



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Evaluación del efecto de la Leucotoxina (LKT) de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2, secretada a partir de Microvesículas (MVs) en cultivo celular de mononucleares de ovino”.

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

P R E S E N T A:

ELIA RIQUELME ZUBIRÍA

ASESORA:

DRA. CYNTHIA GONZÁLEZ RUÍZ

COASESORA:

DRA. MARISELA LEAL HERNÁNDEZ

México D. F.

2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

Página

RESUMEN 	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Generalidades de la enfermedad	2
1.2. <i>Mannheimia haemolytica</i>	4
1.2.1. Antecedentes de <i>Mannheimia haemolytica</i>	4
1.2.2 Morfología y requerimientos para su desarrollo	8
1.2.3. Morfología colonial	9
1.3. Factores de virulencia.....	9
1.3.1. Leucotoxina.....	10
1.3.1.1. Efectos biológicos producidos por la LKT	11
1.3.1.2. Síntesis y activación de la LKT	14
1.3.1.3. Genes necesarios para la producción y secreción de LKT	14
1.3.1.4. Interacción entre la LKT y las células de defensa del huésped	16
1.3.1.5. β_2 -integrinas como receptores de la LKT	17
1.3.2 Lipopolisacárido.....	18
1.3.3 Proteínas de membrana externa	21
1.3.4 Proteínas de Membrana Externa Reguladas Por Hierro	23
1.4. Microvesículas bacterianas de membrana externa (MVs)	24
1.5 Factores predisponentes: Ambientales.....	27
1.5.1. Interacción virus-bacteria	27
1.5.2. Factores predisponentes del hospedero.....	29
1.6. Signología Clínica.....	30
1.7. Patogenia de la Mannheimiosis Neumónica	30
1.8. Lesiones neumónicas dentro de la Mannheimiosis	31
II. JUSTIFICACIÓN.....	33
III. HIPÓTESIS	33
IV. OBJETIVOS	34
IV.1. OBJETIVOS GENERAL Y PARTICULARES	34
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	35
V.1. Obtención de microvesículas (MVs)	34
V.2. Obtención de proteína de membrana externa (PME).....	35
V.2.1 Obtención de antígenos a partir de MVs.....	37
V.3. Cinética de crecimiento bacteriano.....	39
V.3.1. Producción de LKT cruda (LKTc)	39
V.4. Extracción de lipolisacárido (LPS)	41
V.5. Purificación de proteínas.....	43
V.6. Cuantificación de proteína por método de Bradford.....	43
V.7. Preparación de la muestra para el corrimiento electroforético.....	44
V.7.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS - PAGE).....	44
V.7.2. Condiciones para corrimiento electroforético	44
V.7.3. Tinción de plata para LPS.....	45
V.8. Obtención de leucocitos sanguíneos de ovino	45
V.9. Ensayo de citotoxicidad para la obtención de DL50 a partir de LKTc.....	48
V. 10. Ensayo de citotoxicidad para evaluar LKTv (DL50), LPSc, MVs completas y MVs sonicadas	49

V. 11. Microscopía Confocal	51
VI. RESULTADOS	53
VI.1 SDS-PAGE al 12%. (Obtención de MVs)	53
VI.2 SDS-PAGE al 12%. (Fracción de la PME)	55
VI.3 SDS-PAGE al 12% (Obtención de MVs completas y sonicadas)	56
VI.4 Determinación de la fase franca de crecimiento logarítmico (Log.) de <i>M. haemolytica</i> A2	58
VI.5 SDS-PAGE al 12% de las alícuotas obtenidas durante la cinética de producción de la LKTc	59
VI.6 Producción de LKTc en RPMI 1640 para la realización del ensayo de citotoxicidad	61
VI.7 SDS-PAGE AL 12% del (LPSc) obtenido a partir de cultivo bacteriano	62
VI.8. Determinación de la DL50	63
VI.9. Microscopía Confocal	64
VII. DISCUSIÓN	75
VIII. CONCLUSIONES	83
IX. ANEXO SOLUCIONES	84
X. BIBLIOGRAFÍA	88

RESUMEN

La neumonía en animales domésticos es un padecimiento relevante, ya que afecta directamente al proceso productivo de las explotaciones comerciales, no sólo por muerte de los animales, sino también por disminución en la ganancia de peso, menor eficiencia en la conversión alimenticia y costos elevados del tratamiento en animales afectados. *Mannheimia haemolytica* es el agente que comúnmente se asocia a problemas neumónicos de rumiantes. Uno de los principales factores de virulencia de ésta bacteria en la patogénesis de la enfermedad, es la Leucotoxina (LKT). La cual es una proteína de 104-kDa, soluble, tóxica para macrófagos y leucocitos de rumiantes. La LKT de *M. haemolytica* es secretada en microvesículas (MVs), las cuales son estructuras que todas las bacterias Gram (-) producen, secretando a partir de éstas, una gran cantidad de factores de virulencia. Las MVs son estructuras que se forman a partir de la membrana externa, arrastrando constitutivamente al LPS, el cual es la principal endotoxina de la pared bacteriana de las Gram (-). El objetivo principal de este trabajo fue determinar la actividad biológica de la LKT secretada a partir de MVs de *M. haemolytica* A2 en células mononucleares de ovino (CMO). El ensayo de citotoxicidad se realizó a partir de toxinas crudas utilizadas como controles positivos, por lo que se obtuvo LKT cruda (LKTc) y se realizó la extracción de LPS crudo (LPSc) a partir de bacterias completas. Además también se evaluó la actividad biológica de ambas toxinas contenidas en MVs completas y sonicadas de *M. haemolytica* A2. Las proteínas obtenidas se cuantificaron por método de Bradford y para corroborar la presencia de ambas toxinas en MVs completas y sonicadas se realizó SDS-PAGE, observándose una banda a nivel del marcador de 104 KDa para la LKT y de 15 KDa para el LPS. Una vez transcurrido el tiempo del ensayo de citotoxicidad, las muestras obtenidas fueron fijadas para su evaluación por Microscopía Confocal. Dicha microscopía reveló en el grupo A que correspondió al control negativo que fueron CMO sin tratamiento alguno la ausencia de alteraciones morfológicas. Sin embargo, en el Grupo B que correspondió a CMO tratados con LKTc reveló la presencia de poros transmembranales, así como hinchazón osmótica coloidal y alteraciones nucleares y citoplasmáticas. Por otro lado, en el Grupo C que correspondió a CMO tratados con LPSc se evidenciaron alteraciones morfológicas tanto nucleares como citoplasmáticas e hinchazón osmótica pero sin presencia de poros transmembranales. Finalmente se determinó en el grupo de células tratadas con MVs sonicadas y completas, la formación de múltiples cuerpos apoptóticos emanados a partir de las células dañadas, sin diferencia significativa entre dichos grupos. Los resultados obtenidos sugieren que ambas toxinas contenidas en las MVs trabajan formando un complejo tóxico y el efecto sobre CMO deriva en apoptosis.

I. Introducción

I.1. Generalidades de la enfermedad

La neumonía en animales domésticos es un padecimiento relevante, ya que afecta directamente al proceso productivo de las explotaciones comerciales. Originando grandes pérdidas económicas en las explotaciones de casi todo el mundo, no sólo por muerte de los animales, sino también por disminución en la ganancia de peso, menor eficiencia en la conversión alimenticia y costos elevados del tratamiento en animales afectados con neumonía crónica, entre otros. *Mannheimia haemolytica* es el agente que comúnmente se asocia a problemas neumónicos de rumiantes ¹.

Estudios realizados en rastro muestran la relevancia económica de las infecciones respiratorias en México donde se registran cifras del 8.7% de mortalidad en becerros Holstein causado por neumonías ².

Respecto a los ovinos, un estudio realizado en centros de diagnóstico, estaciones experimentales y en rastros indicó que a nivel nacional e internacional, la prevalencia de neumonías varía de entre el 10 y el 40 %. Sin embargo, en todos estos informes las neumonías ocupan siempre uno de los primeros lugares como causa de mortalidad ².

La enfermedad en bovinos es conocida como Fiebre de Embarque, éste término se le atribuye al principal factor predisponente para el desarrollo de un proceso neumónico agudo, que se presenta cuando los animales son sometidos a un fuerte proceso de estrés, como lo es el transporte. Este estrés, favorece un aumento de cortisol y por ende una disminución en la respuesta del sistema inmune que aunado a una infección viral, predispone a la colonización de las bacterias en vías respiratorias bajas. La enfermedad en ovinos anteriormente denominada Pasteurolosis Neumónica Ovina, hoy en día se le denomina como Mannheimiosis Neumónica Ovina. Tanto la fiebre de embarque en bovinos como la Mannheimiosis

neumónica en ovinos, se encuentran inmersos en el Complejo Neumónico Respiratorio bovino u ovino respectivamente ².

El complejo Neumónico Respiratorio (CNR) es el conjunto de etiologías que predisponen y desencadenan un cuadro neumónico agudo severo. *M. haemolytica* es la principal bacteria aislada a partir del CNR, requiere de la presencia de factores predisponentes en animales susceptibles para desarrollar el cuadro neumónico característico. Es por esto, que los términos como complejo respiratorio infeccioso, síndrome respiratorio bovino y complejo neumónico respiratorio, han sido utilizados con mayor frecuencia en los últimos años, aunque tienen el defecto de ser demasiado generales, pues implican la naturaleza multifactorial de esta enfermedad. Considerando que *M. haemolytica* es el principal patógeno bacteriano asociado al CNR, para fines de este trabajo se nombrará a este último como Mannheimiosis Ovina a lo largo de todo el texto ².

Los factores predisponentes desempeñan una función determinante en el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo: las condiciones ambientales adversas, la mala alimentación, el mal manejo y el estado inmunitario del huésped, pueden favorecer la presentación de neumonía fibrinosa característica de *M. haemolytica* ¹.

Los microorganismos asociados a desencadenar la Mannheimiosis Bovina y Ovina son virus, bacterias y mycoplasmas (**Cuadro 1**), entre otros. Sin embargo, el sinergismo de la interacción entre virus-bacteria es considerado uno de los factores clave para desencadenar la colonización de *M. haemolytica* en el pulmón. Entre los principales agentes virales involucrados se encuentran el Herpes Virus Bovino 1 responsable de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), Virus de Parainfluenza 3 (VPI3) y Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB). De esta manera, el animal desarrolla una neumonía clínica la cual es responsable de la muerte de ovinos y bovinos ².

Cuadro 1. Asociación de microorganismos que desencadenan los cuadros neumónicos en bovinos y ovinos ^{2,3}.

Virus	Parainfluenza-3	Adenovirus	Virus sincitial bovino	Rinotraqueítis infecciosa bovina
Bacterias	<i>Mannheimia haemolytica</i> y <i>Pasteurella multocida</i>	<i>Histophilus sommi</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>bovis</i> *	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermis</i>
Mycoplasmas	<i>M. ovinopneumoniae</i>	<i>M. dispar</i> *	<i>M. mycoides sub mycoides</i> *	<i>M. bovis</i> *

*solo en bovinos

1.2. *Mannheimia haemolytica*, Principal invasor secundario

M. haemolytica es la principal bacteria Gram negativa asociada al desarrollo de la Mannheimiosis neumónica en bovinos y ovinos. En México, estudios de pulmones neumónicos a nivel de rastro y en explotaciones de bovinos, indican que esta bacteria se encuentra comúnmente involucrada en procesos neumónicos que se caracterizan por una pleuroneumonía fibrinosa grave, afectando principalmente a bovinos y ovinos, que han sido recién transportados y/o menores de un año ².

1.2.1. Antecedentes de *Mannheimia haemolytica*.

En 1885 Theodore Kilt la nombró *Bacterium bipolare multocidum* ³. En 1896, Flugge la renombra *Bacillus bovisseptica* ². Posteriormente en 1921, Jones F.S., describió la actividad hemolítica de este microorganismo, el cual fue clasificado dentro de la familia *Pasteurellacea*. Consecutivamente, en 1932 Cross y Newsom aislaron el mismo microorganismo causante de enfermedades en terneros y en borregos, llamándolo *Pasteurella haemolytica* ³.

Entre 1959 y 1961 Smith y col. reconocieron dos biotipos, el A y el T, clasificación que se otorgó, por la capacidad de la bacteria para fermentar arabinosa y trealosa, respectivamente. Dicha actividad esta relacionada con el comportamiento biológico de la bacteria ³.

En 1960, Biberstein explicó la relación entre serotipos y biotipos de *P. haemolytica*, en base a estudios de serotipificación realizados por hemoaglutinación indirecta (HAI) de antígenos capsulares solubles, pero fue hasta 1962 que Biberstein y Gills reconocieron 11 serotipos capsulares por el mismo método ³.

A inicios de 1980, Mannheim y sus colaboradores realizaron estudios genéticos de miembros representativos del género *Histophilus*, *Actinobacillus*, y *Pasteurella* (grupo HAP) concluyendo que este grupo HAP debía ser categorizado como familia, lo que trajo como consecuencia renombrar algunas especies que fueron erróneamente clasificadas dentro de éste ⁴.

Posteriormente, en 1981, Mannheim propuso una nueva familia denominandola *Pasteurellaceae* y consideraba que los tres géneros del grupo HAP, debían conservar distinta identidad. En el mismo año Pohl sugirió que *Pasteurella haemolytica* biotipo A, estaba mucho más asociada genéticamente con *Actinobacillus lignieresii* ³.

En investigaciones subsecuentes, Fodor en 1987, propuso más serotipos, el 3, 4, 10 y 15 asociados con el biotipo T y el resto con el biotipo A; las cepas no tipificables por HAI fueron clasificadas posteriormente por contra-inmunolectroforésis, con lo que se demostraron nueve serogrupos adicionales y en consecuencia el número de serotipos incremento a 17 ².

En 1991, Carter y Chengappa identificaron 17 serotipos en base a la expresión de antígenos de superficie por medio de hemoaglutunación indirecta. Los serotipos 1, 2, 5-9,11-14,16-17 correspondieron al biotipo A. Sin embargo, en 1995 Younan y Fodor reclasificaron el serotipo A11 en *Mannheimia glucosida*. El resto de los

serotipos (3, 4, 10 y 15) correspondieron al biotipo T, los cuáles fueron recientemente reclasificados en *Pasteurella trealosi* ⁴.

