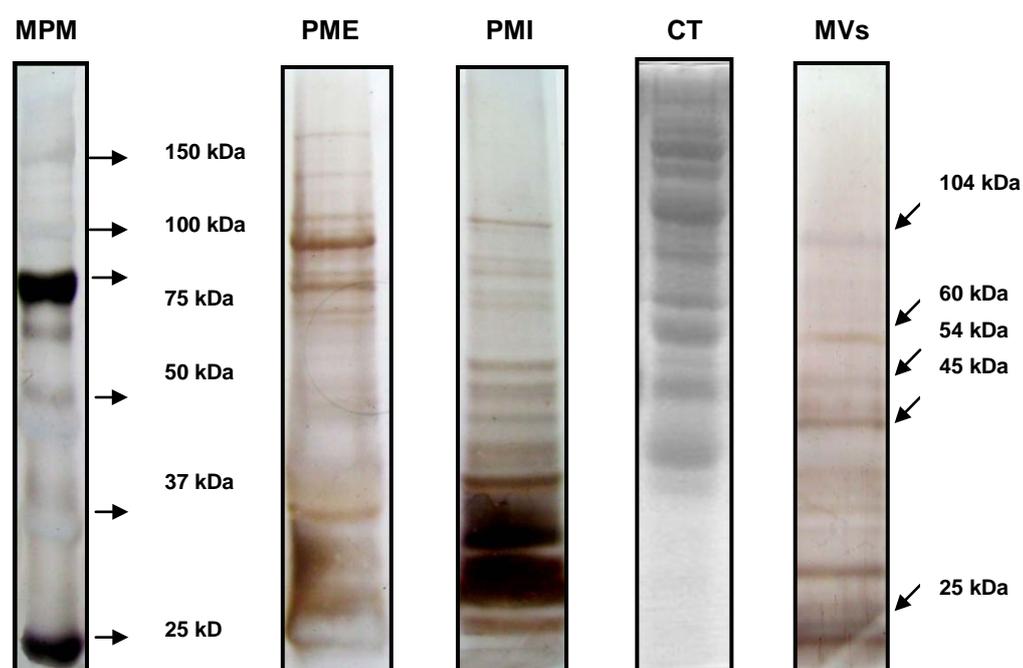


Figura 2: SDS-PAGE al 12%, comparación entre las diferentes fracciones de membrana de *M. haemolytica* y sus MVs. Tinción de Plata, se observa en el primer carril (de izquierda a derecha) el marcador de peso molecular (MPM), en el segundo una muestra de membrana externa (PME/30 μ g), en el tercero la fracción de membrana interna (PMI/14 μ g), en el cuarto el citosol (CT/21 μ g) y por último se observa una muestra de microvesículas (MV/15 μ g) donde se señalan las proteínas de interés inmunogénico identificadas.

De la cepa de referencia de *M. haemolytica* A2 (National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa 50010) se obtuvo la fracción de membrana externa para comparar los patrones de proteínas mediante corrimiento electroforético con la cepa patógena de campo OV20, obtenida en trabajos previos a partir de lesiones neumónicas de un animal muerto en campo. De esta manera, se puede apreciar (**Figura 3**) sobre el gel, que ambas cepas comparten 4 de sus principales proteínas marcadas con flechas sobre los respectivos carriles, además de muchas otras.

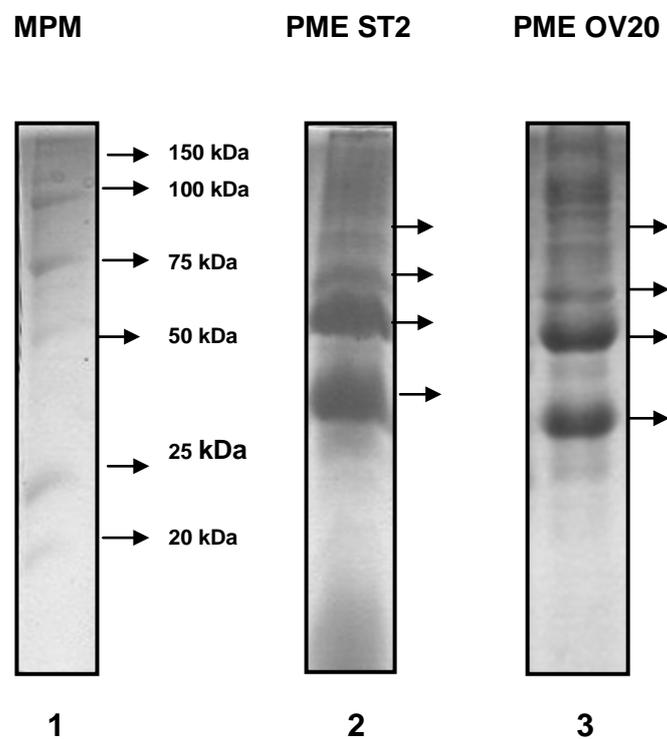


Figura 3: SDS-PAGE 12%, comparación de la fracción de membrana externa entre la cepa de referencia y la cepa patógena de campo. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestra las PME de la cepa de referencia (30 µg) y en el carril 3 las PME de una cepa de campo OV20 patógena (10 µg), esta se utilizó como control para comparar entre diferentes proteínas de interés que se encuentran marcadas con flechas en ambos carriles.

VI.2. Microscopía Electrónica

VI.2.1. Descripción de los grupos celulares

Se realizó la observación de las microfotografías tomadas mediante el microscopio electrónico y se procedió a realizar la descripción de estas para observar las lesiones de las células.

A. LINFOCITOS

✓ Grupo control:

Estas células presentaron núcleos en una relación con su citoplasma 1:1, además la cromatina se disponía dispersa en el mismo. No se observó pérdida de continuidad en las membranas citoplasmáticas (**Figura 4**), evidenciando en su interior organelos, principalmente mitocondrias y retículo endoplásmico (**Figura 5**). En este grupo, las células se apreciaron con cierta homogeneidad en tamaños celulares (4- 5 μm) y formas nucleares. Cabe mencionar que por el método de extracción, algunas células entraron en apoptosis dadas las características observadas al microscopio electrónico.

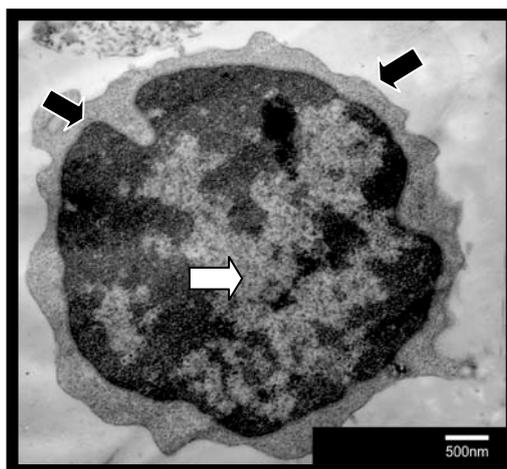


Figura 4: Microfotografía de linfocito. Como se puede observar en la figura, el núcleo del linfocito distribuye su cromatina de forma dispersa (tipo laxo, flecha blanca). Además se observa la continuidad de sus membranas celulares (flechas negras).



Figura 5: Microfotografía de linfocito. Se muestra la presencia de organelos (mitocondrias, flechas negras) y se nota la similitud en forma y tamaño celular a las otras células.

✓ **Grupo con Concanavalin A:**

En este grupo de células los patrones de cromatina eran muy similares entre sí, presentando núcleos grandes y activos, dado que se observó cromatina dispersa, con relación núcleo citoplasma 2:1 y con sus membranas perfectamente definidas (**Figura 6**), en las que no se desarrolló mayor alteración. En general, éstas se observaron con morfología que sugiere células activas, observándose gran cantidad de organelos (**Figura 6 y 7**) principalmente mitocondrias. Al igual que en la concentración de 1200 μg de MVs, las células adquirieron un tamaño ligeramente mayor al resto de los grupos (7–8 μm) y presentando de la misma manera mayor pleomorfismo (**Figura 6**) que el resto de los grupos, caracterizado por variabilidad de tamaño y forma tanto nuclear como de la célula completa.

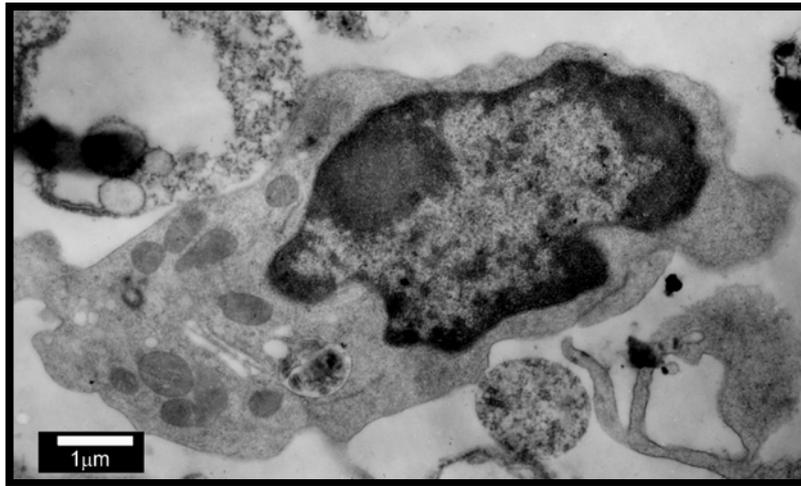


Figura 6: Microfotografía de linfocito. La imagen muestra la integridad de membranas, relación núcleo citoplasma 2:1, así como la variabilidad en tamaño y forma celular.

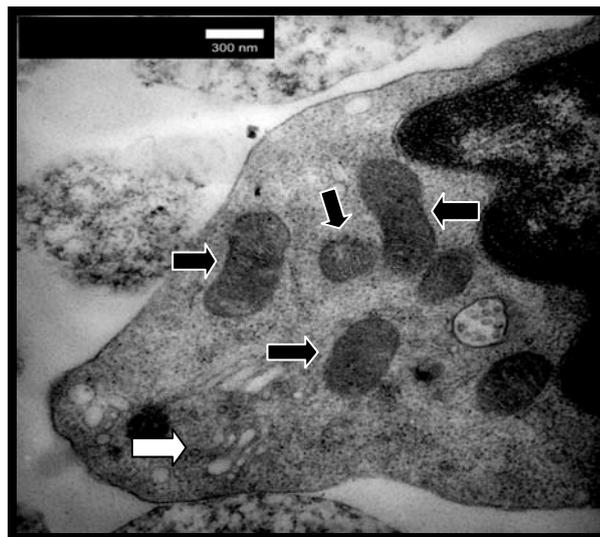


Figura 7: Microfotografía de linfocito. La imagen muestra una mayor cantidad de mitocondrias en el citoplasma de la célula respecto a los otros grupos (Flechas negras) así como un aparente Aparato de Golgi (Flecha blanca).

✓ **Grupo con 400 µg de MVs:**

En este grupo de células, se observó morfología sugerente de aumento en la actividad celular, de acuerdo a los patrones de cromatina a nivel nuclear, ya que esta en su gran mayoría se encontraba dispersa, un alto número de las células de este grupo se observó con las membranas tanto citoplasmáticas como nucleares sin alteraciones y además se aprecian con gran facilidad cierta cantidad de organelos en el citoplasma (como mitocondrias y retículo endoplásmico) **(Figura 8)**.