Finalmente en 1999, Angen y col. reclasificaron a la bacteria en un nuevo género denominado *Mannheimia*, el cual sigue perteneciendo a la familia *Pasteurellaceae* ⁴, mediante estudios de ribotipificación, electroforesis de enzimas multi-locus, secuenciación del gen 16S del ARNr e hibridación de ADN-ADN, los serotipos de *P. haemolytica* A fueron reclasificados en un nuevo género denominado *Mannheimia*, además de 5 nuevas especies establecidas ⁴.

En consecuencia, los anteriores serotipos A de *P. haemolytica* (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) fueron renombrados como *M. haemolytica*. El serotipo 11 restante, que no está relacionado con *M. haemolytica*, se renombró como *Mannheimia glucosida*, la que incluye también cepas originalmente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupos 3 A-H y 9. *Mannheimia granulomatis*, que incluye a cepas anteriormente clasificadas como *P. granulomatis*, Bisgaard taxón 20 y *P. haemolytica* biogrupo 3J y todas las cepas clasificadas genéticamente como *P. haemolytica*-like (parecidas a *P. haemolytica*), aisladas de conejos, liebres y bovinos. *M. ruminalis*, que incluye cepas no hemolíticas de *P. haemolytica* previamente descritas como *Actinobacillus lignieresii* y *P. haemolytica* biogrupo 3J, las que no están involucradas con cursos patológicos. Por último, *M. varigena*, que comprende un grupo de cepas originalmente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupo 6 y Bisgaard taxón 15 y 36 (**Cuadro 2**) ^{2,3}.

En 2007, Blackall y col. establecieron a *Pasteurella trealosi* como un nuevo género, denominándola *Bibersteinia trehalosi*, la cual es causante de septicemia aguda en corderos ⁴.

Cuadro 2: Reclasificación del género *Mannheimia* ⁵.

Especie	Hospederos	Hábitat	Patología asociada
<i>M. haemolytica</i> (Serotipo A1, 2,5-9,12-14.) (Anteriormente <i>P. h.</i>)	Bovino	Tracto respiratorio superior	Bronconeumonía y sepsis
	Ovino		Neumonía y sepsis
	Caprino		Neumonía
<i>M. varigena.</i> (Anteriormente <i>P. h.</i> biogrupo 6 y Bisgaard taxón 15 y 36)	Bovino	Tracto respiratorio superior	Neumonía, sepsis y otras condiciones de enfermedad
<i>M. glucosida</i> (Anteriormente <i>P.h.</i> A11)	Ovino	Tracto respiratorio superior	Neumonía, y otras condiciones de enfermedad
<i>M. granulomatis</i> (Anteriormente <i>P. granulomatis</i> , Bisgaard taxón 20 y <i>P. h.</i> biogrupo 3J)	Bovino	Tracto respiratorio superior	Neumonía, conjuntivitis purulenta, granuloma en piel y otras condiciones de enfermedad.
<i>M. ruminalis</i> (Anteriormente cepas no hemolíticas de <i>P. h.</i>)	Rumiantes	Rumen	No asociada en procesos patológicos.

Se ha observado que *M. haemolytica* biotipo A serotipo 1 predomina en los aislamientos de neumonías bovinas, mientras que el biotipo A serotipo 2 es dominante en neumonías de ovinos y caprinos. Los ovinos jóvenes son más susceptibles que los adultos al biotipo A2 ⁷. Sin embargo, los serotipos A5, A6, A7, A8, A9, y A12, también se encuentran relacionados con el desarrollo en neumonías en esta especie ².

La distribución y frecuencia de estos serotipos varía de acuerdo a la región geográfica bajo estudio. En un trabajo realizado en los Estados Unidos, muestreando la cavidad nasal de ovinos, el serotipo A2 fue el más común, aunque los serotipos A1, A7, A8 y A9, se recuperaron también con relativa frecuencia. Por otro lado, una investigación realizada en Gran Bretaña con cepas de *M. haemolytica* aisladas de pulmones neumónicos de ovinos, indicó también que el serotipo A2 es el más frecuentemente aislado de estos procesos. Por lo que respecta a México, los estudios realizados en 2009, por Jaramillo y col., obteniendo muestras de pulmones neumónicos y cavidad nasal de bovinos y ovinos, reveló que los serotipos más frecuentes para el primero son A1 y A2, mientras que para el segundo lo son A1, A2, A5 y A9 ².

1.2.2. Morfología y requerimientos para su desarrollo

M. haemolytica es un cocobacilo Gram negativo ⁹. El desarrollo se lleva a cabo en una atmósfera mesófila y tiene la capacidad de crecer como anaerobia facultativa y microaerófila ³.

Mannheimia spp. requiere una alta concentración de calcio para la producción de una citotoxina que libera durante su fase de crecimiento logarítmico. Todas las cepas de *Mannheimia* fermentan manitol, glucosa, maltosa, sorbitol y sucrosa, todo esto sin producción de gas. Es negativa a indol, urea, MB, VP y positiva a catalasa y oxidasa. No fermenta trealosa pero si L-arabinosa ³.

1.2.3. Morfología colonial

M. haemolytica crece en agar sangre como colonia delgada y pequeña con una ligera elevación en el centro, rodeada por una angosta β -hemólisis, señalando que en agar sangre obtenido de borregos jóvenes da un aumento en una doble β -hemólisis, así como también aumenta en tamaño en una atmósfera mesófila. *M. haemolytica* crece en agar MacConkey como colonias que van de rojo a rosado ⁵.

1.3. Factores de virulencia de *Mannheimia haemolytica*

La infección por *M. haemolytica* se debe principalmente a la influencia de sus factores de virulencia forman parte de los componentes de superficie y de los productos propios del metabolismo bacteriano. Los factores de virulencia son capaces de promover la adherencia, la colonización y la proliferación del organismo dentro del pulmón ⁶.

M. haemolytica puede expresar una gran cantidad de potentes antígenos de superficie que incluyen:

- Cápsula: ésta juega un papel importante en la adhesión y la invasión celular.
- Proteínas de membrana externa (PME): permiten el transporte de sustancias a través de la membrana externa.
- Proteínas reguladas por hierro (PRH): funcionan para secuestrar y transportar hierro al interior de la bacteria.
- Adhesinas: implicadas en la invasión y colonización celular del epitelio respiratorio.
- Lipopolisacárido (LPS): es el principal antígeno anclado en la membrana externa de las bacterias Gram negativas y participa en la adhesión sobre superficies.
- Neuroaminidasa: reduce la viscosidad de moco respiratorio y permite la exposición bacteriana sobre la superficie de la célula huésped.

- Leucotoxina (LKT): exotoxina, considerada uno de los principales factores de virulencia de mayor importancia, capaz de lisar macrófagos alveolares, linfocitos y polimorfonucleares⁷.

Estos factores permiten a *M. haemolytica* evadir los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del huésped favoreciendo y complicando la neumonía⁸. La sustancia que causa mayor daño celular en la patogénesis de la enfermedad es la LKT, la cual además de tener habilidad para lisar eritrocitos, tiene efecto citotóxico en leucocitos de rumiantes^{3,9}.

La expresión de los diferentes antígenos ocurre en distintas condiciones de crecimiento. Cada uno de estos antígenos contribuye a la enfermedad clínica en combinación con las secreciones del huésped, que favorecen la presentación de la enfermedad, así como los cambios histopatológicos asociados al proceso⁸.

1.3.1. Leucotoxina (LKT)

El producto celular bacteriano de mayor importancia en la patogénesis de la enfermedad causada por *M. haemolytica* es la Leucotoxina (LKT). *Mannheimia spp* requiere una alta concentración de calcio para la producción de esta citotóxina que libera durante su fase de crecimiento logarítmico. Ésta es una proteína de 104-kDa, es soluble, tóxica para macrófagos y leucocitos de rumiantes¹², termolábil, estable al oxígeno, al pH y soluble en agua. Se produce cuando la bacteria se encuentra en su fase logarítmica de crecimiento. Se ha podido comprobar que el hierro es un factor requerido para el óptimo crecimiento de la bacteria y para la producción de la LKT^{10,11,12}.

La LKT corresponde a la familia de toxinas RTX (Repeat tandem toxin) las cuales son producidas por bacterias Gram negativas de distintas especies³.

La LKT de *M. haemolytica* forma parte de la familia de exotoxinas producidas por bacterias Gram negativas, en razón de que contienen un número variable de dominios de aminoácidos repetidos ricos en glicina. Las toxinas RTX causan una amplia variedad de efectos característicos en las células que actúan ^{2,13}.

La familia RTX contiene a un multidominio de exotoxinas que incluye: la hemolisina de *Escherichia coli*, hemolisina de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, leucotoxina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, toxina denominada PAX de *Pasteurella aerogenes*, hemolisina adenil-ciclasa de *Bordetella pertussis*, hemolisina de *Actinobacillus equuli*, hemolisina de *Actinobacillus suis* y tal vez una proteína secretada por *Haemophilus paragallinarum* ¹⁴.

1.3.1.1. Efectos Biológicos producidos por la LKT

En 1995 un estudio realizado por Murphy y col., comprobó que la LKT tiene capacidad de lisar eritrocitos de ovinos (RBCs). Anteriormente se creía que esta capacidad hemolítica solo afectaba a eritrocitos de rumiantes, no obstante, este estudio comprobó que también actúa sobre eritrocitos de no rumiantes (conejos) ¹⁵.

En 1999 Biberstein y col. han descrito que la LKT, en altas concentraciones produce un efecto citotóxico hacia leucocitos de rumiantes, mientras que en bajas concentraciones induce muerte leucocitaria por apoptosis y baja en la regulación de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII) sobre la superficie de los macrófagos, con lo que se afecta su habilidad como célula presentadora de antígenos ¹⁶.

En 1999 Sun Y. y col. demostraron que la LKT tiene habilidad para unirse a leucocitos de equinos, porcinos y linfocitos de canino. Posteriormente se describió que la unión entre la LKT y leucocitos de no rumiantes es de baja afinidad, por lo que no genera lisis sobre estas células ¹⁷.

En 1999 Hsuan y col. reportaron que la LKT eleva la concentración de Calcio en macrófagos alveolares de bovino, afectando la regulación del Complejo proteico

llamado NF-kB, ya que bloquea su activación. El NF-kB tiene como función generar la respuesta celular hacia estímulos como el estrés, citocinas, radicales libres, radiación, virus, bacterias, así como en la regulación de la apoptosis ¹⁰.

En el 2000 Sun Y. y col. reportaron al igual que Biberstein, que a bajas concentraciones de LKT se induce la muerte celular por apoptosis. Pero por otro lado también indicaron que en altas concentraciones induce oncosis en linfocitos bovinos ¹⁷. Sin embargo, Zecchinon y col. en 2005 reportaron que la LKT a bajas y altas concentraciones induce apoptosis y lisis celular respectivamente en leucocitos bovinos. La capacidad de dicha toxina para inducir apoptosis a bajas concentraciones en leucocitos (macrófagos y neutrófilos) permite a la bacteria evadir la respuesta inmune y aumentar el proceso inflamatorio a nivel pulmonar. Por otro lado a concentraciones altas de LKT, inducen necrosis celular trayendo como consecuencia las lesiones pulmonares características de Mannheimiosis neumónica ¹⁴.

En el 2002 Marcatili y col. relacionaron la muerte celular por apoptosis con la expresión del gen p53 y myc, los cuales tienen como función inducir una respuesta celular ante el daño del ADN y detener la replicación celular. La LKT eleva la expresión de los genes p53 y myc, los cuales, aceleran el proceso de apoptosis ¹⁸.

La LKT por sí misma es capaz de incrementar la expresión del LFA-1, con lo que se aumenta la capacidad de unión de ésta toxina a sus células blanco, produciendo su efecto citotóxico y a su vez incrementando la inflamación del tejido pulmonar ¹⁶.

Se ha comprobado que los macrófagos son más resistentes hacia el efecto lítico de la LKT que los neutrófilos. Por otro lado, los macrófagos alveolares de ganado adulto, son más resistentes que los macrófagos alveolares de terneros de 16 semanas de edad ¹⁴.

La LKT induce la activación de macrófagos y liberación de citocinas pro-inflamatorias como lo es la interleucina-1 (IL-1), entre otras. Induce también, la activación de polimorfonucleares (neutrófilos) permitiendo, que estos liberen

peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre las células del epitelio alveolar, las cuales en presencia de Fe^{+2} reaccionan transformándolo en radicales hidroxilos. Éstos son tóxicos para las células del epitelio alveolar dando como resultado muerte celular que finalmente inducen inflamación y por lo tanto acumulación de edema y fibrina dentro del pulmón ¹⁶.

1.3.1.2. Síntesis y activación de la LKT

M. haemolytica sintetiza LKT en forma inactiva (proLKT), para su activación se requiere de la acilación de la misma, con lo cual se logra eliminar cargas de ésta y aumentar así, su hidrofobicidad ¹³. En 1997 Westrop y col., afirmaron que se requiere de un dominio entre los aminoácidos 379 y 616 para que la proLKT, reconozca su sitio de activación mediante la acilasa y Lys-554. Es factible que este dominio no sea el único a lo largo del gen ¹⁴.

1.3.1.3. Genes necesarios para la producción y secreción de LKT

La producción y secreción de LKT de *M. haemolytica* al igual que la mayor parte de los miembros de la familia RTX, dependen de cuatro genes, los cuales son adyacentes el uno con el otro dentro de un gen clúster denominado *lktCABD* ¹⁵. (Fig. 1)

Los genes que codifican para la proteína estructural de la leucotoxina fueron reproducidos y expresados en *Escherichia coli* ^{19,20}. De esta manera se logró la secuencia total del nucleótido. Se menciona que son necesarios dos genes para la producción de la toxina activa: el gen *lktA* y *lktC* ¹⁹. El gen *lktA* representa el precursor inactivo de la leucotoxina y el gen *lktC* codifica una acetiltransferasa ²¹, la cual es una proteína citoplasmática de 102 kD que es requerida para la activación postranslacional del gen *lktA* para dar lugar a la forma activa de la leucotoxina ¹⁹. Además el gen *lktA* codifica para la estructura de la toxina y una proteína de membrana interna, la cual, se adhiere a un dominio ATP-transportador (ABC), éste último, codificado por el gen *lktB*. El dominio ATP-transportador empuja la toxina al exterior de la bacteria. La vía de interacción se lleva a cabo con el carbono terminal de la proteína *lktA*, lo que permite la formación de un puente entre la membrana interna y externa por medio de la fusión de proteínas de membrana codificadas por el gen *lktD* ²¹. Las proteínas codificadas por el gen *lktB* (80kD) y el gen *lktD* (55 kD) son esenciales para la secreción extracelular de la leucotoxina ^{19,20}.

Ambos genes *lktA* y *lktC* de *M. haemolytica*, muestran extensa homología con la secuencia de nucleótidos *hlyA* y *hlyC* de *Escherichia coli*, los cuales son necesarios para la producción de su hemolisina. Probablemente los genes de *M. haemolytica* y *E. coli* han tenido un desarrollo y origen común ^{19, 20}.

La actividad del operón *lktCABD* aumenta al máximo cuando *M. haemolytica* se encuentra en su fase temprana de crecimiento logarítmico, por lo tanto es en la fase franca de crecimiento logarítmico cuando se lleva a cabo la máxima producción de LKT. Al momento en que la bacteria entra a su fase tardía de crecimiento y posteriormente a la fase estacionaria, disminuye la actividad del *lktCABD*. Cabe señalar que la LKT es producida y secretada al sobrenadante de cultivo por todas las cepas de *M. haemolytica*. Sin embargo, se ha podido comprobar que hay variaciones en la cantidad de LKT producida entre cepas ¹⁴.

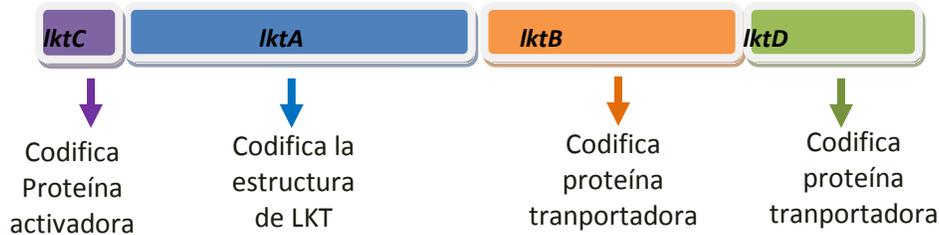


Figura 1. Gen Clúster *lktCABD*. El gen *lktC* representado en color morado codifica la activación de la LKT antes de ser secretada mientras que el gen *lktA* en color azul codifica la estructura de la toxina de manera inactiva. y posteriormente son necesarios los genes *lktB* en color naranja y *lktD* en color verde que codifican proteínas esenciales para la secreción extracelular de la leucotoxina.

1.3.1.4 Interacción entre la LKT y las células de defensa del huésped

La interacción entre la LKT y las células blancas del huésped, es principalmente entre polimorfonucleares (Neutrófilos), linfocitos y macrófagos alveolares. El papel que juegan los macrófagos y neutrófilos en el desarrollo de una neumonía fulminante está bien documentado. La exposición experimental con aerosoles, saturados de *M. haemolytica*, inducen la infiltración rápida de neutrófilos en el pulmón y un aumento marcado en la relación neutrófilo/macrófago sobre el fluido pulmonar de animales que no han madurado su sistema inmune, como es el caso de los terneros. Existen pruebas que indican que la movilización eficiente de neutrófilos no contrarresta la infección por *M. haemolytica* pero sí, contribuye al desarrollo de lesiones neumónicas ^{14, 22}.

A continuación se muestra el **Cuadro 3**, resumiendo los diferentes efectos sobre leucocitos, eritrocitos y plaquetas de la LKT, reportados por diversos autores.

Cuadro 3: Efectos de la LKT de *M. haemolytica*

Efecto	Células blanco	Referencia
Formación de un poro transmembranal	Leucocitos	(Clinkenbeard,1989)
Factor lítico de plaquetas	Plaquetas de bovino	(Clinkenbeard and Upton, 1991)
Estimula la liberación de gránulos	Neutrófilos	(Czuprynski et al. 1991)
Inhibe la mitosis <i>in vitro</i> .	Células mononucleares de torrente sanguíneo	(Czuprynski y Ortiz-Carranza. 1992)
Desregulación del CMH-II	Monocitos	(Hughes et al. 1994)
Estimula la liberación de histamina	Mastocitos del tracto respiratorio bovino	(Adusu et al. 1994)
Elevada capacidad de lisis	Eritrocitos	(Murphy, et al. 1995)

Afecta la regulación del Complejo proteico NF-kB	Macrófagos alveolares	(Hsuan et al 1999)
Eleva concentración y bloquea la activación de NF-kB, IL1-β, TNF-α, IL-8 y la expresión del RNAm	Macrófagos alveolares	(Hsuan et al 1999)
A altas concentraciones induce oncosis	Leucocitos	(Sun et al. 2000)
A bajas concentraciones induce apoptosis	Leucocitos	(Sun et al. 2000)
Aumenta la expresión del CD11a	Neutrófilos y leucocitos de sangre periférica	(Leite et al.2003)
Efecto citotóxico sobre membrana	Leucocitos rumiantes	(Zecchinon , 2005)

1.3.1.5. β_2 -integrinas como receptores de la LKT

Las β_2 integrinas son específicas de los leucocitos y tienen una cadena β en común denominada CD18 el cual tiene un peso molecular de 95 kDa. Este, se asocia con 3 cadenas α distintas llamadas CD11a, CD11b y CD11c para dar lugar a tres diferentes β_2 integrinas: Cd11a con Cd18 forman: LFA-1, CD11b con CD18 forman: Mac-1 y CD11c con CD18: forman: Cr4. El LFA-1 interviene en interacciones directas entre célula-célula ²³.

El nivel de expresión de β -integrinas es regulado por varios factores, incluyendo a los mediadores de inflamación: como son las citocinas (interleucinas-1 y 4, Interferón y Factor de Necrosis Tumoral) y la formación del complejo receptor Fc-g ^{24, 25}.

La LKT secretada por *M. haemolytica*, tiene una actividad citotóxica con sensibilidad hacia leucocitos de rumiantes y plaquetas, ocasionando poros en dichas células¹⁵. Sin embargo, si la LKT es capaz de lisar eritrocitos de varias especies

animales, es sólo citotóxico para leucocitos rumiantes ¹⁴. En 2002 Deshpande identificó como receptor de la LKT de *M. haemolytica* a la β_2 -integrina CD18 de rumiante. Estos datos sugieren que la unión de la LKT sobre la β_2 -integrina de la célula blanca de rumiante, sea la razón de la especificidad de la virulencia de *M. haemolytica* en esta especie ²⁶.

La LKT juega un papel muy importante en la patogénesis de la infección al destruir leucocitos, principalmente macrófagos alveolares, en el sitio de infección. Lo cual reduce la capacidad del huésped de establecer una respuesta inmune eficiente, induciendo eventos de inflamación que desencadenan un grave daño pulmonar. Además, las enzimas liberadas por leucocitos lisados en el tejido pulmonar, contribuyen al desarrollo de una severa necrosis. La LKT es tóxica por sí misma para el epitelio bronquial, pero la gravedad de las lesiones en los septos alveolares depende en su mayor parte a la acumulación de leucocitos ⁸.

1.3.2. Lipopolisacárido

El esqueleto de la pared celular de las bacterias Gram negativas esta formado por una red de mureína que presenta una sola capa donde se encuentran grandes cantidades de lipoproteínas y lipopolisacáridos, por consiguiente la pared de este grupo de bacterias es más compleja en su composición y estructura, en comparación con las bacterias Gram positivas, ya que a diferencia de éstas, en la pared de una bacteria Gram negativa, la mureína (peptidoglicano) representa sólo una pequeña porción de la pared, sobresaliendo en un mayor porcentaje las proteínas, los fosfolípidos y los lipopolisacáridos que en su conjunto forman una membrana externa a la mureína, formada por los LPS en una doble capa de fosfolípidos. La unión de la membrana externa a la mureína se lleva a cabo por medio de las proteínas de Braun, la membrana externa es la responsable del contacto de la bacteria con el medio ambiente, al facilitar estructuras y receptores relacionados con la adherencia a las células del huésped, con la resistencia a la fagocitosis y la sensibilidad a los bacteriófagos ²⁷.

Los LPS constan de tres regiones estructurales: Polisacárido O (la parte más externa), un núcleo del polisacárido y el Lípido A. De estas regiones la más importante es el polisacárido O en procesos de tipificación. El lípido A es un glucofosfolípido que se encarga de generar o estimular la proliferación de toda la gama de células de defensa del sistema inmune inespecífico, además de comportarse como mitógeno de células B contribuye a la activación del complemento en el sistema inmune humoral ^{26,28}.

Las bacterias Gram negativas, producen LPS como parte de la capa externa de sus paredes celulares, estas sustancias son denominadas endotoxinas, debido a que están encerradas en las células. Sin embargo, aunque la palabra endotoxina sugiere que el material esta dentro de la célula, cabe mencionar que esta formando parte de la membrana externa. De hecho la endotoxina es a veces liberada desde la superficie de la célula intacta ²⁹.

Los LPS, son compuestos estables al calor y desde el punto de vista biológico pueden producir efectos adversos cuando son producidos *in vivo* por las bacterias correspondientes, causando reacciones de carácter tóxico con un amplio rango de efectos fisiopatológicos en huéspedes susceptibles tales como fiebre, hiperglicemia, shock y diarrea. Al entrar en contacto con el huésped, los LPS dejan rápidamente el torrente sanguíneo y se acumulan en los macrófagos, produciendo fosforilación, así como un aumento en los mecanismos de transducción estimulando las funciones de las células fagocíticas y por lo tanto de la secreción de citocinas ^{29,28}.

El LPS actúa como endotoxina al ligarse al complejo receptor CD14, TLR4, MD2, los que promueven la secreción de citocinas a favor de los procesos inflamatorios en muchos tipos celulares, pero se ha comprobado que tiene un mayor efecto sobre macrófagos. El LPS es también un pirógeno exógeno ²⁷.

El LPS se considera uno de los componentes de la bacteria con una alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria. Las lesiones que induce consisten en grandes

áreas de hiperemia y edema que abarcan zonas de deposición de células inflamatorias invadiendo en ocasiones los lóbulos pulmonares adyacentes, además también pueden observarse focos de hemorragia y adherencia fibrinosa ³⁰.

En 1993 Burrows y col., estimaron que entre el 12 al 25% del peso seco de *M. haemolytica* está compuesto de LPS o endotoxina la cual está anclada a la membrana externa y es liberada conforme la bacteria muere. La endotoxina libre de *M. haemolytica* y otras bacterias Gram negativas interactúan con numerosos tipos de células y sistemas mediadores humorales iniciando una amplia variedad de respuestas patofisiológicas ⁹.

Se sabe de manera general que las bacterias se pueden adherir a las superficies epiteliales a través de receptores específicos, de tal manera que los factores bacterianos involucrados en la interacción bacteria-célula son muy diversos; entre algunas de las estructuras bacterianas que pudieran participar en la adherencia se reconocen las fimbrias, adhesinas no fimbriales, adhesinas proteináceas, el glicocáliz, el LPS, proteínas de membrana externa y la cápsula ².

Poco se sabe acerca de las moléculas que participan en la habilidad de *M. haemolytica* para colonizar la faringe y las criptas tonsilares; es probable entonces que la bacteria, codifique una adhesina que le permita unirse al epitelio respiratorio. También se ha mencionado la participación del LPS, las fimbrias y el glicocáliz, de los cuales, se ha podido demostrar la capacidad del LPS de *M. haemolytica* para producir adherencia *in vitro* ².

El LPS ha sido identificado por teñidos inmunohistoquímicos dentro de los neutrófilos, macrófagos, células endoteliales y sobre la superficie de células epiteliales en pulmones neumónicos. La interacción de LPS con los macrófagos puede ser en gran parte el responsable de muchos de los efectos patológicos asociados con neumonía fibrinosa característica. Los macrófagos interactúan con LPS y son activados para producir citocinas proinflamatorias, sustancias pro-coagulantes,

radicales oxígeno y proteasas involucradas en la respuesta inflamatoria. El LPS administrado intrabronquialmente causa exudación de neutrófilos, fibrina, edema pulmonar y agregación de plaquetas en capilares ^{8, 14}.

La administración intrabronquial de LPS purificado de *M. haemolytica* en animales inmuno-comprometidos, origina la exudación de fibrina y neutrófilos, edema pulmonar y agregación de plaquetas en los capilares, implicando entonces como la principal causa de necrosis microvascular y trombosis. Se ha podido demostrar que el LPS incrementa la actividad citolítica de la LKT y aumenta la expresión LKT-dependiente de IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Es probable que *in vivo*, el LPS y la LKT actúen de manera sinérgica causando daño a los tejidos e inflamación ².

Tanto la LKT (exotoxina) como el LPS (endotoxina) inducen la formación de citocinas proinflamatorias con lo que se contribuyen a la generación de una mayor respuesta inflamatoria y en consecuencia un mayor daño tisular ⁸.

1.3.3. Proteínas de Membrana Externa (PME)

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 huésped ³¹.

Si bien el papel de las PME como factor de virulencia no está del todo dilucidado, en 1998, Iovane y col., confirmaron su importancia en la patogénesis de las infecciones resaltando su participación en la producción de anticuerpos de protección antibacteriana. Además participan como transportadoras de materiales a través de la membrana (porinas) y en la adhesión a la célula huésped con lo que la función de la membrana celular de éste es dañada ^{2, 28, 32}.

En 1984 se realizaron estudios por Squire y col., enfocados en la identificación de proteínas de la superficie celular y PME producidas por diversos serotipos de *M.haemolytica* para ser utilizados como inmunógenos y prevenir así presentación de la enfermedad ^{31,2}.

De igual manera, en 1998 Iovane y col., comprobaron que las PME aisladas de *M.haemolytica* son poderosas moduladoras de la actividad de los leucocitos polimorfonucleados de bovinos induciendo alteraciones en su actividad biológica. De tal manera, es posible observar *in vitro*, una reducción dosis-dependiente de PME con la capacidad de adherencia a la pared de nailon. Se cree que es posible que a concentraciones de entre 5 a 20 ug/ml de PME estimulan la quimiotaxis y la adherencia de los neutrófilos, favoreciendo de esta manera su acumulación en el foco inflamatorio inicial ³³.

Se sabe entonces, que las PME tienen un gran potencial para ser utilizados como inmunógenos. Especialmente aquellas proteínas que están expuestas en la cápsula de la célula bacteriana ^{34,35}. Estas proteínas son objeto de gran interés por la respuesta inmune que inducen en el huésped, ya que potencializan 2 mecanismos muy importantes en la inmunidad de los bovinos contra *M.haemolytica*, como lo son: la muerte mediada por el complemento y la fagocitosis mediada por los neutrófilos ².

El análisis de 27 estudios realizados a lo largo de 12 años con vacunas experimentales y comerciales, reveló que aquellas que aportaron PME y otros antígenos de superficie, suministraron los mejores niveles de protección contra desafíos con *M.haemolytica*, equivalente al proporcionado por vacunas vivas ³⁶.