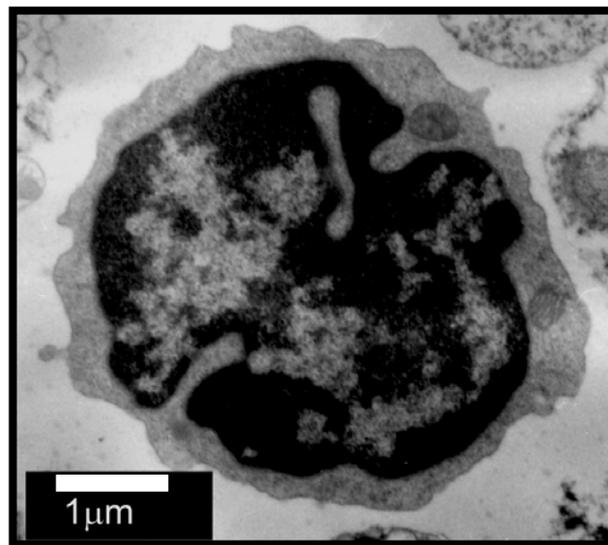


Figura 8: Microfotografía de linfocito. La imagen muestra la integridad de las membranas celulares y la distribución de la cromatina, así como algunos organelos en su citoplasma.

Otras células presentaron pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática y en algunos casos era evidente la pérdida en la continuidad de la membrana nuclear, así mismo se observaron múltiples vesículas de diferentes diámetros presentes en el citoplasma de la célula **(Figura 9)**, aunque cabe mencionar que las últimas características mencionadas fueron observadas en un bajo porcentaje del total de células analizadas.

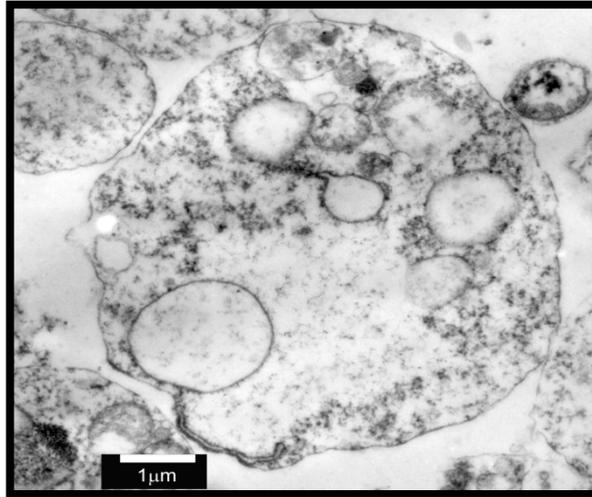


Figura 9: Microfotografía de linfocito. Aquí se muestra una célula con las características de daño celular, (vesículas invadiendo el citoplasma).

✓ **Grupo con 800 μg de MVs:**

A pesar de que en este grupo se aumentó la concentración de las MVs, se observó un gran número de células que presentaron características morfológicas tanto a nivel nuclear como a nivel citoplasmático, que sugieren activación. Particularmente, los núcleos presentaron patrones de cromatina de tipo laxa (**Figura 10**) y el tamaño de los mismos de acuerdo a la relación núcleo:citoplasma, se refirió 1:1. La membrana citoplasma se observó sin cambios o alteración. En este grupo comenzaron a observarse cuerpos apoptóticos que se caracterizaron por que denotan en su contenido fragmentos de organelos, así como la notable ausencia de núcleos (**Figura 11**).

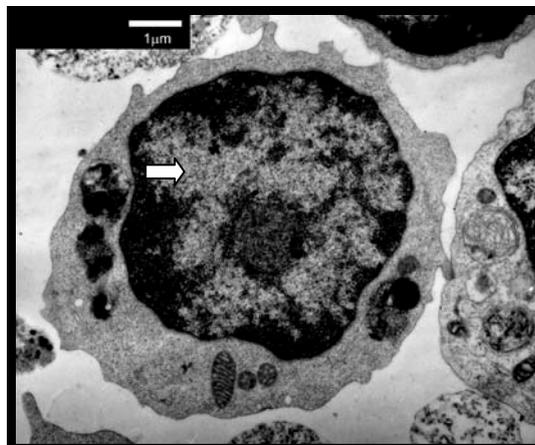


Figura 10: Microfotografía de linfocito. Como se puede observar en la figura, el núcleo del linfocito distribuye su cromatina de forma dispersa (tipo laxo, flecha blanca).

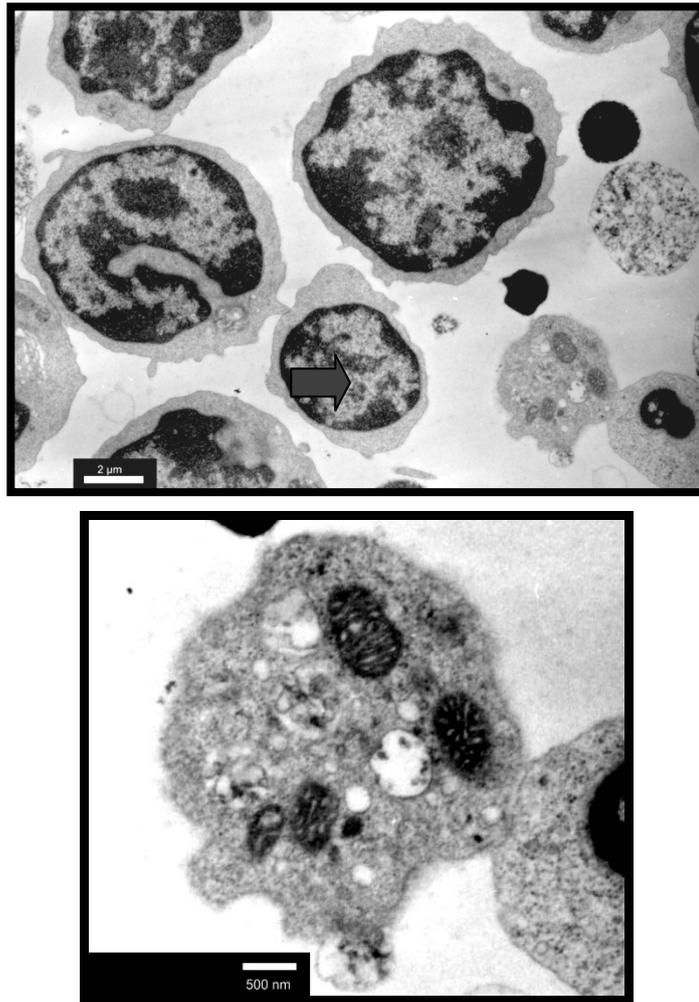


Figura 11a (imagen superior) y 11b (imagen inferior): Microfotografía de cuerpo apoptótico asociado a la extracción de las células.

✓ **Grupo con 1200 µg de MVs:**

En estas células los patrones nucleares sugirieron alta actividad celular; se observaron linfocitos que presentaban de 6 a 10 mitocondrias evidentes en su citoplasma (**Figura 12**). Las células adquirieron dimensiones mayores a las observadas en los grupos anteriores (7-8 µm) al igual que en el grupo tratado con Concanavalin A. De la misma manera fue evidente la presencia de ligeras proyecciones citoplasmáticas. El porcentaje de presencia de cuerpos apoptóticos fue bajo al igual que en los otros grupos evaluados, a pesar del aumento en la concentración de MVs a las que se expusieron.

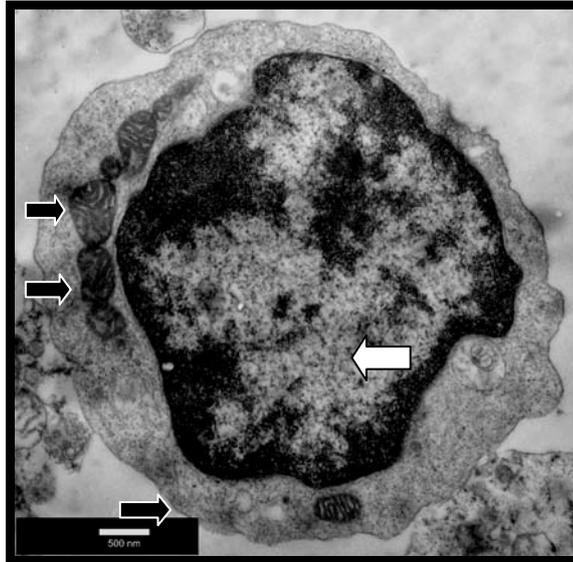


Figura 12: Microfotografía de linfocito. La imagen denota una gran cantidad de mitocondrias en el citoplasma (Flechas negras), así como también, es evidente la cromatina laxa en el núcleo (Flecha blanca).

B. TEJIDO PULMONAR

✓ Grupo control:

En este grupo celular a nivel nuclear se observó cromatina condensada y membranas nucleares sin alteración. En general, las células se encontraron sin aparente daño en las diferentes estructuras evaluadas. Es decir, integridad de la membrana citoplasmática, presencia de prolongaciones citoplasmáticas y algunas con presencia de vesículas en el citoplasma (**Figura 13**). Sin embargo, se observó que en un bajo porcentaje la membrana citoplasmática de éstas, perdía continuidad e integridad, evidenciando así la salida de contenido citoplasmático, este daño probablemente se debió al método de extracción celular aunado al de fijación. Como la muestra es de tejido pulmonar se pudieron encontrar diferentes tipos celulares (epiteliales, de matriz extracelular, de sostén y de repuesta inmune) pero en su gran mayoría se encontraron macrófagos alveolares ya que estos son los únicos que tienen la capacidad de adherirse a la placa de cultivo celular.

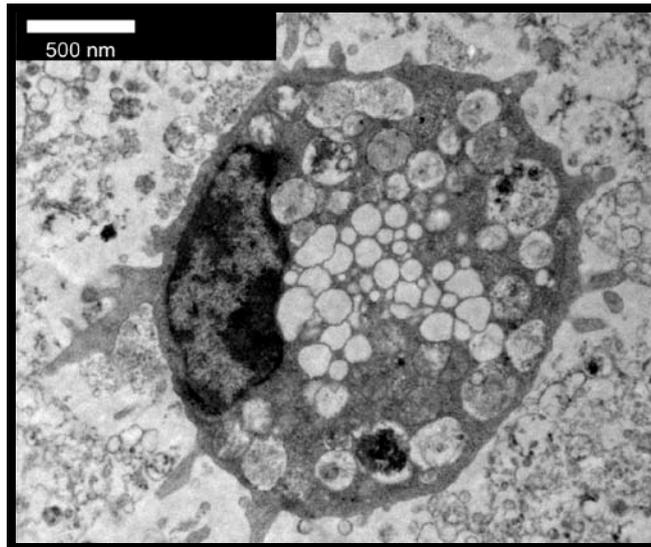


Figura 13: Microfotografía de célula del grupo de tejido pulmonar. En la imagen se muestra una célula del grupo control en general se observan todas sus estructuras celulares integra.