La capacidad inmunogénica de las PME varía entre los diferentes serotipos de *M.haemolytica*, lo cual se comprobó mediante desafíos intratraqueales en ovejas con *M.haemolytica* serotipo A2, A7 y A9, previamente inmunizadas con extractos de PME de los mismos serotipos. Aunque se observaron altos títulos de anticuerpos,

sólo las ovejas vacunadas con PME del Serotipo A7 resultaron en una protección efectiva contra la infección homóloga y heteróloga por *M.haemolytica* A2, A7 y A9³⁷.

Pandher y col., en 1996 comprobaron que la presencia de anticuerpos contra PME de *M.haemolytica* tiene una correlación estadísticamente significativa con la resistencia a desafíos experimentales con dicho microorganismo en bovinos. A su vez, lograron clonar y secuenciar el gene que codifica una lipoproteína (PIpE) similar a la producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae*^{38.2}.

I.3.4. Proteínas de Membrana Externa Reguladas Por Hierro (PMERH)

Una bacteria en diferentes condiciones de crecimiento expresa diferentes productos para adaptarse al nuevo medio. En ausencia de hierro, la bacteria expresa en su superficie proteínas especialmente dedicadas a captarlo. Estas proteínas llamadas PMERH trabajan específicamente compitiendo con proteínas transportadoras del hospedador, para quitarles el hierro, el cual es un nutriente esencial para la sobrevivencia de todas las células de mamíferos, pero la disponibilidad de éste en el tejido de un animal infectado está restringida por proteínas fijadoras de hierro, propias del hospedador. Sin PMERH, la célula bacteriana no podría adquirir suficiente hierro para multiplicarse, crecer y serían fácilmente removidas por el sistema inmune del hospedador. Cabe mencionar que el hierro es requerido en el medio para la producción de LKT por parte de *M. haemolytica*³⁹.

En estudios realizados por Confer y col., donde el ganado fue vacunado con PMERH de 70, 77 y 100 kDa, los títulos de anticuerpos séricos no correlacionaron con la resistencia a la infección, pero los anticuerpos contra éstas proteínas en conjunto con los anticuerpos a otros antígenos de superficie, aumentaron la respuesta inmune. Existe incluso evidencia de que algunas de éstas proteínas son

conservadas entre los diferentes serotipos de *M. haemolytica* y tal vez éstas podrían proveer protección cruzada ^{35,40,41}.

I.4. Microvesículas bacterianas de membrana externa (MV).

Los patógenos Gram negativos han desarrollado estrategias para ganar acceso a órganos blancos del huésped, algunas de éstas son específicas de cada patógeno, capaces de permitir la activación de diversos factores de virulencia ²⁹. La patogenicidad de distintas bacterias Gram negativas, se basa en su habilidad para secretar numerosos factores de patogenicidad, al medio que rodea al tejido que éstas afectan (por ejemplo: hemolisina, aerolisina, verotoxina, leucotoxina, etc). Estos factores se difunden dentro del tejido e inician su destrucción ²³.

La secreción de los factores de virulencia a partir de Microvesículas (MV) es complicada, ya que la envoltura bacteriana de las bacterias Gram negativas consiste en dos bicapas de lípidos: membrana externa, membrana interna y periplasma entre ellas. Las bacterias producen MVs a partir de sus membranas externas y éstas, son liberadas al medio ambiente circundante. De tal manera, que las MVs conservan constitutivamente los componentes de la membrana externa y de la pared celular, incluyendo proteínas, LPS, ácido murámico, cápsula y fimbrias. Además, mientras las MVs son liberadas a la superficie, éstas encierran una pequeña parte del periplasma subyacente, por lo que, arrastran en su interior pequeñas partículas de pared celular y productos bacterianos como lo es la LKT, entre otros. Las MVs poseen entonces los principales factores de virulencia de la bacteria considerados así, por la alta capacidad que estas tienen para inducir una respuesta tanto inflamatoria como de inmunidad ⁴². Estos componentes juegan un papel crítico en la patogenicidad de las bacterias ⁴³.

Las MVs poseen los antígenos situados como normalmente se encuentra 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 ⁴².

Existen diferentes sistemas de secreción de proteínas en las bacterias, los cuales corresponden al Tipo I, II, III, IV, la secreción de proteínas mediante MVs podría sugerirse como sistema de secreción tipo V^{80,40}. Ya que permite a la bacteria secretar proteínas de alto peso molecular y grupos de proteínas y lípidos hacia el medio extracelular ⁴².

Por todo lo anteriormente mencionado, 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 proteínas inmunocompetentes ⁷.

Estudios realizados en *Pseudomona aeruginosa* comprobaron que la Gentamicina, es un antibiótico de amplio espectro que a dosis subletales, induce la producción de MVs en esta bacteria. La actividad bactericida de éste antibiótico, media parcialmente la alteración de la superficie celular, la membrana externa se pliega y se une deliberadamente en sitios específicos formando MVs, las cuales son expulsadas de la célula manteniéndose libremente en el entorno externo ⁴².

Satsuki y col. demostraron en 2002 en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que el mayor constituyente de las vesículas liberadas por este género bacteriano correspondía a proteínas que son parte de la membrana externa de la célula bacteriana. Este experimento se realizó a partir de extractos de membrana externa con los que se descubrió que dicha membrana contiene polipeptidos que las vesículas liberadas no poseían. Tres de estas proteínas secretadas en las vesículas fueron identificadas: una proteína termo-labil que equivale a una OMpA de *A. actinomycetemcomitans* de 28 kDa, la cual esta relacionada con una lipoproteína de

membrana externa y la leucotoxina de *M. haemolytica*. Además, en este estudio, se incubaron las vesículas liberadas con células HL60 con diferentes cepas de *A. actinomycetemcomitans*: la JP2 y la 652, en donde se observó la lisis de dichas células. Por lo anterior se concluyó que las vesículas liberadas están enriquecidas con una leucotoxina activa. La cepa JP2 contiene vesículas enriquecidas con una leucotoxina 10 veces tóxica que la cepa 652 ⁴⁴.

González y col., en el 2007, identificaron y caracterizaron en *M. haemolytica* serotipo A1 y A2 microvesículas liberadas durante su crecimiento *in vitro*, exarcebando su producción y liberación, adicionado un antibiótico de amplio espectro a dosis subletales al medio. Se estableció que dentro de estas estructuras se encontraban los principales antígenos de la bacteria, considerados así por el papel que juegan en la patogénesis de la enfermedad, tal es el caso de la LKT, LPS, PME y un fragmento de DNA. La caracterización de estos antígenos, consistió en la identificación de los mismos dentro de las MVs, mediante técnicas inmunológicas y de biología molecular. Sin embargo, se desconoce si alguno de éstos, se encuentra biológicamente activo ⁷.

Tal es el caso de la LKT, la cual fue identificada mediante Western Blot por reacción cruzada positiva con un suero policlonal hecho en conejos para la hemolisina de *Actinobacillus pleuropneumoniae* 1. La proteína identificada sobre el inmunoblot correspondió a la LKT de *M. haemolytica* con peso de 104 KDa, muy similar a la hemolisina de *A. pleuropneumoniae* (ApxIA) la cual tiene un peso de 105 KDa. Por todo lo anterior, en este estudio se concluyó la LKT es liberada dentro de las MVs, como una proteína completa por el peso molecular que presentó en el Inmuno Blot. Sin embargo, en este estudio no se realizaron ensayos de citotoxicidad, para evaluar la actividad de la misma. Este documento es el primer reporte de dichas estructuras (MVs) en este género bacteriano ⁷.

1.5. Factores predisponentes: Ambientales

Para que un animal desarrolle Mannheimiosis Neumónica, se requiere de la presencia de ciertas condiciones ambientales que alteren los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del aparato respiratorio, así como de infección primaria de tipo viral, las cuales facilitan el desarrollo de la lesión pulmonar por la infección bacteriana secundaria. Estas condiciones ambientales incluyen: hacinamiento, mezcla de animales de diferentes edades y niveles inmunológicos en las explotaciones, calor o frío excesivo, elevada humedad, transportes prolongados, instalaciones con ventilación deficiente, presencia de concentraciones elevadas de contaminantes en el aire y cambios bruscos en la alimentación ².

Las condiciones antes mencionadas, se afirma constituyen factores de estrés para el animal en cuestión. El término estrés es una reacción neuroendocrinológica que incluye la elevación de los niveles de esteroides endógenos del animal. Ahora bien, si el estrés se mantiene por tiempo prolongado, la hipersecreción de corticoesteroides comprometerá la respuesta del hospedador a los agentes infecciosos. Esto ocurre debido a una inhibición en la liberación de factores quimiotácticos por parte de los macrófagos alveolares, bloqueando la unión de factores quimiotácticos para los neutrófilos, inhibiendo de la misma manera, la capacidad de migración del macrófago alveolar ².

1.5.2. Interacción virus-bacteria

El efecto de la primoinfección viral en el hospedero, afecta directamente la eliminación de moco con microorganismos patógenos realizada por el aparato mucociliar. Resultando que los microorganismos patógenos como *M. haemolytica* alcancen las vías respiratorias inferiores ⁴⁵.

Las lesiones inducidas por los virus al epitelio respiratorio incluyen el aumento de colonización bacteriana en el tejido pulmonar. La función fagocítica de los macrófagos alveolares se altera por la infección viral de los mismos. Por

consiguiente, los macrófagos infectados pierden su capacidad fagocítica y fallan en liberar factores quimiotácticos para otras células. Sin embargo, estudios en infecciones virales respiratorias, indican un aumento de los receptores tipo toll (TLRs) para el reconocimiento del patógeno en macrófagos alveolares mediante la liberación de citocinas, lo cual, promueve la respuesta proinflamatoria que contribuye a la severidad de las lesiones asociadas a la infección por *M. haemolytica*. Se piensa que los TLRs juega un papel crítico en la detección de la infección bacteriana, así como en la inducción de respuesta proinflamatoria ⁴⁶.

Lo antes mencionado, demuestra que la infección viral inicial, tarde o temprano aumenta la sensibilidad de animales a la infección bacteriana subsecuente ⁶.

Una infección previa o combinada con ciertos virus respiratorios aumenta la sensibilidad de los ovinos a neumonías bacterianas secundarias; algunos ejemplos de los virus más importantes asociados a las infecciones de vías respiratorias agudas en ovinos y bovinos incluyen: el virus de parainfluenza 3 (PI- 3), Herpes virus bovino tipo 1 (BHV-1), el virus respiratorio sincicial bovino (VRSB), adenovirus (ADV) y Reovirus ⁴⁵.

La mayoría de estos virus aumenta la sensibilidad hacia el desarrollo de neumonía bacteriana secundaria causada principalmente por *M. haemolytica* en animales susceptibles. Por ejemplo, una infección inicial con el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (BHV-1) seguido por una infección con *M. haemolytica*, en terneros, cursa con cuadros clínicos agudos que incluyen fiebre y lesiones pulmonares indicativas principalmente de Mannheimiosis Neumónica ⁴⁷.

La infección combinada con PI3 y *M. haemolytica* en corderos, también causa una pleurobronconeumonía fibrinopurulenta aguda con necrosis multifocal severa que se observa principalmente en los cuadros desarrollados a nivel de campo. La inoculación experimental simultánea, en becerros con VRSB y *M. haemolytica*, causa

el desarrollo de lesiones masivas pulmonares que son similares a los observados en los casos de Mannheimiosis Neumónica que ocurren naturalmente en campo ^{47,48}.

Además, la infección experimental con adenovirus-ovino 6 seguido por una infección por *M. haemolytica*, induce lesiones más severas en corderos que aquellas lesiones producidas sin infección virus-bacteria. La inoculación combinada en corderos con el virus y la bacteria causa neumonía fibrinopurulenta con edema, necrosis multifocal y pleuritis ^{48,49}.

1.5.2. Factores predisponentes del hospedero

Los diferentes estados inmunológicos que se pueden desarrollar entre un grupo de individuos, esta determinado por las pautas de manejo a las que son sometidos, las condiciones ambientales y la exposición a la presencia de un mismo agente infeccioso, podrían determinar que los individuos desarrollen manifestaciones clínicas diferentes entre uno y otro. La inmunidad es individualmente adquirida, de manera específica y dependiente de la antigenicidad y virulencia del agente infeccioso involucrado. Es por esto que el individuo desarrolla una protección de intensidad variable ⁵⁰.

En algunos casos, la eficaz respuesta de los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos, logran que la infección no progrese y el resultado sea una infección subclínica. En la mayoría de los casos, el agente es eliminado y el animal queda parcialmente inmunizado. Condicionando la magnitud y duración de la respuesta inmune, a factores tanto del hospedador como del agente infeccioso ³.

Los mecanismos de inmunidad más relevantes de los ovinos hacia *M. haemolytica*, están mediados por el complemento, la opsonización de la bacteria y la fagocitosis por neutrófilos ⁵⁰.

I.6. Signología clínica

Las manifestaciones clínicas más comunes incluyen diferentes presentaciones que van desde la infección inaparente hasta la muerte de los individuos. Entre la signología principalmente observada se encuentra: depresión, anorexia, incremento de secreción conjuntival serosa, fiebre de hasta 42 C, rinitis mucopurulenta, tos y taquicardia. Inicialmente, la frecuencia respiratoria se incrementa, aunque después se presenta disnea severa que llega a causar respiración oral. Los animales afectados extienden el cuello y abducen los miembros anteriores para expandir el volumen de la cavidad torácica. A la auscultación se detectan ruidos bronquiales que progresan a ronquidos, murmullo vesicular y sonidos bronquiales en la zona antero ventral, hay descarga nasal serosa y tos ³⁰. Los estertores son inicialmente húmedos y posteriormente secos, además, se pueden apreciar ruidos de fricción pleural. Todos los animales presentan pérdida de peso y en algunos casos diarreas ¹.

La morbilidad fluctúa del 5 al 40%; mientras que la mortalidad varía del 5 al 20%. Aunque, la signología varía, probablemente debido a los diferentes virus que pueden estar involucrados y a las condiciones de manejo; una vez que *M. haemolytica* coloniza al pulmón e inicia la infección, el proceso neumónico se acelera, los signos clínicos se exacerban y los casos de mortalidad se presentan ¹.