✓ **Grupo con Concanavalin A:**

Muestra no analizable, debido a la marcada destrucción celular probablemente asociada al proceso sometido a las células para su obtención y posteriormente su extracción de las placas de cultivo.

✓ **Grupo con 400 µg de MVs:**

En este grupo, solo en un bajo porcentaje celular se observó con núcleos que conservaban el contorno de su membrana nuclear y en donde se dispersaba la cromatina. Sin embargo, una de las lesiones observadas de manera constante en un alto porcentaje de las células, fue la pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática, alterando su morfología (**Figura 14**) y dificultando así la definición del detalle celular, permitiendo la salida del contenido citoplasmático al exterior de esta. El citoplasma de estas células, se caracterizó por la falta de organelos, en su lugar, existían abundantes vacuolas de diferentes tamaños sin contenido en su interior (**Figura 15**).

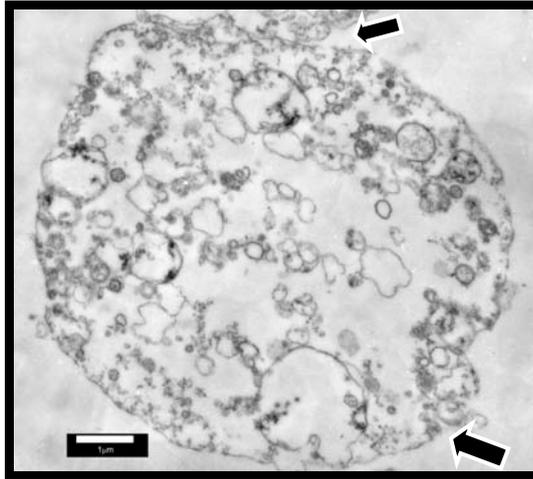


Figura 14: Célula del grupo de tejido pulmonar. Se muestra la pérdida en la continuidad de las membranas (Flechas negras) y la abundante presencia de vacuolas citoplasmáticas.

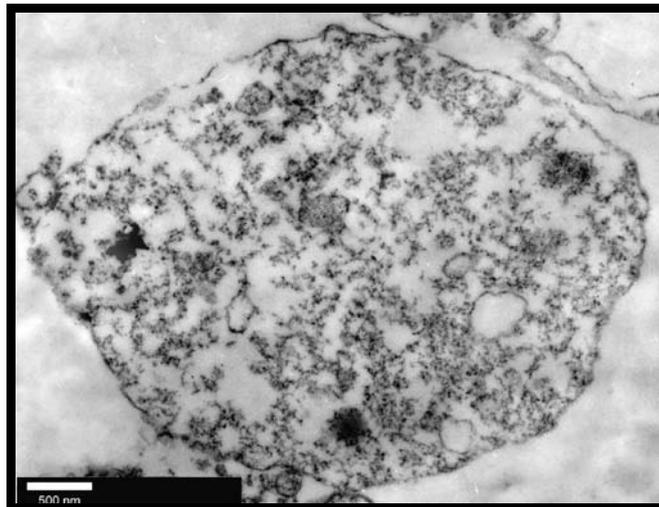


Figura 15: Célula del grupo de tejido pulmonar. Se evidencia la ausencia de organelos y núcleo en citoplasma y el aspecto grumoso del mismo.

✓ **Grupo con 800 μg de MVs:**

A diferencia del grupo anterior donde las células se encontraron completamente desintegradas. En este grupo se observaron células completas, con núcleos con cromatina condensada, con la membrana citoplasmática y nuclear intactas (**Figura 16**). Una característica muy frecuentemente encontrada fue la ausencia de organelos en su citoplasma, lo que indicaba gran daño celular, y en lugar de estos la presencia de gran cantidad de lisosomas de diferentes diámetros (**Figura 16**). En el entendido de que se

observaron diferentes tipos celulares dada las características del tejido, se llegaron a observar células que presentaron prolongaciones que se proyectaban a partir de su membrana citoplasmática.

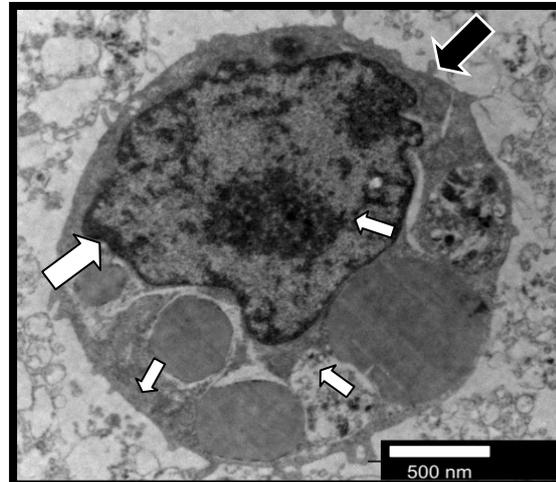


Figura 16: Microfotografía del grupo de tejido pulmonar. En esta imagen se observa la integridad de la membrana nuclear (flecha blanca grande), la continuidad de la membrana citoplasmática (flecha negra) y la presencia de lisosomas de gran tamaño en el citoplasma (flechas blancas pequeñas).

✓ **Grupo con 1200 µg de MVs:**

Muestra no analizable, debido a la marcada destrucción celular asociada al proceso de obtención y posteriormente su extracción de las placas de cultivo.

C. MACRÓFAGOS ALVEOLARES

✓ **Grupo control:**

En este grupo de células se observaron importantes cambios estructurales tanto a nivel nuclear como citoplasmático. Se hallaron células con completa pérdida de núcleo (**Figura 17**) y en algunos casos en los que aun se observaba algo de cromatina, esta se encontraba completamente fragmentada. A nivel citoplasmático se hizo evidente la alteración ya que este se observaba de aspecto grumoso y con nula presencia de organelos (**Figura 17**). Únicamente, se apreció cierta cantidad de lisosomas en algunas de las células y vesículas fagosómicas que contenían restos celulares (**Figura 17 y 18**).

Este tipo celular presentó una mayor sensibilidad al manejo en general, dado que se observaron células que conservaban sus características morfológicas celulares con moderada alteración.

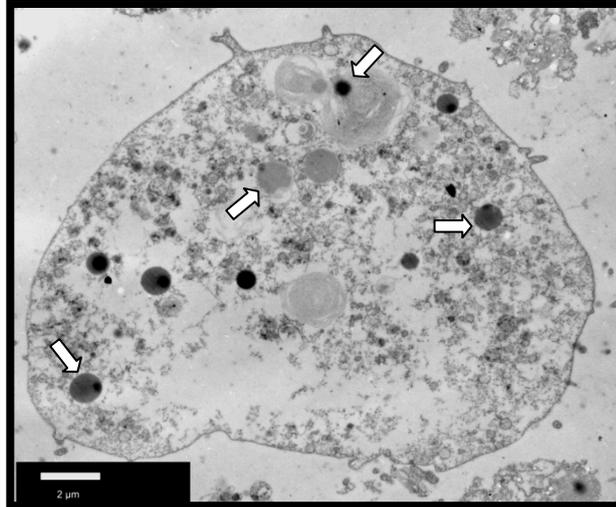


Figura 17: Microfotografía de macrófago alveolar. En la imagen se muestra la pérdida de núcleo de la célula, la ausencia de organelos y la presencia de gran cantidad de lisosomas de diferentes diámetros en su lugar (flechas blancas).

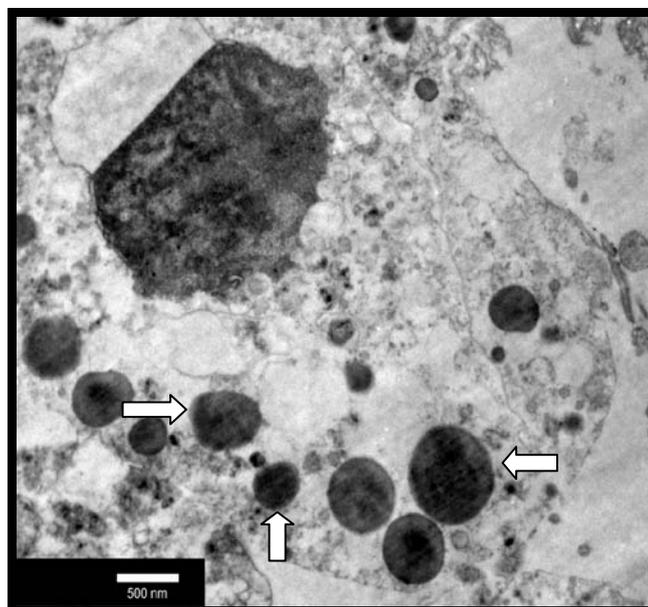


Figura 18: Microfotografía de macrófago alveolar del grupo control. En la foto se evidencia la presencia de lisosomas en el citoplasma de la célula (Flechas blancas).

✓ **Grupo con Concanavalin A:**

La muestra se detectó contaminada en el momento del procesamiento (momento de incubación) por lo que no se puede hacer un análisis de la misma, ya que las características morfológicas observadas en las células pueden deberse a las bacterias y no al tratamiento con las MVs.

✓ **Grupo con 400 µg de MVs:**

En este grupo celular se encontraron células que en su mayoría a nivel nuclear desarrollaron diferentes patrones de cromatina que sugerían picnosis (**Figura 19**). Por lo que se concluye que las células estaban ya en un proceso de necrosis, se observó una ligera pérdida de continuidad en su membrana citoplasmática con salida de contenido hacia el exterior. Así mismo, se observó que el citoplasma tenía un aspecto grumoso y con una gran cantidad de vacuolas en su interior. De la misma manera se observó gran cantidad de zonas vacías con ausencia de organelos (**Figura 20**).

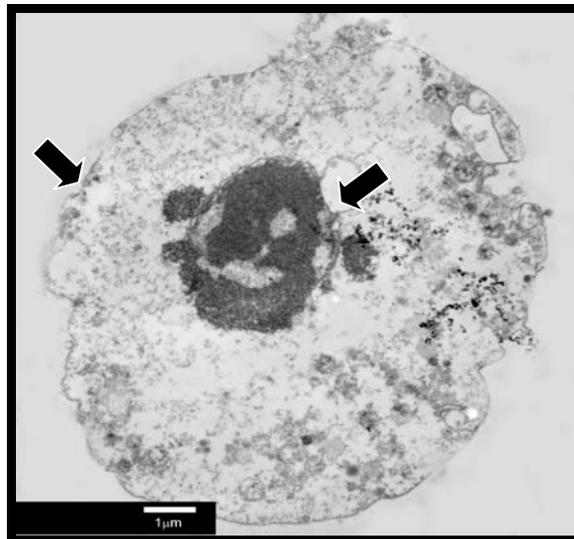


Figura 19: Microfotografía de un Macrófago alveolar. En esta célula se observa la retracción del núcleo, pérdida en la continuidad de sus membranas (flechas negras) y citoplasma grumoso.