I.7. Patogenia de la Mannheimiosis Neumónica

M. haemolytica está presente en una pequeña proporción como flora comensal oportunista de la nasofaringe de ganado sano. Bajo ciertas circunstancias tanto del hospedador, como del ambiente, las bacterias colonizan el tracto respiratorio. El estrés del transporte los partos y la infecciones recurrentes respiratorias de tipo viral, favorecen la colonización del tracto respiratorio y de esta manera contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Cuando el hospedador se encuentra bajo situaciones de estrés *M. haemolytica* prolifera y es eliminada por las secreciones nasales en aerosoles. La bacteria ingresa por aerosoles al animal sano, favoreciendo su

movimiento a zonas mas profundas del árbol bronquial y proliferando rápidamente al nivel alveolar ⁷.

I.8. Lesiones neumónicas dentro de la Mannheimiosis

La neumonía aguda intersticial asociada al proceso exudativo, es considerada la lesión más representativa de la Mannheimiosis neumónica; cabe mencionar que las lesiones pueden evolucionar hasta una pleurobronconeumonía fibrinopurulenta, en la clasificación anatomopatológica. Lo anterior se debe a que su respuesta inflamatoria exudativa es predominantemente de tipo fibrinosa. Este exudado cubre la pleura de las regiones craneoventrales del pulmón. La lesión es por lo general asimétrica y se presenta un daño más considerable en el pulmón derecho ⁵⁰. Se ha logrado aislar *M. haemolytica* de cuadros neumónicos que varían en cuanto a su severidad, distribución y morfolopatología. Se pueden observar desde neumonías supurativas multifocales a difusas, hasta cuadros donde existen lesiones vasculares con trombosis y hemorragias ⁵⁰. Es posible que los diversos cuadros sean ocasionados por cepas con propiedades patogénicas diferentes ⁵¹.

Las especies de *Mannheimia* pueden expresar una gran cantidad de antígenos de superficie incluyendo LPS, PME, PMERH, fimbrias y polisacáridos capsulares. Estas bacterias como ya se había mencionado anteriormente, secretan una citolisina específica: LKT, que mata fagocitos. La expresión de los diferentes antígenos ocurre en distintas condiciones de crecimiento. Esto aumenta la posibilidad de que la expresión de antígenos puede estar alterada *in vivo* y contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Cada uno de estos antígenos probablemente contribuye a la enfermedad clínica, en combinación con las secreciones y componentes celulares del huésped, favoreciendo a la presentación característica de la enfermedad, así como a los cambios histopatológicos asociados al proceso ⁵².

Microscópicamente, se observa también una extensa trombosis intravascular en venas pulmonares, vasos capilares y vasos linfáticos de los lóbulos infectados, esto

principalmente debido a que la bacteria a nivel pulmonar, libera una endotoxina (LPS) y secreta una exotoxina (LKT). Estas alteraciones vasculares tarde o temprano originan isquemia con necrosis multifocal del parénquima pulmonar seguido por una severa reacción inflamatoria y exudado fibrinopurulento ⁵³. Además de la necrosis, los bronquios y bronquiolos mayores muestran descamación del epitelio y ocasionalmente, un exudado fibrinopurulento. Los septos alveolares aparecen engrosados y hemorrágicos; Así mismo, se aprecia una infiltración severa de leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) tanto en septos, como participando en la exudación a la luz alveolar y bronquial. En zonas de daño severo se encuentran parcialmente demarcadas por células necróticas correspondientes a los macrófagos que transforman su núcleo, el cual, se alarga dando un aspecto de grano de avena que además, se agrupan formando ondas y remolinos. En estas zonas pueden también apreciarse vasculitis y trombosis de algunas pequeñas venas. En otras áreas con menos daño se puede reconocer edema, fibrina, macrófagos activos y neutrófilos en la luz de los alveólos, además, pueden indentificarse colonias bacterianas ^{54,55}.

A la necropsia se encuentra principalmente, hepatización intensa que afecta una tercera parte de los pulmones, la cual se localiza frecuentemente en los lóbulos cardíaco y apical, así mismo se observa acumulación de exudados serofibrinosos en espacios interlobulares (bovino), con adherencias entre la pleura parietal y visceral⁸² (casos crónicos), presencia de descarga mucohemorrágica por ollares, inflamación de laringe, tráquea, bronquios y pulmones, éstos últimos, con aspecto marmoleado. Los nódulos linfáticos regionales se encuentran aumentados de tamaño, además se puede desarrollar pericarditis fibrinosa. Las secuelas más comunes son secuestros abscedados de las zonas más dañadas ^{1,53}.

II. Justificación

Las MVs de *M. haemolytica* A2, arrastran durante su proceso de formación una gran cantidad de antígenos de relevancia inmunológica, entre ellos, la leucotoxina (LKT), considerada uno de los principales antígenos de la bacteria que utiliza como factor de virulencia para colonizar y generar lesión en el pulmón. Esta exotoxina, es liberada aparentemente en MVs en forma activa ⁷. Estudios realizados en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* señalan, que las MVs liberadas por éste género bacteriano están enriquecidas con una leucotoxina que induce lisis de células HL60 ⁴⁴. Evaluar el efecto de la LKT secretada a partir de MVs de *M. haemolytica* A2 sobre células mononucleares de ovino, determina si la exotoxina de dicha bacteria se secreta de forma activa dentro de sus MVs. Las MVs liberadas por la bacteria, representan una vía alterna para producir daño al tejido adyacente y activar leucocitos, sin la necesidad de exponerse al sistema Inmune. Las MVs de *M. haemolytica*, podrían estar participando de manera directa en la patogenia de la enfermedad, estableciendo previos nichos que permitan a la bacteria colonizar el órgano blanco.

III. Hipótesis

Si la leucotoxina secretada en las microvesículas de *Mannheimia haemolytica* A2, se encuentra en forma activa, entonces ésta inducirá modificaciones morfológicas en células mononucleares de ovino mantenidas en condiciones *in vitro*, alterando la viabilidad de las mismas, evidenciando así, el efecto de citotóxico de la toxina acarreada dentro de MVs de ésta bacteria.

IV. Objetivos

IV.1. Objetivo General

Evaluar el efecto citotóxico de la LKT que secreta *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 en MVs, sobre células mononucleares sanguíneas de ovino.

IV.2. Objetivos Particulares

- 1.- Obtener MVs de *M. haemolytica* A2, a partir de sobrenadantes de cultivo sobreestimulados con gentamicina.
- 2.- Obtener a partir de un cultivo puro de células completas de *M. haemolytica* A2, leucotoxina cruda (LKT-exotoxina) del sobrenadante y lipopolisacárido crudo (LPS-endotoxina) del botón celular bacteriano, ambas, para ser utilizadas como control positivo.
- 3.- Determinar la presencia de la LKT cruda (LKTc), LPS crudo (LPSc) y ambas toxinas en MVs, en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando tinción de Azul de Comassie y tinción de plata respectivamente.
- 4.- Obtener leucocitos de sangre periférica de ovino mediante venopunción para montar ensayos de citotoxicidad.
- 5.- Establecer la dosis letal 50 (DL50), a partir de LKTc, sobre leucocitos de sangre periférica de ovino.
- 6.- Montar ensayos de citotoxicidad, con la DL50 de LKTc, LPSc, MVs completas y MVs sonicadas en leucocitos de sangre periférica de ovino.
- 7.- Determinar mediante Microscopía Confocal, las alteraciones morfológicas que sufren las células mononucleares *In vitro* en presencia de diferentes concentraciones de toxinas crudas y de MVs.

V. Materiales y Métodos

Se utilizó una cepa de campo de *M. haemolytica* A2, obtenida en un trabajo previo por González y col. ⁷, aislada a partir de tejido pulmonar con lesiones neumónicas características de Mannheimiosis de un ovino muerto en campo. Dicha cepa se identificó bioquímicamente mediante kit comercial: Api 20E (BioMérieux S.A), obteniéndose una homología del 96% al género deseado. Posteriormente en dicho trabajo, se serotipificó mediante hemoaglutinación indirecta utilizando antiseros de referencia, resultando positiva al serotipo A2 ⁷. Se realizó primocultivo de dicha cepa, en agar sangre mediante estría cerrada, incubando a 37°C por 24 hrs. A continuación, se realizó una tinción de Gram para verificar la morfología de la bacteria y pureza del cultivo.

V.1. Obtención de MVs

Se realizó el crecimiento bacteriano de cepa anteriormente mencionada, en placas de agar sangre incubada a 37 °C / 24hr. Una vez realizado lo anterior, se procedió a cosechar a la bacteria en 500 ml de BHI enriquecido con CaCl₂ (1ml/250ml de BHI), en agitación a 150 rpm, 37 °C / 24 hr. Transcurridas las primeras 4 hr, se adicionó Gentamicina en una dosis de 25µg por 1 ml de medio de cultivo, de esta manera se exacerbó la producción de MVs. Dicho cultivo se incubó nuevamente bajo las condiciones antes mencionadas, llevándolo a completar 24 hr. Finalmente se realizó, tinción de Gram para evidenciar la pureza del cultivo ³².

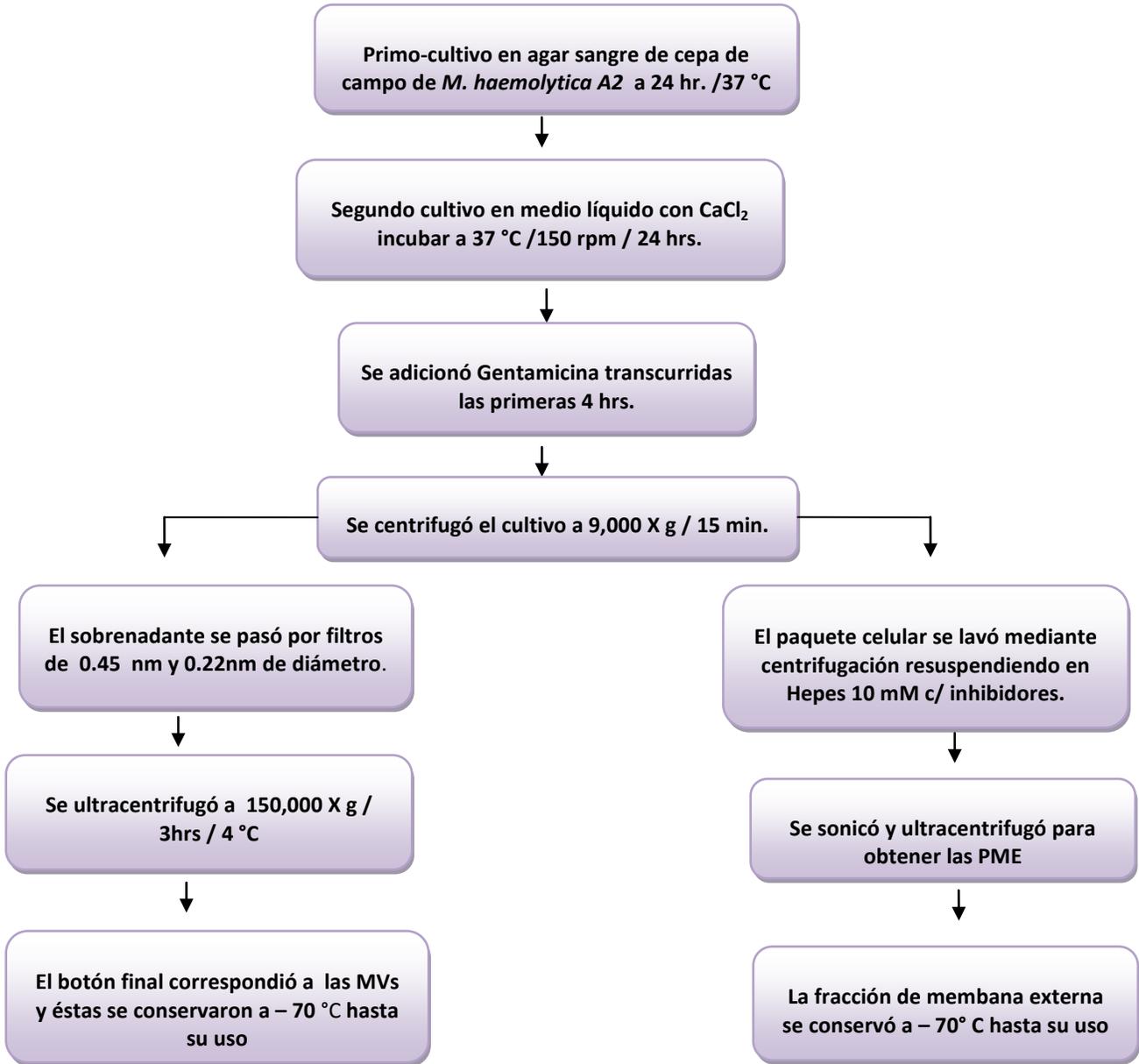
El cultivo anterior se centrifugó a 9,000 X g por 15 min. y el sobrenadante resultante se filtró con membranas millipore, primero de 0.45 µm de diámetro de poro y posteriormente de 0.22 µm. El producto de la filtración se ultracentrifugó a 150,000 X g / 3 hrs / 4 °C, desechando el sobrenadante y el botón resultante correspondió a MVs, las cuales se resuspendieron en Hepes 10 mM con inhibidores de proteasas (Anexo Soluciones) y se conservaron a -70 °C hasta su uso ³².

V.2. Obtención de proteínas de membrana externa (PME)

Las células recuperadas durante el proceso de obtención de MVs, se lavaron por centrifugación a 4 °C a 3 500 X g / 25 min. con hepes 10 mM (2 veces). Para obtener las fracciones celulares. Se sonicó la muestra distribuyéndola en varios tubos en cantidades de 10 a 15 ml sobre baño de hielo. A cada muestra se le sometió a 10 pulsares de 30 a 60 seg con 1 min. de descanso, de tres tiempos cada uno, en baño de hielo con sonicador de punta (Ultrasonic Processor, VC 130, SONICS & MATERIAL INC.). Posteriormente se centrifugó la muestra sonicada a 1,000 X g / 15 min. para la remoción de restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 100,000 X g / 2 hrs. La pastilla que se obtuvo correspondió 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 min. a temperatura ambiente.

Finalmente, la muestra anterior se centrifugó a 100,000 X g / 1 hr. donde el paquete resultante correspondía a membrana externa, la cual se resuspendió en Heps 10mM con inhibidores de proteasas y el sobrenadante correspondió a la membrana interna. La membrana externa se conservó en congelación a -70 °C hasta su uso. En el **Esquema 1** se muestra el diagrama de flujo para la obtención de MVs y PME de *M. haemolytica* A2.