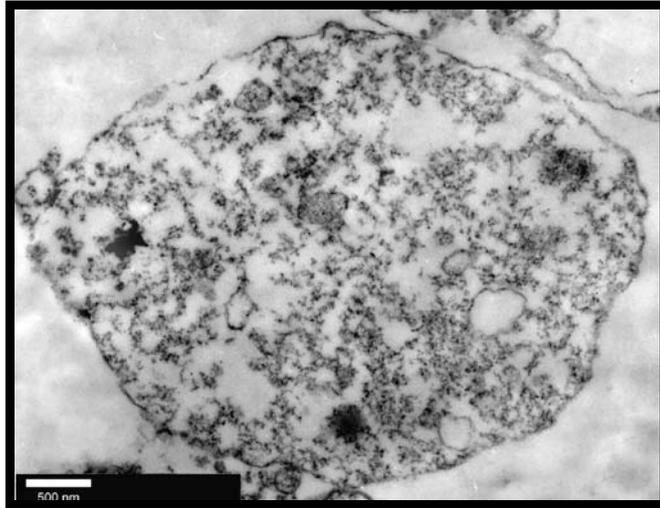


Figura 20: Célula del parénquima pulmonar del grupo de 400 µg de MVs de *M. haemolytica* A₂. Se evidencia la ausencia de organelos y núcleo en citoplasma y el aspecto grumoso del mismo.

✓ **Grupo con 800 µg de MVs:**

Este grupo al igual que el anterior presentó células con daño severo en sus membranas citoplasmáticas y nucleares, con un daño de aproximadamente un 50% de la totalidad de la membrana. Se observó retracción nuclear con marcada condensación de cromatina que sugería picnosis (**Figura 21**). En otros casos las células carecían de contenido citoplasmático presentando básicamente vacuolas de diferentes diámetros y no se observó la presencia de organelos (**Figura 22**). Como se observó en los grupos anteriores de este mismo tipo celular se presentó salida de contenido tanto nuclear como citoplasmático hacia el exterior de sus respectivas membranas. Cabe mencionar que también se encontró la presencia de núcleos libres lo que sugiere un mal manejo de las células durante el experimento.

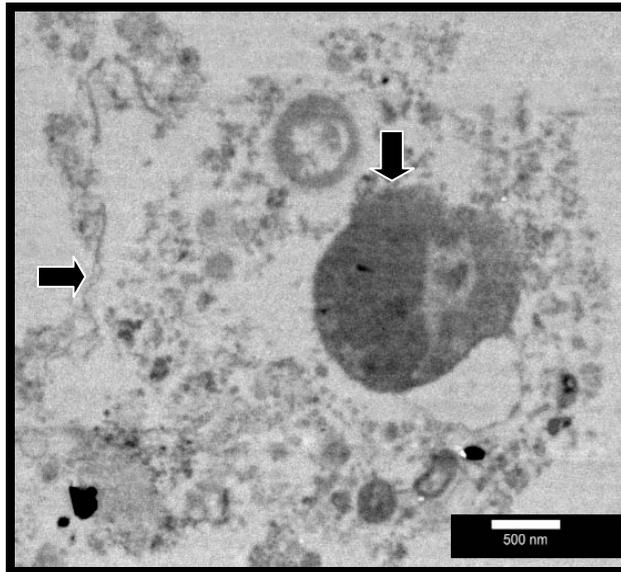


Figura 21: Microfotografía de un macrófago alveolar. Se observa la pérdida en la integridad de ambas membranas, citoplasmática y nuclear (Flechas negras), así como retracción del núcleo sugeriendo de picnosis.

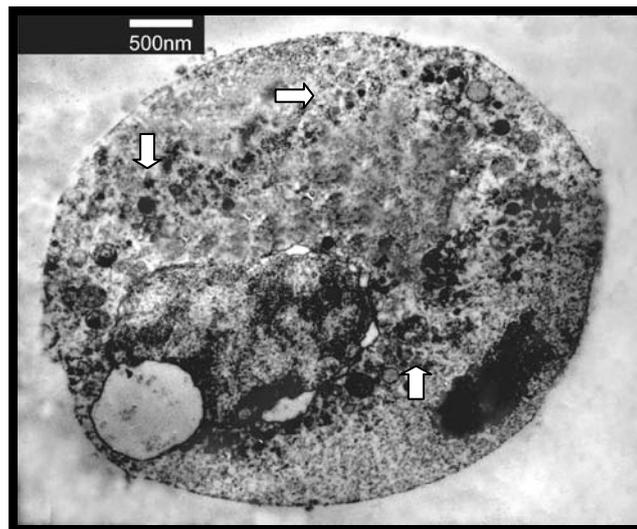


Figura 22: Microfotografía de Macrófago alveolar. Se muestra la ausencia de contenido citoplasmático y en su lugar gran cantidad de vacuolas (Flechas blancas).

✓ **Grupo con 1200 µg de MVs:**

La muestra se detectó contaminada al momento del procesamiento por lo que no se puede hacer un análisis de la misma ya que las características morfológicas observadas en las células pueden deberse a estas y no al tratamiento con las MVs.

VI.2.2. Evaluación de los diferentes tipos celulares según el grado de lesión observada

En el **Cuadro 1**, se desglosa de manera detallada la correlación, entre las características evaluadas en los variados tipos celulares y las diferentes concentraciones de MVs de *M. haemolytica*.

Cuadro 1. Evaluación de los diferentes tipos celulares.

Tipo celular/ Características		Citoplasmáticas		Nucleares			
		Integridad de la membrana	Presencia de vacuolas	Integridad de la membrana	Tipo de cromatina		
					Condensada (Picnóticos)	Dispersa (Fragmentada)	Sin núcleo (Cariolisis)
Linfocitos tisulares	LQ- Ctl	-	-	-	-	-	-
	LQ- Con A	-	-	-	-	-	-
	LQ- 400 µg MVs	-	+	+	-	-	-
	LQ- 800 µg MVs	+	++	+	-	-	-
	LQ- 1200 µg MVs	+	-	+	-	-	-
Tejido Pulmonar	TP- Ctl	+	+++	+++	-	-	+
	TP- Con A	*	*	*	*	*	*
	TP- 400 µg MVs	++	+++	+++		-	+++
	TP- 800 µg M	+	+++	-	++	-	-
	TP- 1200 µg MVs	*	*	*	*	*	*
Macrófagos alveolares	LBA- Ctl	-	+	++		++	+
	LBA- Con A	*	*	*	*	*	*
	LBA- 400 µg MVs	++	+	++	++	-	+
	LBA- 800 µg MVs	++	+	+++	+++	-	+
	LBA- 1200 µg MVs	*	*	*	*	*	*

(-) : Sin alteración (0)

(+) : Leve (1)

(++) : Moderada (2)

(+++) : Severa (3)

Con A: Concanavalina A

Ctl: Grupo Control

MVs: Microvesículas de *M. haemolytica* A2

* : Muestra contaminada o insuficiente

VI.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos en el **Cuadro 1** se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion XV Version 15.1.02. El experimento se hizo por triplicado y de los datos de cada una de las características, se obtuvo una media (MX) y de esta, una desviación estándar (ES). Posteriormente se asignó una literal (LT: a, b y c) a cada uno de los tratamientos (CTL, Con A, 400 µg, 800 µg y 1200 µg) en los diferentes grupos, que refería el grado de lesión, similitudes y diferencias entre los mismos (**Tabla 1, 2, 3**). Los valores se interpretaron del mismo modo que el **Cuadro 1** por lo que van desde 0 que se considera sin lesión, hasta 3 que es una lesión severa.

A. LINFOCITOS

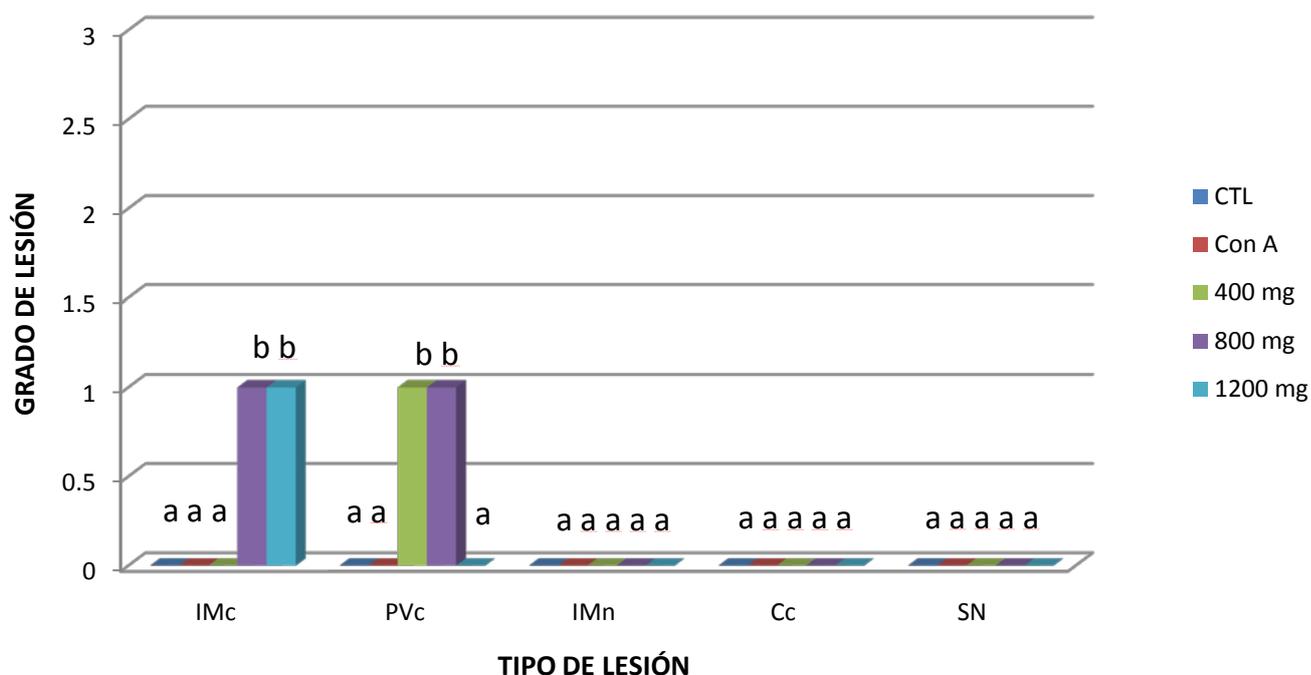
Tabla 1: Análisis estadístico de la evaluación de los diferentes tratamientos con Mvs de *M. haemolytica* A₂ en linfocitos.

Tratamiento	Linfocitos														
	IMc			PVc			IMn			Cc			SN		
	Mx	ES	LT	Mx	ES	LT	Mx	ES	LT	Mx	ES	LT	Mx	ES	LT
CTL	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a	0	*	a	0	*	a
Con A	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a	0	*	a	0	*	a
400 mg	0	±0	a	1	±0	b	1	±0	b	0	*	a	0	*	a
800 mg	1	±0	b	2	±0	c	1	±0	b	0	*	a	0	*	a
1200 mg	1	±0	b	0	±0	a	1	±0	b	0	*	a	0	*	a

Tabla 1: IMc: Integridad de la membrana citoplasmática; PVc: Presencia de vacuolas citoplasmáticas; IMn: Integridad de la membrana nuclear, Cc: Cromatina condensada; SN: Sin núcleo. Mx: Media; ES: Error estándar; LT: Literal. *: En este caso todos los valores fueron cero por lo que el programa estadístico no pudo arrojar un error estándar.

Con los datos obtenidos en el análisis estadístico (**Tabla 1**), se realizó una gráfica (**Gráfica 1**) en la que se muestra la correlación entre el tipo de lesión (IMc, PVc, IMn, CC y SN) con el grado de la misma. En este primer grupo se observó que en general no existió daño celular. Sin embargo, las células sometidas a las concentraciones más altas de MVs (800 y 1200 μg) desarrollaron un ligero deterioro en la continuidad de la membrana citoplasmática. Así mismo, en las concentraciones de 400 y 800 μg de MVs se observó moderada presencia de vesículas de características fagosómicas.

Gráfica 1. Correlación entre el tipo y grado de lesión evaluados en los diferentes tratamientos en linfocitos



Gráfica 1: CTL: Control; Con A: Concanavalin A; 400 μg ; 800 μg ; 1200 μg : Concentración de MVs de *M. haemolytica* A₂.

B. MACRÓFAGOS ALVEOLARES

La **Tabla 2**, muestra los resultados obtenidos del grupo de los macrófagos alveolares, al igual que en el del grupo anterior se muestran las MX, el ES y las LT dadas a cada grupo.

Tabla 2: Análisis estadístico de la evaluación de los diferentes tratamientos con Mvs de *M. haemolytica* A₂ en macrófagos alveolares.

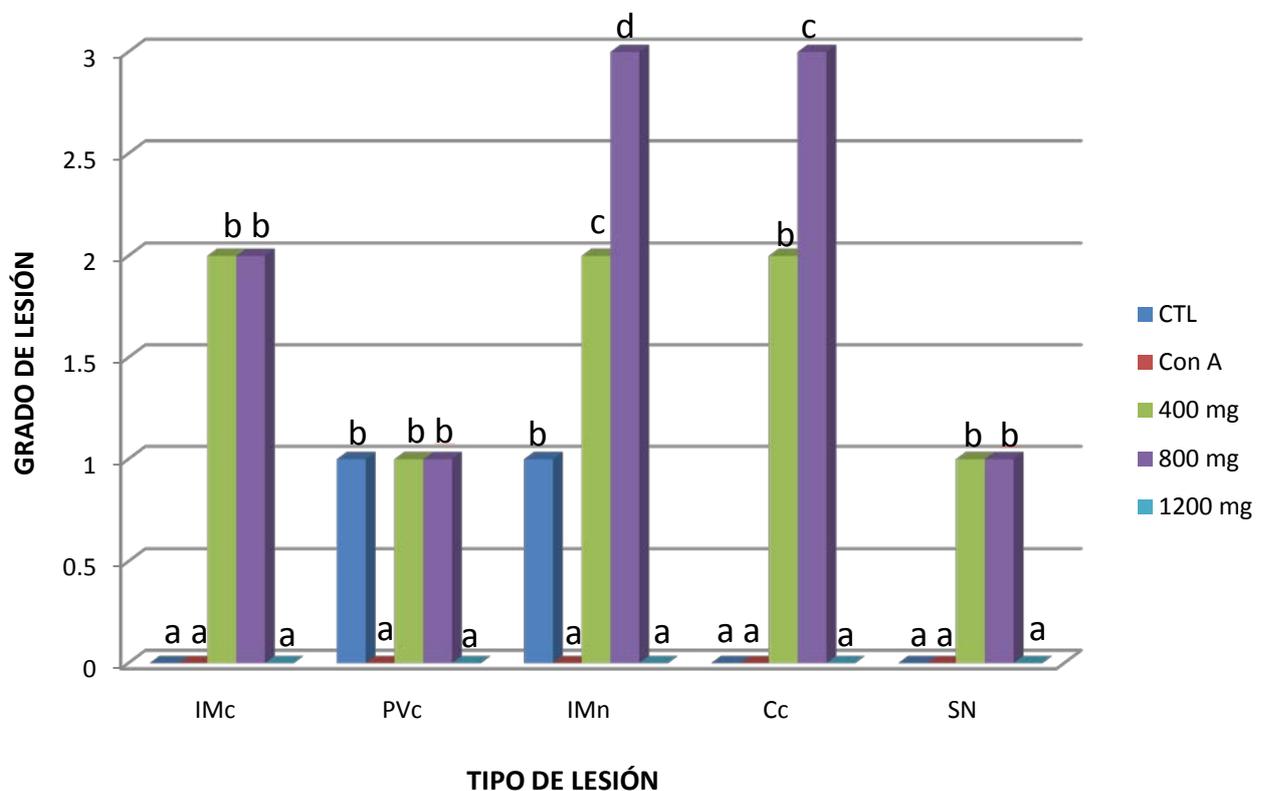
Tto	Macrófagos alveolares														
	IMc			PVc			IMn			Cc			SN		
	Mx	ES	LT	Mx	ES	LT	Mx	ES	LT	Mx	ES	LT	Mx	ES	LT
CTL	0	±0	a	1	±0	b	2	±0	b	0	±0	a	1	±0	b
Con A	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a
400 mg	2	±0	b	1	±0	b	2	±0	b	2	±0	b	1	±0	b
800 mg	2	±0	b	1	±0	b	3	±0	c	3	±0	c	1	±0	b
1200 mg	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a

Tabla 2: IMc: Integridad de la membrana citoplasmática; PVc: Presencia de vacuolas citoplasmáticas; IMn: Integridad de la membrana nuclear Cc: Cromatina condensada; SN: Sin núcleo. Mx: Media; ES: Error estándar; LT: Literal. *: El programa estadístico requiere de datos para poder arrojar un valor, pero en este caso todos los valores fueron 0, lo que indicaba que no había daño celular, por lo que no se pudo obtener un error estándar.

La **Gráfica 2** muestra los resultados del grado de lesión en los macrófagos alveolares. En este grupo celular, a diferencia del anterior, hay gran variedad de lesiones según la concentración de MVs a las que fueron expuestas, pero particularmente, el grupo tratado con Concanavalin A y el expuesto a 1200 µg de MVs, se comportaron de manera similar, es decir en ninguno de los dos grupos se presentó daño tanto a nivel nuclear como citoplasmático. Sin embargo, si se observaron características que indicaron activación celular, como aumento en el tamaño y pleomorfismo celular, mayor presencia de organelos en citoplasma, y núcleos con cromatina laxa.

Otro hallazgo constante en este tipo celular, fue el hecho de que los grupos de 400 y 800 µg de MVs presentaron lesiones similares, tales como, pérdida de la continuidad de la membrana tanto citoplasmática como nuclear, ligera presencia de vacuolas en su citoplasma, condensación de cromatina y en algunos casos pérdida total del núcleo. Cabe mencionar que también el grupo control, presentó ligera lesiones por lo que las características observadas en este grupo en general podrían atribuirse al manejo durante la fijación para la microscopía electrónica.

Gráfica 2: Correlación entre el tipo y grado de lesión evaluado en los diferentes tratamientos en macrófagos alveolares



Gráfica 2: CTL: Control; Con A: Concanavalin A; 400 µg; 800 µg; 1200 µg: Concentración de MVs de *M. haemolytica* A₂.

C. TEJIDO PULMONAR

Por último se muestra la **Tabla 3** con los resultados correspondientes al tejido pulmonar, obtenidos del análisis estadístico.

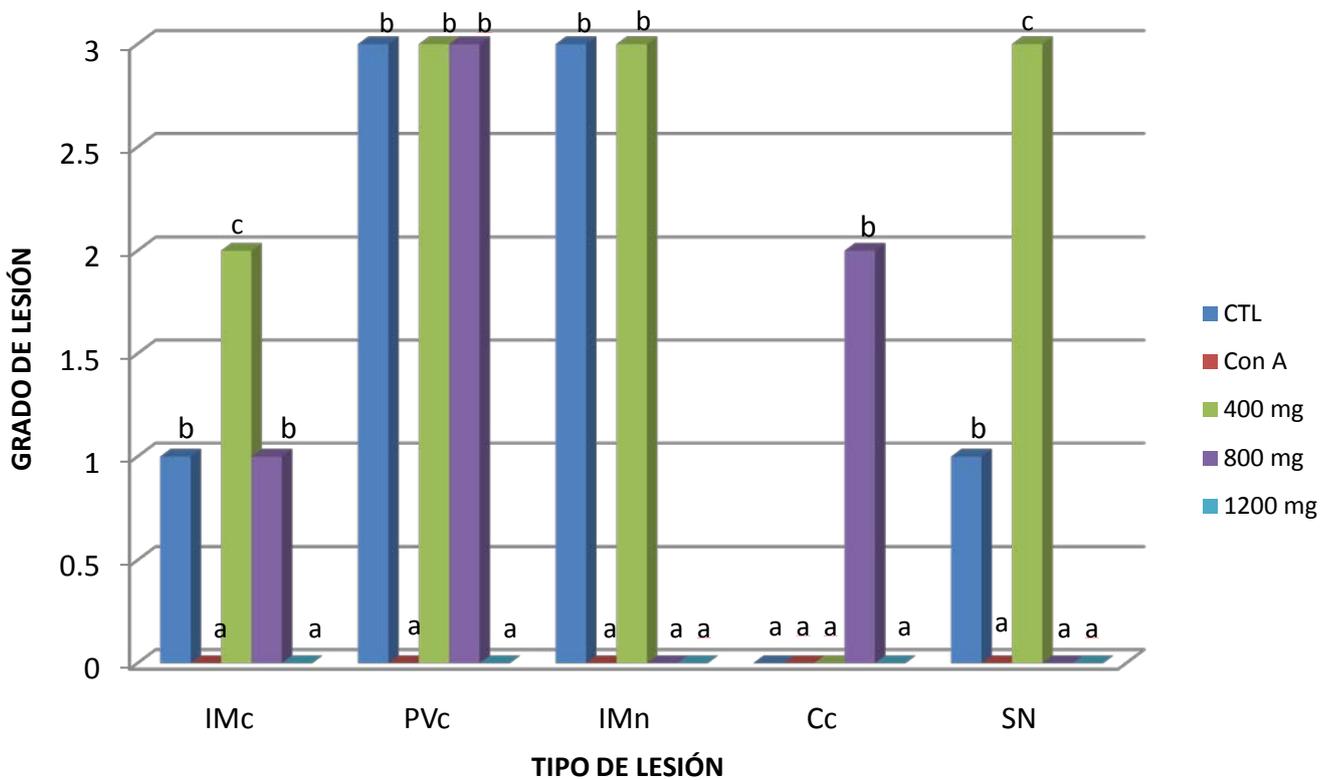
Tabla 3: Análisis estadístico de la evaluación de los diferentes tratamientos con MVs de *M. haemolytica* A₂ en células de tejido pulmonar.