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



V.2.1. Obtención de antígenos a partir de MVs

A partir de MVs, previamente obtenidas, se realizó el sonicado de las mismas, con el fin de exponer todos aquellos factores de virulencia contenidos dentro de ésta incluyendo la LKT. Las muestras de MVs, previamente resuspendidas en 1 ml de Hepes 10 mM con inhibidores de proteasas colectando un total de 10 ml de la muestra. Ésta muestra se colectó un tubo cónico de 50 ml, manteniéndolo en baño de hielo para posteriormente sonificarlo durante 6 pulsares de 10 seg por 3 ciclos, con 5 min. de descanso entre cada ciclo, mediante sonicador de punta (Ultrasonic Processor, VC 130, SONICS & MATERIAL INC.). Posteriormente, la muestra obtenida se centrifugó a 9,000 X g / 15 min. a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se alicuotó en 100 μ l en tubos cónicos de 1.5 ml y se conservó a -70 °C hasta su posterior uso. En el **Esquema 2** se muestra el diagrama de flujo para la obtención de LKT de *M. haemolytica* A2.

Esquema 2: Metodología para la obtención de antígenos a partir de MVS.



V.3. Cinética de crecimiento bacteriano

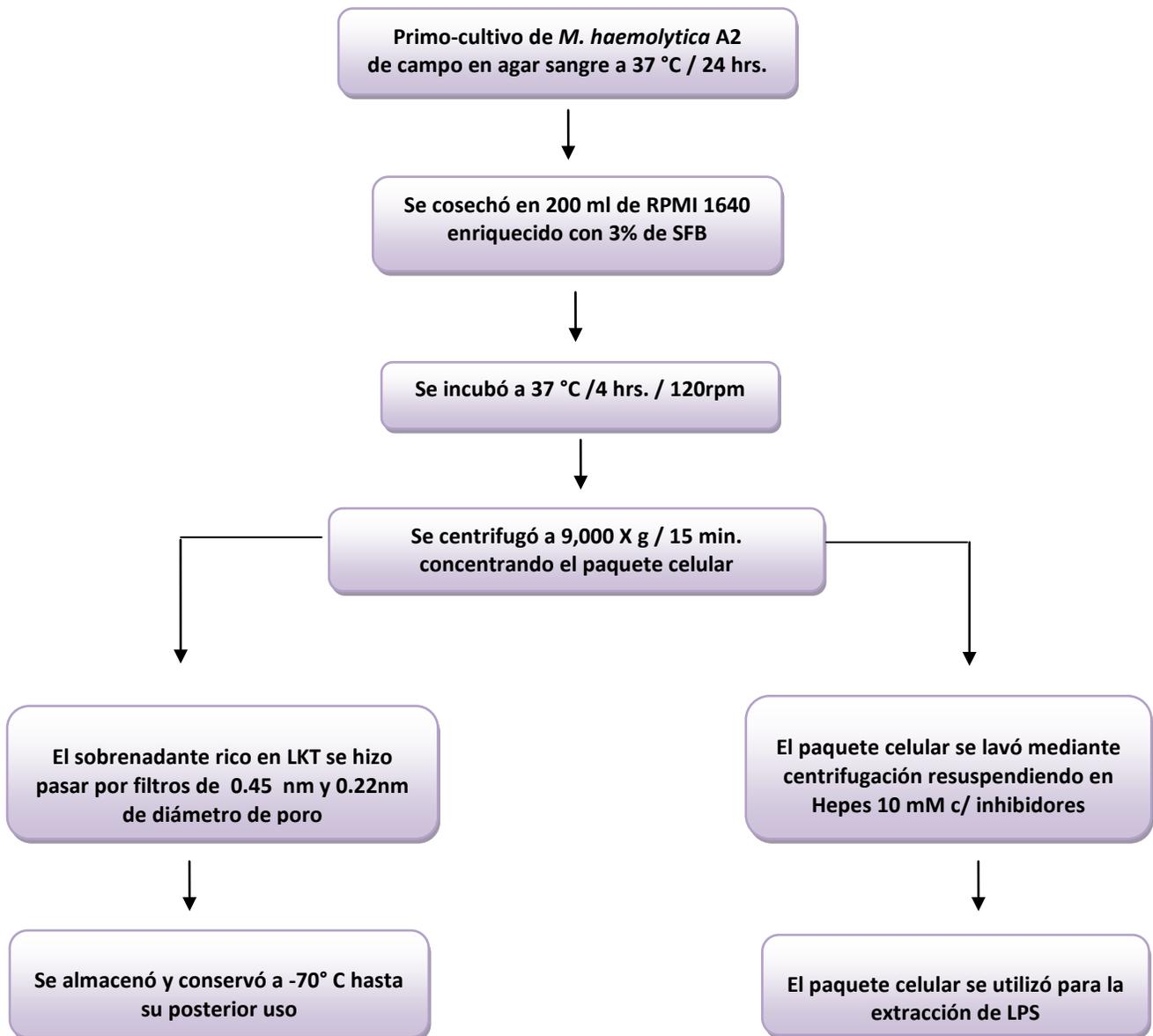
Dadas las características de crecimiento *In vitro* de *M. haemolytica*, así como de la producción de LKT, se realizó una cinética de crecimiento de la bacteria. Esto con la finalidad de establecer la fase franca de crecimiento logarítmico, la cual corresponde al momento de mayor producción de dicha toxina. La cinética se realizó mediante primocultivo en agar sangre y posteriormente se cosechó en medio líquido en matraz nefelométrico con un volumen de 150 ml de BHI enriquecido con 0.5% de extracto de levadura, el cual, se incubó en agitación a 150 rpm a 37 °C. Cada media hora se efectuó la lectura de la densidad óptica del cultivo a 590nm de D.O. Con los datos obtenidos a partir de las lecturas, se realizó una gráfica para determinar la fase franca de crecimiento logarítmico. Paralelamente, se tomaron alícuotas del cultivo durante la cinética y se almacenaron a -70 °C en Hepes 10 mM con inhibidores de proteasas para su conservación y posterior análisis electroforético.

V.3.1. Producción de LKT cruda (LKTc)

A partir de crecimiento bacteriano en medio sólidos sembrados por estría cerrada y bajo las condiciones antes mencionadas, se cosecharon los cultivos en 200 ml de RPMI 1640 (GIBCO) adicionado con 3% de Suero Fetal Bovino (SFB). El medio líquido se llevó a una temperatura de 37 °C y posteriormente se inoculó con la cosecha bacteriana anterior, para incubarlo nuevamente en agitación a 120 rpm a 37 °C por 4 hrs. Esto con el fin de llevar a la bacteria a fase franca de crecimiento logarítmico dentro de un medio rico en nutrientes y obtener así, una adecuada cantidad de LKT. A continuación se centrifugó a 9,000 X g / 20 min. para concentrar el paquete bacteriano y se recuperó el sobrenadante. Éste sobrenadante se hizo pasar por filtros de 0.45 µm y 0.22 µm de diámetro y finalmente éste último, se conservó en alícuotas a -70 °C hasta su posterior uso⁵⁶. En el **Esquema 3**

se muestra el diagrama de flujo para la obtención de LKT cruda de *M. haemolytica* A2.

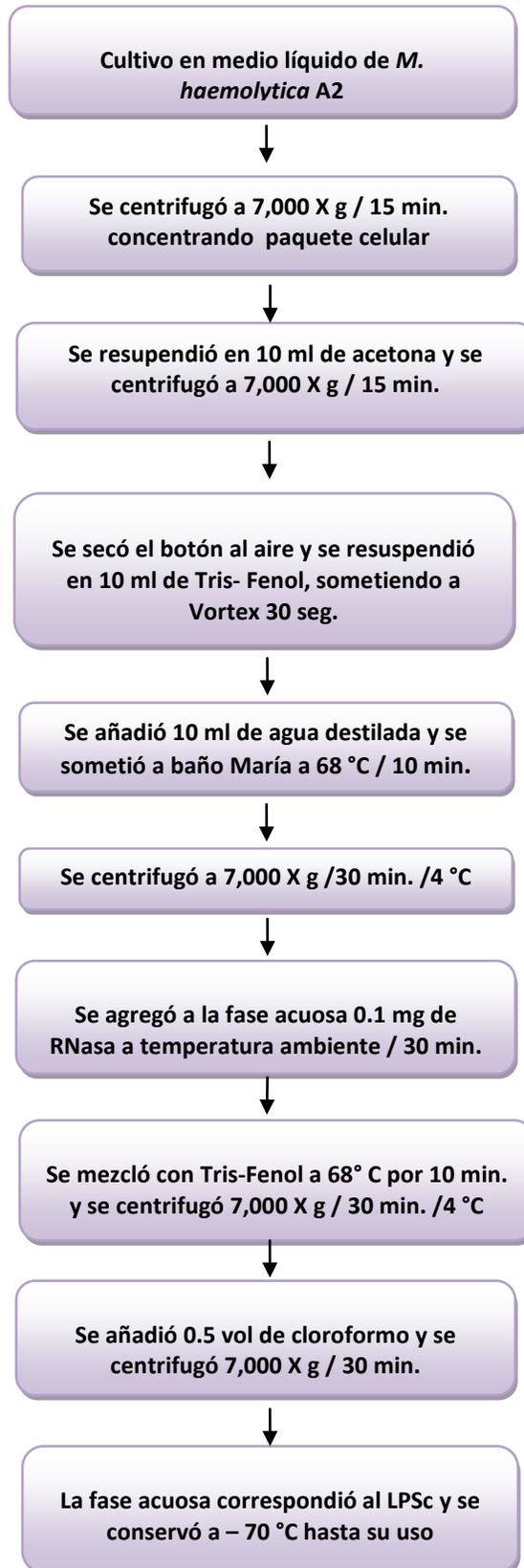
Esquema 3: Metodología para la obtención de LKTc



V.4.Extracción de Lipopolisacárido crudo (LPSc)

Una vez realizada la obtención de LKTc, se procedió a centrifugar el cultivo líquido a 9,000 X g / 15 min. para coleccionar la bacteria. Posteriormente, se resuspendió el botón en 10 ml de acetona y se centrifugó a 9,000 X g nuevamente. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el botón bajo el rocío de aire. Una vez secado, el botón se resuspendió en Tris 10 mM a pH 8.0 saturado con Fenol (Tris-Fenol). Se sometió a la acción del vortex durante 30 seg. y se agregó 10 ml de agua destilada. Posteriormente, se colocó en baño maría a 68 °C durante 10 min, sometiendo la muestra a la acción del vortex, por intervalos de 2 min, 30 seg. A continuación, se centrifugó a 7,000 X g / 30 min / 4 °C. La fase acuosa resultante fue transferida a un nuevo tubo, al cual se le agregó 0.1 mg de RNasa y se dejó actuar a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se mezcló nuevamente con Tris-Fenol y se puso en baño maría a 68 °C durante 10 min, sometiendo la muestra una vez más a la acción del vortex como anteriormente se describió. Dicha muestra se centrifugó a 7,000 X g durante 30 min a 4 °C. La fase acuosa resultante se transfirió a un nuevo tubo y se adicionaron 0.5 volúmenes de cloroformo, volviendo a centrifugar a 7,000 X g durante 30 min a 4 °C. La fase cloroformica se removió y la fase acuosa resultante correspondió al LPS. Finalmente éste, se conservó en alícuotas a -70 °C en tubos cónicos hasta su posterior uso. En el **Esquema 4** se muestra el diagrama de flujo para obtención de LPSc a partir de células completas de *M. haemolytica* A2.

Esquema 4 : Metodología para la extracción de LPSc de *M. haemolytica*.



V.5. Precipitación de proteínas en solución, en presencia de detergentes y lípidos

Se colocaron 200 μ l de la muestra problema a precipitar y se le adicionaron 400 μ l de metanol, esta mezcla de soluciones fue sometida a la acción del vortex por 30 seg para homogenizar. La muestra se centrifugó a 9,500 X g / 10 seg. en microtubos de polietileno de 1.5 ml, para la colección total de la muestra. Posteriormente, a la mezcla anterior se le adicionaron 200 μ l de cloroformo y se sometió una vez más a la acción del vortex. Una vez realizado lo anterior se centrifugó a 9,000 X g / 10 seg. y consecutivamente, se le agregaron 300 μ l de agua desionizada. Esta mezcla se homogenizó energicamente mediante vortex 1 min. y posteriormente se centrifugó por 1 min. en las mismas condiciones. La fase superior fue removida cuidadosamente y desechada. Al resto de la fase clorofórmica y a la interfase con las proteínas precipitadas, se le añadieron 300 μ l de metanol, homogenizando mediante vortex por 1 min. y centrifugando finalmente a 9,000 X g / 2 min. El sobrenadante fue desechado y el botón de proteínas resultante se secó bajo rocío de aire y se conservó -70 °C, hasta su uso ⁷.

V.6. Cuantificación de Proteína por método de Bradford

La cuantificación de proteína por el método de Bradford se realizó en una placa de microtitulación. Antes de realizar la cuantificación de las muestras deseadas, se realizó una curva estándar de menor a mayor concentración con albúmina sérica bovina (ASB) a una concentración de 1 μ g/ μ l en PBS. (**Figura 2**). Posteriormente, se colocaron 10 μ l de la muestra problema más 190 μ l de reactivo de Bradford, mezclando mediante agitación durante 1 min. Finalmente la placa se leyó en lector de ELISA a 590 nm y por regresión lineal se calculó la concentración de proteína, de la muestra problema ⁵⁷.

V.7. Preparación de la muestra para el corrimiento electroforético.

La separación analítica de las proteínas de la fracción de membrana externa y de las MVs, se hizo en función de sus pesos moleculares, utilizando SDS-PAGE por el método de Laemmli ⁵⁸. Se ajustó la concentración de proteínas necesaria a utilizar en el corrimiento electroforético, tanto de la fracción de membrana externa, LKTc, LPSc, así como de las MVs completas y sonicadas.

V.7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

El corrimiento electroforético se realizó con el fin de evidenciar la presencia de LKTc, LPSc, y ambas toxinas a partir de MVs, sonicadas y completas, corriendo paralelamente la fracción de proteínas de membrana externa así como de células completas, permitiendo así establecer los perfiles de proteínas de las diferentes muestras problema.