Tto	Tejido Pulmonar														
	IMc			Pvc			IMn			Cc			SN		
	Mx	ES	LT	Mx	ES	LT	Mx	ES	LT	Mx	ES	LT	Mx	ES	LT
CTL	1	±0	b	3	±0	b	3	±0	b	0	±0	a	1	±0	b
Con A	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a
400 mg	2	±0	c	3	±0	b	3	±0	b	0	±0	a	3	±0	c
800 mg	1	±0	b	3	±0	b	0	±0	a	2	±0	b	0	±0	a
1200 mg	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a	0	±0	a

Tabla 3: IMc: Integridad de la membrana citoplasmática; Pvc: Presencia de vacuolas citoplasmáticas; IMn: Integridad de la membrana nuclear, Cc: Cromatina condensada; SN: Sin núcleo. Mx: Media; ES: Error estándar; LT: Literal.

Con los datos que se obtuvieron del análisis se realizó la **Gráfica 3**, que a continuación se presenta.

Gráfica 3: Correlación entre tipo y grado de lesión de los diferentes tratamientos en tejido pulmonar



Gráfica 3: Correlación entre el tipo y grado de lesión evaluados en los diferentes tratamientos en linfocitos tisulares. CTL: Control; Con A: Concanavalin A; 400 µg; 800 µg; 1200 µg: Concentración de MVs de *M. haemolytica* A₂.

En este grupo, se observó mayor lesión, el daño en las células fue evidente, a diferencia del grupo de linfocitos tisulares, en la mayoría de los grupos existió pérdida de la continuidad de la membrana nuclear y citoplasmática, además de la condensación del núcleo en algunas de las células y la pérdida completa de este en otras. En todos los tratamientos e incluso en el grupo control se observó gran cantidad de vacuolas en citoplasma, por el tipo de tejido se observó gran variedad celular pero en su mayoría estas estaban completamente destruidas y como se puede observar en la **Gráfica 3**, fue el grupo que presentó mayor susceptibilidad a todos los manejos dados a las células.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Todas las bacterias Gram negativas producen MVs durante cualquier fase de crecimiento. Por las características que conllevan a su formación, estas conservan constitutivamente elementos de la membrana externa, que incluyen proteínas, LPS, ácido murámico, cápsula y fimbrias, además de que al momento de su formación algunas proteínas circulantes en el periplasma como la LKT, enzimas y en ocasiones fragmentos de ADN extranuclear, pueden trasladarse hacia la superficie y verse encapsuladas hacia el interior de éstas²⁹. Por lo tanto, las MVs arrastran durante su proceso de formación, antígenos que caracterizan a la bacteria completa pero en menor escala. Estas estructuras son morfológicamente esféricas y van desde los 50 hasta los 250 nm de diámetro³⁰.

En el 2007, González y col., caracterizaron las MVs de *M. haemolytica* A₂. En donde se determinaron, algunos de los principales antígenos (LPS, LKT, PME y DNA) de la bacteria, denominados así, por su alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria o bien para generar una adecuada respuesta inmune cuando se exponen al organismo³⁷. Así mismo, en trabajos posteriores del mismo año, las MVs de *M. haemolytica* A₂, han demostrado ser potenciales inmunógenos al ser utilizadas como vacuna en ovinos jóvenes aplicada por diferentes vías. Los animales vacunados por vía intranasal y vía intramuscular resultaron libres del desarrollo de lesiones neumónicas características de la enfermedad al ser desafiados experimentalmente con una cepa virulenta de campo del mismo serotipo³².

En el presente trabajo se evaluaron cultivos celulares de macrófagos alveolares, linfocitos tisulares y células epiteliales de tejido pulmonar expuestas a diferentes concentraciones de MVs (400, 800 y 1200 µg) de *M. haemolytica* A₂ durante 72 h para posteriormente evaluar los cambios estructurales que sufrieron éstas, mediante microscopía electrónica.

Una manera para determinar la activación celular es cuantificando la producción de interleucinas a partir del sobrenadante de cultivo celular que ha sido sometido previamente a la presencia de un antígeno. Sin embargo, por microscopía

electrónica la evaluación de la activación de las mismas, se realiza mediante inmunomarcaje. Algunos autores mencionan, que las células activadas se modifican morfológicamente, aumentando su tamaño y número de organelos que mantienen la actividad metabólica en cuestión ^{43, 44, 45}. En el presente trabajo, se observó mediante microscopía electrónica un aumento constante en el número de lisosomas y mitocondrias, presencia de cromatina de tipo laxa a nivel nuclear y mayor pleomorfismo celular en el grupo de macrófagos sometidos a la presencia de diferentes concentraciones de MVs de *M. haemolytica* A2. Dichas características morfológicas observadas sugieren activación de las mismas.

En el 2004, Leite y col., demostraron que polimorfonucleares de bovino (PMNs) incubados en medio con células mononucleares de sangre periférica previamente infectadas con Herpes virus Bovino-1 (BHV-1), presentaron un aumento en la expresión de β 2-Integrina CD11a/CD18 (LFA-1), cuando este medio fue pre-incubado con anti IL-1 β (Mab), antes de añadir los PMNs, lo cual sugiere que la previa infección con BHV-1, y la liberación de IL-1 β y quizás otras citocinas inflamatorias, puedan estimular la activación de la LFA-1 en los PMNs de bovino, mejorando así la adhesión y los efectos biológicos de la LKT de *M. haemolytica* A1⁴⁶.

Sangeeta Budhia y col., en el 2005, describieron por primera vez la dinámica de la expresión de las citocinas IL-1 β , IL-12p40 y TNF α , en células dendríticas y macrófagos alveolares incubados con LPS de *E. coli*. Estos autores realizaron ensayos en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con Concanavalin A (PMBCs), células dendríticas derivadas de monocitos estimulados con LPS (MoDC) y macrófagos derivados de monocitos sanguíneos (MDM \emptyset), identificaron que la expresión de mRNA de dichas citocinas, excepto de IL-12p40, aumentaba considerablemente a las 3 y 6 horas post-incubación con el LPS, en los MDM \emptyset y en PMBCs ³⁶.

En el 2000, Sun y col. mencionan que linfocitos incubados a altas concentraciones de LKT (1.0 U toxica/ml), presentaban ruptura de membrana citoplasmática y nuclear, así como inchazón y lisis mitocondrial. Los linfocitos expuestos a bajas concentraciones de la toxina (0.1 U toxicas/ml) muestran

fragmentación del DNA en un 80%. Estas células presentan vacuolización citoplasmática, condensación de cromatina, fragmentación nuclear y presencia de cuerpos apoptóticos. Además, de que linfocitos expuestos a muy bajas concentraciones de la LKT (0.001 U tóxicas/ml) y pro-LKT no presentan cambios ultraestructurales aparentes ⁴⁷.

En el 2003, Salim y col., realizaron estudios con MVs de *Helicobacter pylori*, en donde se evaluó como las MVs de la bacteria modulan la proliferación de células epiteliales gástricas e inducen la producción de Interleucina-8 (IL-8) en las mismas. Se observó que las MVs, en concentraciones mínimas de 50 ng / pozo inducen un aumento en la tasa de proliferación celular. Mientras que, cuando se someten a niveles más altos (5 µg/ pozo), la tasa de proliferación disminuye considerablemente. Así mismo, en este trabajo se analizó la toxicidad de las MVs en concentraciones que iban de los 10 hasta los 50 µg/ ml en cultivo celular, observándose un mayor porcentaje de muerte celular, particularmente en concentraciones de 50 µg/ ml. En esta misma concentración, fue evidente la vacuolización citoplasmática a las 24 h post-exposición, específicamente con MVs de una cepa toxigénica. Finalmente se observó, que a concentraciones que iban de los 50 ng hasta los 5 µg de MVs, las células no presentaron aumento significativo en los niveles de producción de IL-8, a diferencia de cuando éstas, fueron expuestas a 50 µg de MVs ⁴⁸.

En el presente trabajo, la vacuolización a nivel citoplasmático fue constantemente observada, sobre todo en las células del tejido pulmonar, en casi todas las concentraciones de MVs a las que se les expuso, excepto en los grupos de 1200 µg de MVs y en el de Concanavalin A, en donde particularmente se observó, integridad en las diferentes estructuras celulares. Cabe señalar, que en este tipo celular se presentó el mayor porcentaje de muerte, dadas las características observadas mediante microscopía electrónica, las cuales incluían: pérdida de la integridad de membranas nucleares y citoplasmáticas, ausencia de organelos, presencia de gran cantidad de vesículas en citoplasma y ausencia de núcleos en la mayoría de las células. Es importante mencionar que no se puede descartar, que estas lesiones podrían haberse desarrollado por el manejo al que fueron sometidas durante el método de extracción ⁴¹ y posterior fijación ⁴², tanto el

que se realizó a partir de los tejidos correspondientes para montar los cultivos (parénquima pulmonar y de nódulo linfoide), como de los cultivos propiamente.

En otro estudio, realizado en el 2005, por Kouokam y col., en células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de MVs (7, 10 y 60 μg) y a diferentes cepas de *Escherichia coli* uropatógena (J96, J96 Δhns mutant, RZ422 y LE392/pISS391) enriquecidas con Factor citotóxico necrotizante tipo 1 (CNF1) activo, las cuales desarrollaron alargamiento y multinucleación a las 48 h post-incubación en todos los casos ⁴⁹.

Las cantidades de MVs a las que se sometió esta línea celular (células HeLa), fueron muy bajas en comparación a las concentraciones utilizadas en este trabajo. En donde se observó de manera general, que el grupo que presentó moderados cambios estructurales fue el de los macrófagos alveolares y en las células del tejido pulmonar, se desarrolló el mayor daño a nivel celular. Así mismo, fue evidente que el grupo de linfocitos tisulares, no desarrollaron características de lesión celular y si por el contrario de activación. Este tipo celular, interactúa en la respuesta que monta el organismo ante la invasión de *M. haemolytica*, a nivel pulmonar.

En el presente trabajo, los linfocitos expuestos a las diferentes concentraciones de MVs, no desarrollaron daño celular en ninguno de los casos. Estas células presentaron constante integridad celular y solo se observó ligera activación en la concentración más alta (1200 μg de MVs), lo cual correspondió aumento en el número y tamaño de organelos en citoplasma, cromatina de tipo laxo, aumento en el tamaño celular y pleomorfismo celular en algunos de los casos, al igual que el grupo control positivo estimulado con Con A. Estos hallazgos sugieren que las MVs de *M. haemolytica* A2, así como los antígenos que estas acarrean, no afectan este tipo celular y si por el contrario, podrían estar induciendo activación de las mismas.

Este documento, es el primer reporte del efecto de las MVs de *M. haemolytica* A2, en cultivo celular de diferentes tipos celulares de ovino, que interactúan con la bacteria durante su patogenia en el organismo. La mayoría de

los estudios relacionados con MVs, corresponden a géneros bacterianos de interés humano. A nivel de medicina veterinaria, pocos son los géneros bacterianos en donde se ha profundizado en el tema (*Actinobacillus pleuropneumoniae*⁴⁰, *Actinobacillus seminis*⁴¹).