V.7.2. Condiciones para corrimiento electroforético

Los antígenos se resuspendieron en Hepes 10 mM con inhibidores de proteasas, ajustando el volumen 1:1 con el amortiguador de muestra Laemmli para posteriormente someterse a ebullición (95 °C) durante 10 min. A continuación se colocó la muestra en cada carril en geles al 12% y éstos se corrieron a un voltaje de 80 volts para alinear la muestra en el gel concentrador y 100 volts para el gel separador en solución amortiguadora de corrida. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie durante 1 hr. a temperatura ambiente y en agitación suave, posteriormente se sometieron a una solución desteñidora (Anexo soluciones), hasta visualizar claramente las bandas deseadas y finalmente éstos se conservaron en ácido acético al 10% . En otros casos los geles se sometieron a tinción de plata para lipopolisacárido (LPS).

V.7.3. Tinción de plata para LPS.

Se fijó el gel en una solución fresca que contenía isopropanol al 25% y ácido acético al 7%, durante toda la noche. Se decantó la solución y se oxidó el gel por 5 min. en una solución que contenía 150 ml de agua desionizada, 1.05 g de ácido peryódico y 4 ml de la solución fijadora. Se lavó 8 veces por 15 a 20 min., cada una en 200 ml de agua destilada. Posteriormente se tiñó por 10 min. con una solución fresca que contenía 28 ml de hidróxido de sodio (NaOH al 0.1N), 1.25 ml de hidróxido de amonio (NH_4OH al 29.4%) y 5 ml de nitrato de plata (AgNO_3 al 20%). Después de teñir, se lavó el gel 4 veces en 200 ml de agua destilada por 10 min. cada lavado. Posteriormente se preparó una solución que contenía 50 mg de ácido cítrico 0.5 ml de formaldehído al 37%. Dicha solución se agregó al gel, el cual requirió de 5 a 10 min. hasta obtener la intensidad deseada en las bandas. Para conservar el gel se sumergió por 60 min. en 200 ml de una solución que contenía 10 ml de ácido acético al 7% ⁵⁴.

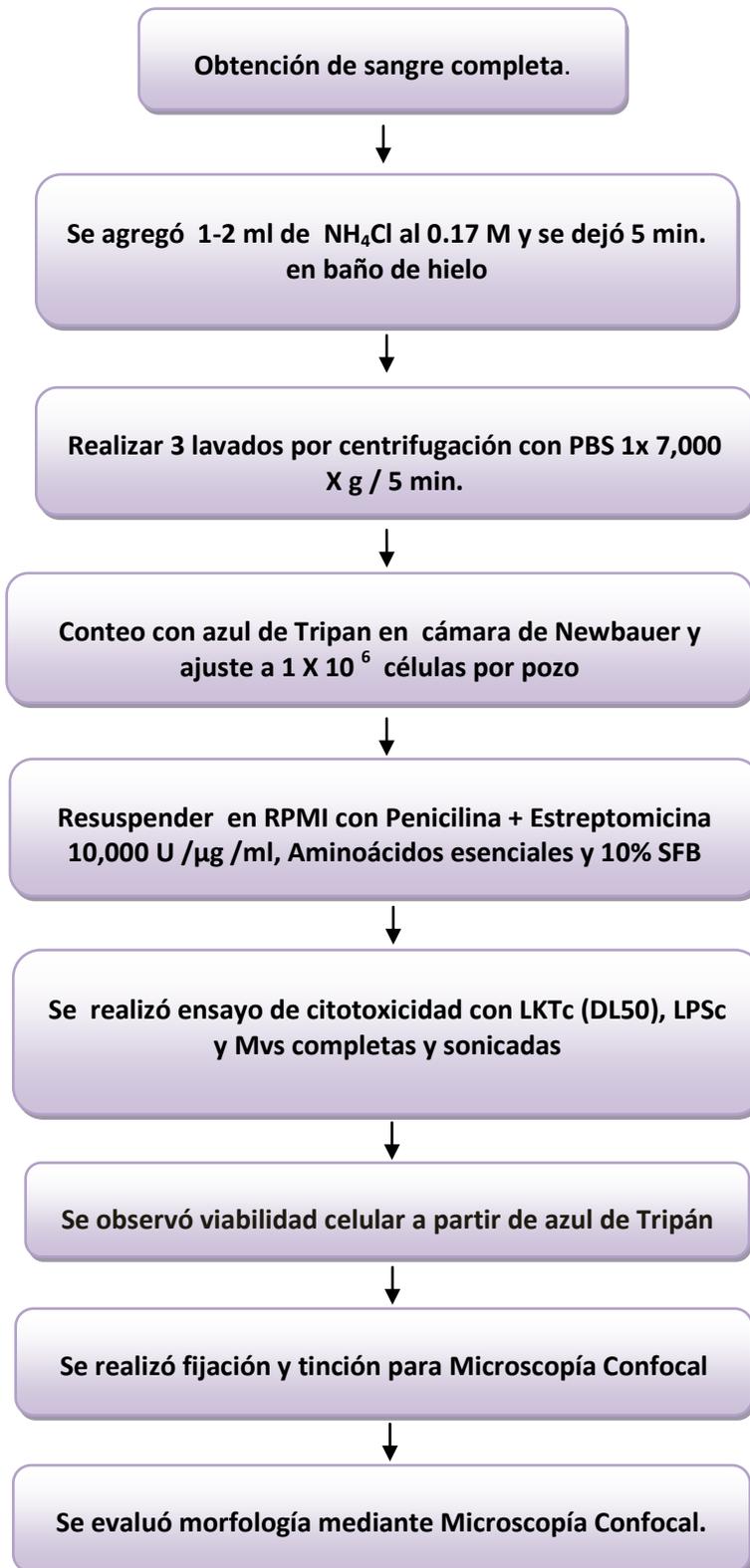
V.8. Obtención de leucocitos sanguíneos de ovino

Se obtuvo un total de 40 ml de sangre completa de un ovino clínicamente sano mediante venopunción de la vena Yugular en tubos Vacotainer con anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA). A continuación en condiciones de esterilidad se colocó la sangre obtenida en tubos cónicos (50ml) y se centrifugó a 7,000 X g / 30 min. Posteriormente, se desechó la fase superior (plasma) y se introdujo una pipeta Pasteur para retirar la interfase que correspondió a los leucocitos. La fase de leucocitos se transfirió a un nuevo tubo cónico de 50 ml y se adicionó de 1 a 2 ml de Cloruro de Amonio (NH_4Cl) al 0.17 M, con el objetivo de lisar eritrocitos de la muestra, dejándola reposar la misma por 5 min. en baño de hielo ⁵⁹. La muestra obtenida se centrifugó a 7,000 X g / 5 min. y se desechó el sobrenadante, colectando únicamente los leucocitos. A continuación, se lavó la muestra mediante centrifugación por 3 veces, con PBS citrato pH 7.4 a 7,000 X g / 5 min. Se retiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 10 ml de PBS 1x, pH 7.4. Se procedió al conteo de las células mediante cámara de Neubauer verificando la viabilidad de las

mismas mediante exclusión de azul de Tripán. Ajustando la concentración final a 1×10^6 células por pozo, en placa de cultivo celular de fondo plano de 24 pozos. Finalmente, a los leucocitos se les adicionó 1 ml de medio de RPMI (GIBCO) enriquecido con 10% de SFB + Antibiótico (Penicilina + Estreptomicina 10,000 U/ μ g/ml).

En el **Esquema 5** se muestra el diagrama de flujo para obtención de leucocitos, así como sus diferentes tratamientos y evaluación experimental *in vitro*.

Esquema 5: Metodología para el ensayo de citotoxicidad con leucocitos de ovino, interaccionando con LKTc, LPSc, MVs completas y sonicadas.



Para los ensayos de la LKTc, LPSc, MVs sonicadas y MVs completas, se montaron ensayos de citotoxicidad, que mantuvieron las mismas condiciones de cultivo Sin embargo, en el caso de la LKTc fue necesario establecer previamente la dosis mínima letal (DL50), de la toxina que tuviera efecto directo sobre el 50% del total de células a evaluar. Este dato, permitió establecer un parámetro de comparación entre los distintos tratamientos de toxinas a evaluar, estableciendo así parámetros de comparación entre los efectos que inducen cada una de éstas. A continuación se describe cada uno de ellos:

V.9. Ensayo de citotoxicidad para la obtención de la Dosis Letal 50 (DL50) a partir de LKT cruda (LKTc)

La DL50, se traduce en la cantidad de LKTc requerida, que resulta letal para el 50% de un 100% de células mantenidas en condiciones de cultivo celular. Esto con la finalidad de demostrar la actividad citotóxica de la toxina secretada por *M. haemolytica* A2 y determinar la mínima concentración necesaria para ejercer efecto directo sobre dichas células. Para la realización de este ensayo, se procedió a incubar a los leucocitos de ovino durante 1 hr. / 37 °C, en agitación a 120 rpm. Se realizaron diluciones dobles del sobrenadante rico en LKT, tomando inicialmente 100µl de ésta, más 100µl de RPMI 1640 llevándolo a un volumen final de 200µl (1:2) en un tubo cónico de 1.5 ml. Posteriormente se homogenizó la muestra y a partir de ahí, se procedió a realizar la dilución dobles en 7 tubos cónicos que contenían previamente 100µl de RPMI 1640. Al llegar a la dilución 1×10^{-7} , se desecharon los 100µl restantes. Las células que se encontraban en placa de cultivo bajo las condiciones antes mencionadas, adicionandoles las diferentes diluciones del extracto crudo de LKT, manteniendo los cultivos en agitación constante a 37 °C, en incubadora de CO₂. (**Figura 3**). Transcurrida 1 hr. se realizó extracción de las células para su posterior conteo mediante cámara de Neubauer previa tinción con azul de Tripán. Esto con el fin de determinar el % de mortalidad celular por efecto de la toxina.

A continuación, se procedió a extraer las células de las placas de cultivo, lavando por centrifugación, con PBS 1X a 7,000 X g / 5 min. repitiendo el procedimiento 3 veces para eliminar los restos de medio de cultivo. Finalmente se agregó paraformaldehído al 4.0%, con la finalidad de fijar las células para su posterior tratamiento de tinción y observación mediante Microscopia Confocal.



Figura 2. Ensayo de citotoxicidad para determinar la DL50. Placa de cultivo celular mostrando las diferentes concentraciones de LKTc. En el pozo 1 se muestra el control negativo que corresponde a células sin tratamiento alguno. En el pozo 2 se muestra la LKTc al 100% y en los siguientes pozos se muestra las respectivas diluciones de la misma.

Una vez obtenida la DL50 de LKTc, se procedió a realizar el ensayo de citotoxicidad con las diferentes muestras a evaluar (LPSc, MVs completas y soncadas), considerando 300µg de concentración para establecer daño.

V.10. Ensayo de citotoxicidad para evaluar LKTc (DL50), LPSc, MVs completas y MVs sonicadas

Para esta evaluación fue necesario incubar a los leucocitos de ovino en las mismas condiciones antes mencionadas, en las que fue obtenida la DL50. Una vez que las células se encontraban adaptadas a las condiciones de cultivo en la placa (1×10^6), se dividieron en 5 grupos distribuidos de la siguiente manera Grupo A: células sin tratamiento, Grupo B: células tratadas con LKTc, Grupo C: células tratadas con LPSc,

Grupo D: células tratadas con MVs completas y Grupo E: células tratadas con MVs sonicadas. Posteriormente se procedió a desafiar con 300 μg de DL50 de LKTc, LPSc, MVs completas y MVs sonicadas respectivamente. Estas se incubaron a 37 °C /1 hr. en agitación a 120 rpm. Todo lo anterior se realizó por duplicado. Transcurrido el tiempo de exposición, se procedió a colectar las células, bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Estableciendo % de mortalidad en cada uno de los casos mediante exclusión con azul de Tripán. En la **Figura 4** se muestran las condiciones de cultivo, así como del ensayo de citotoxicidad y su posterior conteo para establecer % de mortalidad.

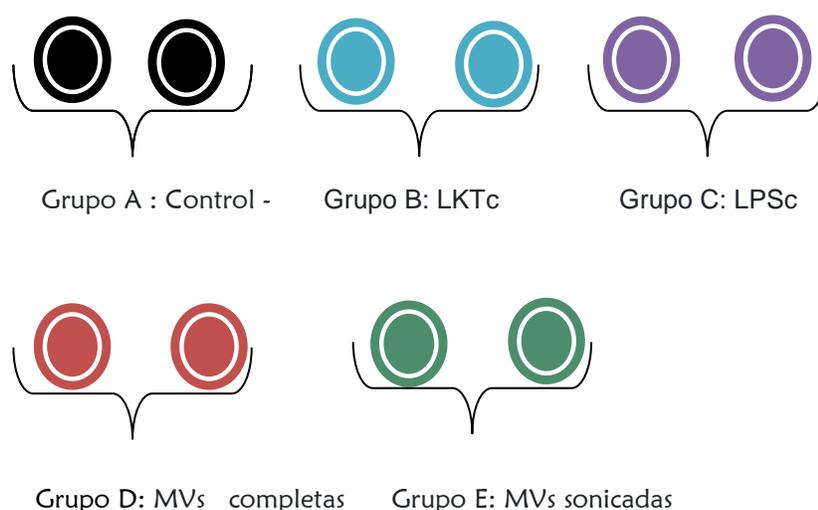


Figura 3. Placa de cultivo celular mostrando los diferentes tratamientos.

En los pozos 1 y 2 se muestra el Grupo A: control negativo que correspondió a células sin tratamiento alguno. En los pozos 3 y 4 se muestra al Grupo B: control positivo que correspondió a células sometidas a la DL50 de LKTc. Los pozos 5 y 6, muestran al Grupo C: control positivo: células expuestas a LPSc. Los pozos 7 y 8, corresponden al Grupo D: células tratadas con MVs completas y finalmente, los pozos 9 y 10 que corresponden al grupo E de células sometidas a MVs sonicadas.

V.11. Microscopía Confocal

Tinción de leucocitos con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Para realizar la tinción de los leucocitos con isotiocianato de fluoresceína (FITC), las células previamente fijadas en paraformaldehído al 4%, se lavaron mediante centrifugación con PBS 1X a 7,000 X g / 10 min. El botón celular se resuspendió en 500 μ l de PBS 1X con 2 μ g de FITC y se dejó en agitación suave durante toda la noche a 4 °C, manteniéndolas en microtubos de 1.5 ml cubiertos con papel aluminio en su totalidad, para evitar la exposición de los mismos a la luz, esto con la finalidad de mantener una mayor intensidad de fluorescencia. Posteriormente se realizaron 4 lavados mediante centrifugación con PBS 1x a 7,000 X g / 10 min. Al termino de los lavados, se realizó el montaje de las células, colocando una gota de la suspensión celular en un portaobjetos limpio y desengrasado. Posteriormente, se calentó (40 °C) una platina térmica, para secar y fijar las células al vidrio del portaobjetos. A continuación, a la muestra de células, se le agregó una gota de medio de montaje (Vectashield), colocando finalmente un cubreobjetos, para su posterior observación mediante Microscopía Confocal, manteniendo las muestras todo el tiempo protegidas la luz. Se realizaron de 8 a 10 cortes transversales por célula de 0.5-1 μ m de ancho con el microscopio confocal.