Otro de los tipos celulares que se evaluó, correspondió a los macrófagos alveolares, los cuales se obtuvieron mediante LBA. Cabe señalar, que este fue uno de los tipos celulares moderadamente susceptibles, tanto al manejo, como al tratamiento. En estas células se observaron lesiones que indicaron mediana susceptibilidad, a las diferentes concentraciones de MVs de *M. haemolytica* A2. Los grupos sometidos a concentraciones de 400 y 800 µg de MVs, fueron los que desarrollaron un mayor grado de lesión, determinado por la severidad de las alteraciones tanto celulares como nucleares evaluadas en este estudio.

Una de las células principalmente afectadas por la LKT que libera *M. haemolytica* A₂ durante su fase logarítmico (*log*), la cual corresponde a la invasión propiamente de ésta al pulmón, son los macrófagos alveolares. Considerados, la primer línea de defensa a nivel pulmonar y la células blanco de la bacteria. La LKT, es una proteína de 104 KDa que pertenece a la familia de toxinas RTX, se libera durante la fase de crecimiento *log* de la bacteria y tiene la habilidad de lisar eritrocitos de rumiantes. Las bajas concentraciones de LKT, producen la activación de leucocitos y las altas concentraciones la muerte de los mismos por apoptosis, disminuyendo la regulación del Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (CMH II), y las proteínas en la superficie del macrófago, afectando así su habilidad para presentar antígenos⁹. Sin embargo, puede generar activación de los MA, induciendo la expresión de citocinas (IL1, TNF-α y LTB4), que tiene efecto de quimiotáxis y activación de PMN (neutrófilos) en la luz de los alveolos, así como de activación de MA-IV, los cuales responden aumentando su actividad procoagulante en la luz del capilar alveolar y liberando radicales libres de oxígeno (OH⁺) y proteasas, que dañan el endotelio vascular del capilar pulmonar, generando hemorragia o bien activación de la cascada de la coagulación por la vía intrínseca (Fact XII-Hageman) .

Por último, se analizaron las células de tejido pulmonar, el cual fue el grupo que desarrollo una mayor cantidad de daño. Las células se observaron destruidas en un 80% aproximadamente, siendo constante en los diferentes tratamientos, incluyendo el grupo control negativo. Este hecho confirma que los métodos de obtención y fijación celular, influyeron de manera determinante en el desarrollo del alto índice de mortalidad celular. Aunado a esto, cabe señalar que el grupo sometido a 1200 µg de MVs, particularmente, se observó que un bajo porcentaje de células que conservaron estructuralmente intactas membrana citoplasmática, membrana nuclear y organelos en general.

El parénquima pulmonar, arrastró diferentes tipos celulares, desde epiteliales, de sostén y de matriz extracelular. Sin embargo, las células principalmente observadas en el cultivo y que se adhirieron con mayor avidez al fondo de la placa, fueron principalmente de epitelio respiratorio (bronquios y bronquiolos). Por lo que, los hallazgos observados mediante microscopía electrónica mostraron un bajo porcentaje de células viables en los diferentes tratamientos, indicando por lo tanto baja resistencia del parénquima pulmonar a la presencia de las MVs de *M. haemolytica* A₂. Es importante considerar que el método utilizado en este ensayo, pudo haber dañado un alto porcentaje este tejido. En futuras evaluaciones debemos considerar utilizar un método alternativo para el manejo, menos agresivo para este tipo de tejido.

Evaluar el efecto de las MVs de *M. haemolytica* A₂ en células del parénquima pulmonar nos permitiría establecer el grado de lesión que inducen dichas estructuras, cuando *M. haemolytica* invade pulmón durante la patogenia de la misma. Se sabe que las MVs de las bacterias Gram negativas liberan MVs previa invasión a su órgano blanco, con la finalidad de establecer nichos que permitan a las bacterias colonizar con mayor avidez, además de fungir como distractores del sistema inmune. Estas características, confieren ventaja al patógeno para establecerse con menor retraso en los tejidos. De tal manera que, si las MVs de *M. haemolytica* no lesionan células de parénquima pulmonar, podrían exponerse entonces, en altas concentraciones, en la mucosa del tracto respiratorio superior induciendo una adecuada respuesta inmune local, sin lesión asociada del tejido.

Por otro lado, se observó un bajo porcentaje (5% aproximadamente) de células con características de apoptosis (vacuolización de organelos y fragmentación nuclear, por ejemplo), lo cual se considero podría estar asociado al método de obtención y procesamiento para la microscopia electrónica, por lo que no se estableció como un dato representativo en la evaluación.

En general, a 1200 µg MVs de *M. haemolytica* A₂, se indujo activación en los diferentes tipos celulares evaluados. Esto sugiere que la concentración de antígenos acarreados por las MVs a este nivel, no son potencialmente virulentos, como para inducir muerte celular y si, activación de estas. Por lo que, en futuras evaluaciones podría considerarse aumentar la dosis de MVs a evaluar y correlacionarlo con la determinación de interleucinas producidas tanto en los diferentes tipos celulares, como en los tratamientos empleados.

Las MVs de *M. haemolytica* A₂, pueden ser utilizadas en altas concentraciones (1200 µg) como biológico para prevenir y controlar la Mannheimiosis neumónica, ya que activan principalmente, linfocitos tisulares, los cuales juegan un papel determinante en la respuesta inflamatoria y muy probablemente, en un tipo de respuesta inmune-celular, que establece el organismo ante la presencia de *M. haemolytica* como saprofita en tracto respiratorio superior y como patógeno secundario a nivel pulmonar.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los linfocitos tisulares en general no desarrollaron características de lesión en presencia de las diferentes concentraciones de MVs de *M. haemolytica* A₂.
2. El grupo de linfocitos tisulares sometidos a 1200 µg de MVs de *M. haemolytica* A₂, desarrollaron características de activación, al igual que el grupo control positivo tratado con Concanavalin A.
3. Los macrófagos alveolares, en general desarrollaron mediana susceptibilidad al tratamiento con las diferentes concentraciones de MVs de *M. haemolytica* A₂.
4. Los macrófagos alveolares expuestos a 1200 µg de MVs de *M. haemolytica* A₂, desarrollaron características de activación.
5. El tejido pulmonar, fue el grupo celular más susceptible al tratamiento con las diferentes concentraciones de MVs de *M. haemolytica* A₂.

IX. ANEXO: SOLUCIONES

Cloruro de Calcio (1 M)

1 M = 147.026

147.026 g de CaCl en 1000 ml de agua destilada

Buffer de corrida (1x) pH 8.3

Glicina 12.05 g

TRIS-BASE 15.1 g

SDS 5.0 g

Agua destilada cbp 500 ml

Ajustar el pH a 8.3

Buffer pH 8.8 (4x)

TRIS 1.5 M 18.165 g

SDS (20%) 2 ml

Agua destilada cbp 100 ml

Ajustar el pH 8.8 antes de aforar y filtrar por 0.45 μm de diámetro (Millipore)

Buffer pH 6.8 (4x)

TRIS 0.5 M 6.055 g

SDS (20%) 2 ml

Agua destilada cbp 100 ml

Ajustar pH 6.8 aforar y filtrar en 0.45 μm de diámetro (Millipore)

Acrilamida-Bisacrilamida

Acrilamida 60 g

Bisacrilamida 1.74 g

Agua desionizada 200 ml

Filtrar por 0.45 μm de diametro (Millipore)

NOTA: La Acrilamida es neurotoxica por lo que al prepararla se debe utilizar guantes, bata, cubrebocas, lentes, mantenerla en cuarto oscuro y refrigeración.

Persulfato de Amonio

Solución 12.5 (w/v)

Persulfato de amonio 1.25 g

Agua desionizada 10 ml

NOTA: Cambiarlo constantemente por que tiende a descomponerse

TEMED

Solución 8.4 (v/v)

TEMED (N, N,N',N' tetrametyl thilendiamina) 0.84 ml

Agua desionizada 9.16 ml

NOTA: Preparar de 20 a 30 ml si se preparan muchos geles, mantener en refrigeración.

PBS (1x)

NaCl 6.5 g

K₂HPO₄ 2.8 g

KH₂PO₄ 0.5 g

Agua desionizada cbp 1000 ml

Ajustar pH a 7.2 - 7.4

PBS Tween-20

Tween- 20 500 µl

PBS 1x 1000 ml

Reactivo de Bradford

Azul de Comassie G 250 100 mg

Etanol 50 ml

Ácido fosfórico 100 ml al 85%

Agua desionizada cbp 1000 ml

NOTA IMPORTANTE: El azul de Comassie se disuelve en el etanol por 2 a 3 horas en agitación y posteriormente se adiciona el ácido fosfórico y se afora con el agua. Finalmente se filtra y está listo para usarse.

Solución salina (0.9%)

NaCl 9.0 g
Agua desionizada 1000 ml

Ajustar pH con NaOH 0.1 M a 7.0 antes de aforar. Alicuotar 100 ml y esterilizar a 20 lb/20 min y guardar a temperatura ambiente.

Azul de Comassie

Azul de Comassie R 250 2.5 g
Metanol al 40% 400 ml
Ácido acético al 7% 70 ml
Aforar a 1000 ml de Agua destilada

NOTA: Primero diluir el Azul de Comassie en el Metanol y posteriormente agregar los demás reactivos dejar en agitación 8 hrs y finalmente filtrar por 0.22 μm de diámetro.

Solución desteñidora I

Metanol al 50% 500 ml
Ácido acético al 10% 100 ml
Agua destilada 400 ml

Solución desteñidora II

Metanol al 5% 50 ml
Ácido acético al 7% 70 ml
Agua destilada cbp 1000 ml

Gelatina (0.5%)

Gelatina 0.5 g
PBS-Tween 20 100 ml

Carbonato de Sodio (50mM)

Na_2CO_3 5.29 g
Agua destilada cbp 1000 ml

Bicarbonato de Sodio (50mM)

NaHCO ₃	4.2 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Solución Carbonato de Sodio-Bicarbonato de Sodio (50 mM)

Se coloca la solución de Carbonato de Sodio 50 mM en un vaso de precipitados y se añade la solución de Bicarbonato de Sodio 50 mM hasta que la combinación de ambas alcance un pH de 9.6 (aproximadamente en una relación de 1:2)

Fosfato de Sodio (0.05 M)

Na ₂ HPO ₄	7.1 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Ácido Cítrico (0.1 M)

Ácido cítrico	29.41 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Buffer Citrato-Fosfato

Se disuelven 2 volúmenes de Fosfato de Sodio 0.05 M en un volumen de Ácido cítrico 0.1 M, y revisar que el pH final de la solución sea ajustado a 4.2

Solución Sustrato

ABTS (Ac.2,2-azino-bis 3-etilbenzotiazolil-6-sulfónico)	137 mg
Buffer Citrato-Fosfato	250 ml

Buffer de corrida 10x

Glicina	144.1 g
TRIS-BASE	30.2 g
SDS	10 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Ajustar pH 8.3

Buffer de muestra 2x (Amortiguador de Laemmli)

TRIS-BASE	1.55 g
SDS	2 g
Glicerol o Glicerina	25 g
Pironina o Azul de metileno	0.02 g
Azul de Bromofenol	

Ajustar el pH a 6.8 y aforar a 100 ml con agua destilada "No filtrar"

β - Mercaptoetanol se adiciona al 10%, es decir por cada ml de buffer de muestra se adiciona 100 μ l de β - Mercaptoetanol

Medio RPMI 160

RPMI 1640	500 ml
L-Glutamina	5.5 ml
Aminoácidos no esenciales	5.5 ml
Piruvato de sodio ($C_3HCO_3.Na$)	5.5 ml
Bicarbonato de Sodio ($NaHCO_3$) al 75%	12 ml

Esterilizar mediante filtración por 0.22 μ m de diámetro.

X. BIBLIOGRAFIA

- 1.- González G. G. A., 2007. Comprendiendo la neumonía bovina producida por *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Virbac Al Día. No. 11
- 2.- Starr E. A., Dan T., Minhas k., Shewen E. P. and Coomber B. L. 2004 Potential Involvement of Gelatinases and Their Inhibitors in *Mannheimia haemolytica* Pneumonia in Cattle. Infect. and Immu. Vol. 72, No. 8. P. 4393-4400
- 3.- Zecchinon L., Fett T., Desmecht D., 2005. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. Vet. Res. 36, p. 133-156
- 4.- Juárez B. F., Trigo T. J. F., Chávez G. G., Vargas G. E. R. 2003. Identificación de agentes virales por Inmunohistoquímica en enfermedades respiratorias de bovinos en corral de engorda. Vet. México 34:1
- 5.- Velázquez Z. A., Martínez B. J., De la Cruz H. I., Snyderlaar H. A., Ramos V. J. 2009. Implementación y aplicación de la Técnica de Inmunohistoquímica para la detección del Virus de Parainfluenza Tipo 3 (PI3) en pulmones de ovinos. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Revista digital Universitaria. Vol. 3. No. 3.
- 6.- Trigo, T. F. J., El virus respiratorio Sincitial bovino en las neumonías de los bovinos y ovinos. Vet. Mex., 14:175-179.
- 7.- Trigo F. J. 1998. Patología del Aparato Respiratorio. Patología Sistémica Veterinaria. 3ª ed. Ed. McGraw-Hill, Interamericana. México D.F. pp.69.
- 8.- López M. A., 2006. Patología del Sistema respiratorio. Colegio Veterinario del Atlántico. Universidad de la Isla del Príncipe Eduardo Cánada.
- 9.- G. Tefera, J. Smola, 2001. *Pasteurella haemolytica* complex of *Pasteurella sensu stricto* as a new genus *Mannheimia*: changes in taxonomy. Vet. Med. 46 p. 119-124.

10.- Kitt T. 1885. Über eine experimentelle, der Rinderseuche ähnliche Infektionskrankheit, Sitzungsber. Ges. Morphol. Physiol. Muenchen 140–168.

11.- Angen O., Mutters R., Caugant D. A., Olsen J. E., Bisgaard M. 1999. Taxonomic relationships of the (*Pasteurella*) haemolytica complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosidal* sp. Nov., *Mannheimia ruminalis* sp. Nov. and *Mannheimia varigena* sp. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 67-86.

12.- Dagmara I. Kisiela and Charles J. Czuprynski. 2008. Identification of *Mannheimia haemolytica* Adhesins Involved in Binding to Bovine Bronchial Epithelial Cells. Infec. Immun. 77 :446-455

13.- Piojan A. C. Infecciones mixtas del Aparato Respiratorio. Ciencia Veterinaria. Vol. 2:216-228.

14.- Sleim R. S. 2005. Review: Major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) Haemolytica* isolated from animal origin. El Cairo; Egypt: Bacteriology Department, Animal Health Research Institute.

15.- Sarah K. H. 2001. Molecular genetic analysis of virulence in *mannheimia (pasteurella) haemolytica*. Frontiers in Bioscience 6, d1128-1150.

16.- Olguin y Bernal. 2007. Complejo respiratorio Bovino. Facultad de Medicina y Veterinaria en línea.

www.fmvzenlinea.fmvz.unam.mx/mod/resource/view.php?inpopup=true&id...

17.- Douglas W. Morck, Merle E. Olson, Stephen D. Acres, Pierre-Yves Daoust and William Costerton. 1989. Presence of Bacterial Glycocalyx and Fimbriae on *Pasteurella haemolytica* in Feedlot Cattle with Pneumonic Pasteurellosis. Vet. Res. 53:167-171.

-
- 18.-** Morck D. W., T.J.G. Raybould, Stephen D. Acres, Lorne A. Babiuk, Joyce Nelligan and J. W. Costerton. 1987. Electron Microscopic Description of Glycocalyx and Fimbriae on the Surface of *Pasteurella haemolytica*-A1. *Vet. Res.* 51:83-88.
- 19.-** Kimura A., Guling P.A., MxCracken G. J. Jr. *et al.* 1985. A minor high-molecular weight outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b is a protective antigen. *Infe. Immun.* 47:253-259.
- 20.-** Conlon J. A., Shewen P.E. ad Lo R. Y. C. 1991. Efficacy of recombinant leukotoxin in protection against pneumonic challenge with live *Pasteurella haemolytica* A1. *Infec. Immun.* 59:587-591.
- 21.-** Squire P.G., Smiley D. W. And Croskell R. B. 1984. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infec. Immun.* 45:667-673.
- 22.-** Iovane G., Galdiero M., Vietello M. And De Martino L. 1998. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins of bovine neutrophils. *FEMS, Immun. Med. Microbiol.* 1:29-36.
- 23.-** Donachie W. 1996. Vaccines against *Pasteurella*. World Association of Microbiologists Immunologists and Specialists in Infection Disease. 14th International Symposium, Edinburgh Annual Scientific Report.
- 24.-** Kyd J. M., Taylor D. and Cripps A. W. 1994. Conservation of immune responses to proteins isolated by preparative polyacrylamide gel electrophoresis from the outer membrane of nontypeable *haemophilus influenzae*. *Infec. And Imm.* 62:5652-5658
- 25.-** McClenahan D., Hellenbrand K., Atapattu D., Aulik N., Carlton D., Kapur A. and Czuprynski C. 2008. Effects of Lipopolysaccharide and *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin on Bovine Lung Microvascular Endothelial Cells and Alveolar Epithelial Cells. *Clinical and vaccine immunology.* Vol. 15, No. 2, p. 338–347.

-
- 26.-** Liu Weiguo, Brayton A. Kelly, Davis C. William, Mansfield Kristin, Lagerquist John, Foreyt William and Srikumaran Subramaniam. 2007. *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica leukotoxin utilizes CD18 as its receptor on bighorn sheep leukocytes*. Journal of Wildlife Diseases. 43(1):75-81.
- 27.-** Davies L. Robert, Whittam S. Thomas and Selander K. Robert. 2001. Sequence Diversity and Molecular Evolution of the Leukotoxin (lktA) Gene in Bovine and Ovine Strains of *Mannheimia(Pasteurella) haemolytica*. Journal of Bacteriology. 183(4): 1394-1404.
- 28.-** Ratchapin S., Girish J. K., Lawrence A. H. and Justus E. D. 2002. Modulation of Gamma Interferon-Induced Major Histocompatibility Complex Class II Gene Expression by *Porphyromonas gingivalis* Membrane Vesicles. Infec. Immnu. 70:1185-1192
- 29.-** Meta J. Kuehn and Nicole C. Kesty. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. Review. Genes & Development. 19:2645-2655.
- 30.-** Terry J. B. 1999. Minireview. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. J. Bacter. 181:4725-4733.
- 31.-** Kadurugamuwa J. I. and T. J. Beveridge. bacteriolytic 1996. Effect of membrane vesicles from *Pseudomonas Aeruginosa* on other bacteria including pathogens: Conceptually new antibiotics journal of bacteriology. Vol. 178, No. 10. p. 2767–2774.
- 32.-** Gonzalez R. C., Tenorio G. V., De la Garza A. M. G., Trigo T. F., 2007. Evaluación y caracterización de microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* SEROTIPO A2 para su posible utilización como vacuna en ovinos. Tesis de Doctorado; UNAM. FES-Cuautitlán.
- 33.-** Marciel M. A. and Highlander K. S. 2001. Use of Operon Fusions in *Mannheimia haemolytica* To Identify Environmental and *cis*-Acting Regulators of Leucotoxin Transcription. Infec. Immun. 69:6231-6239.

-
- 34.-** F. Leite, S. O'Brien, M. J. Sylte, T. Page, D. Atapattu and C.J. Czuprynski. 2002. Inflammatory Cytokines Enhance the Interaction of *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin with Bovine Peripheral Blood Neutrophils In Vitro. *Infec. Immun.* 70.8:4336-4343.
- 35.-** Hernández M. A. Alvarado N. A. 2001. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev. Biomed* 12:272-280.
- 36.-** Sangeeta Budhia, Lisa F. Haring, Ian McConnell, Barbara A. Blacklws. 2006. Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Journal of Immunological Methods.* 309, 160-172.
- 37.-** González R. C., Tenorio G. V., Trigo T. F., Reyes L.M., León S. N., Godínez V. D., de la Garza A. M. 2007. Characterization of Microvesicles of *Mannheimia haemolytica* Serotype A1 (Reference Strain) and Serotype A2 (Field Isolate). *Journal of Animal and Veterinary Advances* Volume: 6 (10): 1172-1182.
- 38.-** Bradford M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- 39.-** Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 40.-** Brogden K. A., Ackermann M. and Huttner M. K. 1998. Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine Bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. *Infection and immunity.* P. 5948–5954 vol. 66, no. 12
- 41.-** Leal Hernández Marisela. 2009. Desarrollo de mutantes virB de *Brucella ovis*, para su estudio en modelo celular. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia. UNAM.

42.- Protocolos Standard. Servicio General de Microscopía Analítica y de Alta Resolución en Biomedicina Servicios Generales de Investigación. Vicerrectorado de Investigación Universidad del País Vasco.

43.- Pérez M. J. 2011. La célula: Lisosomas.

http://www2.uah.es/biologia_celular/LaCelula/Cel9LISO.html

44. Duque C. N.A., Rojas L. M. 2007. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*. Vol. 26. No. 2. 73:86.

45. Allen B. C., Martin J.C. The human alveolar macrophage: Isolation, cultivation *in vitro*, and studies of morphologic and functional characteristics. Cardiovascular Research Institute and the Cancer Research Institute, Department of Medicine, University of California, San Francisco.

46.- Leite F. A. D, Kuckleburg C., Schultz R., Czuprynski C.J. 2006. Incubation of bovine PMNs with conditioned medium from BHV-1 infected peripheral blood mononuclear cells increases their susceptibility to *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Veterinary of Immunopathology*. 103, 187:193.

47.- Sun Y., Kenneth D. C., Ownby C. L., Cudd L., C. R. Clarke, K. Highlander S. 2000. Ultrastructural characterization of apoptosis in bovine lymphocytes exposed to *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Vol. 61. No. 1. Pages 51-56.

48.- Salim y col. 2003. *Helicobacter pylori*. Outer Membrane Vesicles Modulate Proliferation and Interleukin-8 Production by Gastric Epithelial Cells. *Infection and Immunity*. 5660-5675.

49.- Kouokam y col. 2006. Active Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Associated with Outer Membrane Vesicles from Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 2022-2030.