VI.Resultados

VI.1. SDS PAGE al 12% de MVs de *M. haemolytica* A2

Se realizó corrimiento electroforético mediante SDS-PAGE al 12% con el fin de evidenciar los perfiles proteicos de las MVs de *M haemolytica* A2. En la **Fig.4**, se muestra un gel, teñido con azul de Comassie, donde se corrieron muestras de MVs con concentraciones de 5 μ g y 15 μ g de proteína respectivamente. En ambos casos, fue evidente la presencia de la LKT contenida en éstas estructuras, evidenciandose una banda de aproximadamente 104 kDa que correspondió a la LKT de la bacteria. Así mismo, se observaron incontables bandas de proteínas que caracterizan los perfiles proteicos de éstas estructuras ⁷.

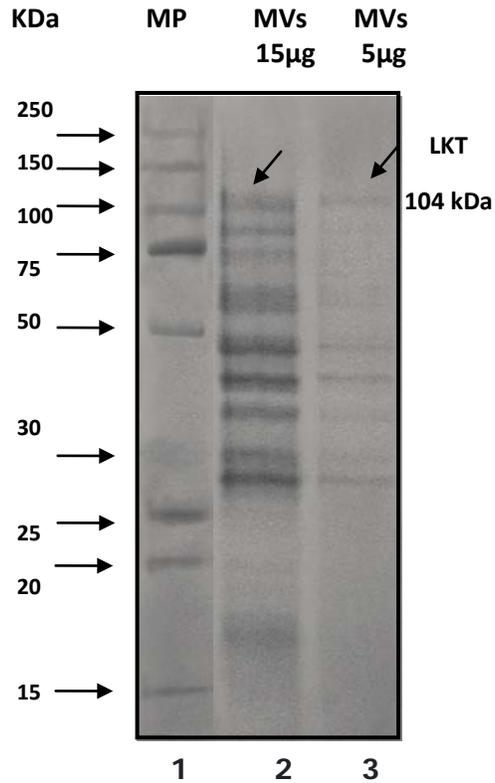


Figura 4. SDS-PAGE al 12% de MVs de *M. haemolytica* A2. En el 1^{er} carril se observa el marcador de peso molecular standard, en el 2^{do} carril se corrió una muestra que contenía 15 µg de proteína, donde se observa con claridad el perfil de proteínas que arrastran las MVs de *M. haemolytica* A2, las flechas indican la presencia de la LKT en dichas estructuras. El 3^{er} carril, muestra un corrimiento con 5 µg de proteína de MVs.

VI.2. SDS-PAGE al 12% de la fracción de PME

Las muestras de PME así como de MVs de *M. haemolytica* A2, se corrieron paralelamente, mediante SDS-PAGE al 12% (Fig.5) con la finalidad de establecer los patrones proteicos tanto de la fracción de PME como de las MVs, observándose entre ellas una gran cantidad de bandas proteicas que comparten dichas estructuras. Es evidente que la LKT sólo es arrastrada en MVs y no esta presente en la fracción de PME. Sin embargo, el LPS es arrastrado tanto en MVs como en la fracción de PME por ser éste parte constitutiva de la membrana externa de la bacteria.

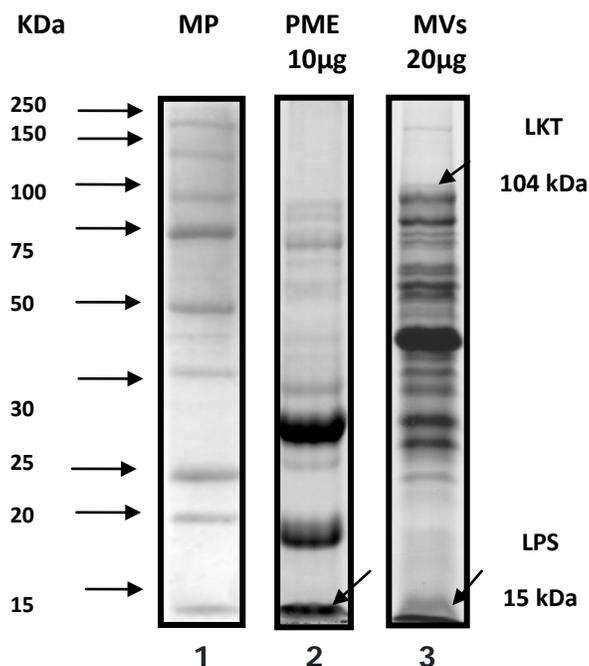


Figura 5. SDS-PAGE al 12% de PME y MVs de *M. haemolytica*. SDS-PAGE al 12 % teñido con azul de Comassie que muestra en el 1^{er} carril el marcador de peso standard. En el 2^o carril se muestran 10 µg de PME. En el 3^{er} carril se muestran 20 µg de MVs. Las flechas sobre el 2^{do} y 3^{er} carril al fondo de los mismos, muestran el LPS y la flecha superior del 3^{er} carril muestra una banda de 104 KDa correspondiente a la LKT.

VI.3. SDS-PAGE al 12% de MVs completas y MVs sonicadas

Se realizó corrimiento electroforético mediante SDS-PAGE al 12%, para establecer los patrones proteicos de las MVs completas y sonicadas, evidenciando la presencia de la LKTc en ambas muestras. Es evidente entonces que la LKT de 104 kDa está presente en MVs completas y una vez que éstas se someten al proceso de sonicación, la LKT sigue presente con el mismo peso molecular. Por lo que dicho procedimiento no afectó estructuralmente a la toxina. El corrimiento electroforético nos permitió corroborar la presencia tanto de LKT como de LPS (**Fig.10**) en ambas muestras de MVs (completas y sonicadas) (**Fig.6**), estableciendo comparativamente la banda de aproximadamente 104 kDa de MVs con la banda proteica obtenida a partir de sobrenadante de cultivo en fase logarítmica de la LKTc.

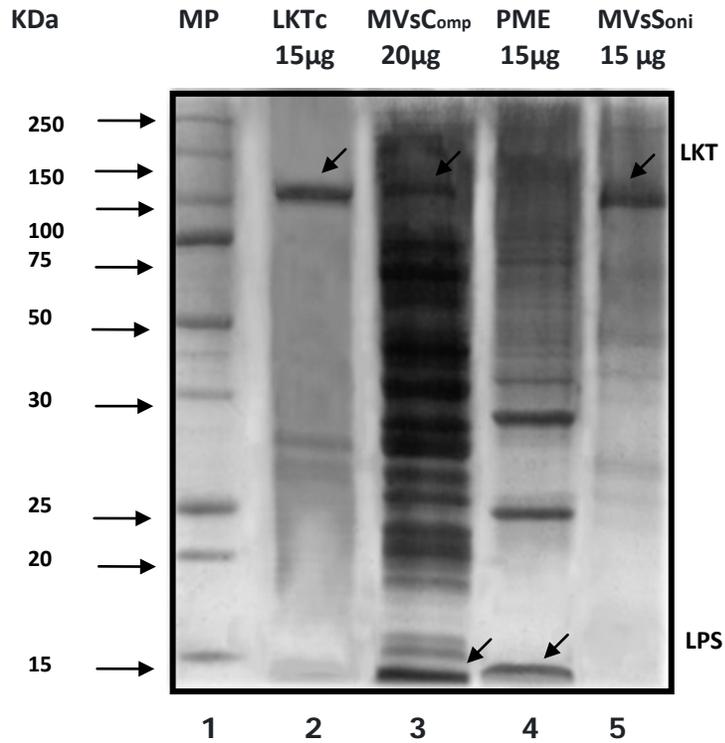


Figura 6. SDS-PAGE al 12% evidenciando la presencia de PME . En el 1^{er} carril se encuentra el marcador de peso molecular standard. En el 2^{do} carril se aprecia LKTc obtenida de sobrenadante de cultivo durante la fase Logarítmico En el 3^{er} carril se corrió una muestra de MVs comp (completas). En el 4^{to} carril se aprecia, la fracción de PME de *M. haemolytica* A2. En el 5^{to} carril se aprecian Mvs soni (sonicadas). En el 2^{do}, 3^{er} y 5^{to} carril se observa una banda ligeramente por arriba del marcador de 100 kDa, que corresponde a la LKT, de la bacteria y en el 3^{er} y 4^{to} carril se aprecia al fondo de los mismos la presencia de LPS.

VI.4. Determinación de la fase de crecimiento logarítmico (Log.) de *M. haemolytica* A2

La cinética de crecimiento de *M. haemolytica* A2, permitió establecer el tiempo en que dicha bacteria alcanza su fase franca de crecimiento logarítmico (Log.), es en este momento en que la bacteria produce una mayor cantidad de LKT. A partir de alícuotas obtenidas cada media hora del sobrenadante de cultivo, se realizó la lectura de las mismas mediante densitometría óptica (D.O), hasta completar un total de 5 hrs. de crecimiento. Los valores más altos de D.O., se obtuvieron a la 4^o hr. de incubación como se muestra en la siguiente gráfica (Fig.7). Para evidenciar la presencia de LKT en los sobrenadantes de cultivo durante la cinética, se procedió a cuantificar proteína por el método de Bradford y posteriormente las muestras se analizaron mediante SDS- PAGE al 12%, (Cuadro 4).

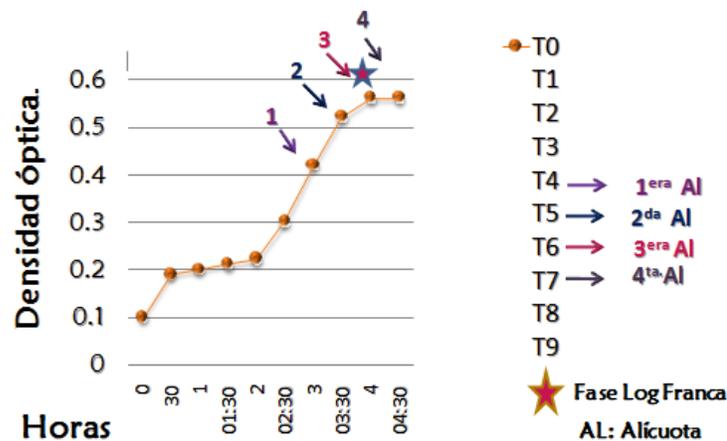


Figura 7. Gráfica de cinética de producción de LKTc de *M. haemolytica* A2. En el eje de las "Y", se muestran los valores de D.O. En el eje de las "X" se muestra el tiempo transcurrido de lectura. Como se puede observar, el valor más alto de D.O se registró a la 4^{ta} hr. de crecimiento, la cual correspondió a la fase franca de crecimiento log. Las flechas sobre el gráfico muestran el tiempo y el valor de D.O de las alícuotas muestreadas.

VI.5. SDS-PAGE al 12% de las alícuotas obtenidas durante la cinética de producción de la LKTc

Para evidenciar la presencia de la LKTc obtenida a partir de sobrenadante de cultivo en fase Log. de *M. haemolytica* A2, se procedió a preparar y correr en SDS-PAGE al 12% las alícuotas, como se describió anteriormente. En cada carril se colocaron 10 μg de la muestra ajustando la misma concentración en todos los casos, ya que ésta varió dependiendo del tiempo en que se colectó la alícuota, como lo muestra el **Cuadro 4**. Es evidente sobre el gel, en todos los casos, la presencia de una banda de 104 kDa que corresponde a la LKTc.

Cuadro 4. Concentración de proteína de las diferentes alícuotas obtenidas de la cinética de producción de LKTc de *M. haemolytica* A2.

Muestra	Alicuota 1	Alicuota 2	Alicuota 3	Alicuota 4
Proteína ($\mu\text{g} / 10 \mu\text{l}$)	3.9	4.87	6.47	8.97

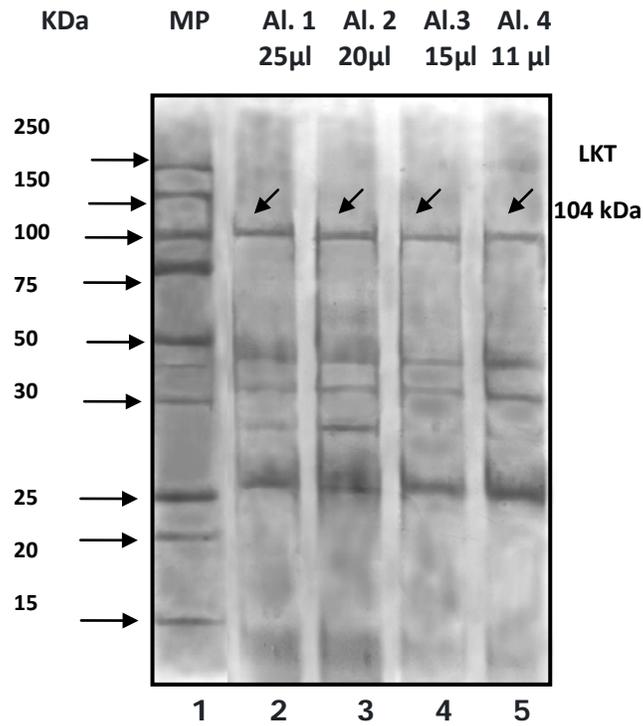


Figura 8. SDS-PAGE al 12% de la LKTc obtenida a partir la cinética de producción. En el 1^{er} carril se observa el marcador de peso molecular standard. Del 2^{do} al 5^{to} carril se corrieron las alícuotas obtenidas en los diferentes tiempos de la cinética de producción. Es evidente en todos los casos, la presencia de una banda de 104 kDa marcada con flechas que corresponde a la LKTc.

VI.6. Producción de LKTc en RPMI 1640 para la realización del ensayo de citotoxicidad

Establecer el momento en que *M. haemolytica* se encuentra en su fase franca de crecimiento Log. permitió determinar en que tiempo se obtiene la máxima producción de LKTc en un medio enriquecido (RPMI 1640) para la misma, esto con el fin de una obtener un mayor rendimiento en la producción de la toxina. Mediante SDS-PAGE al 12%, se evidenció la presencia de LKTc, obtenida a partir de dicho medio, (Fig. 10) para su posterior uso en los ensayos de citotoxicidad.

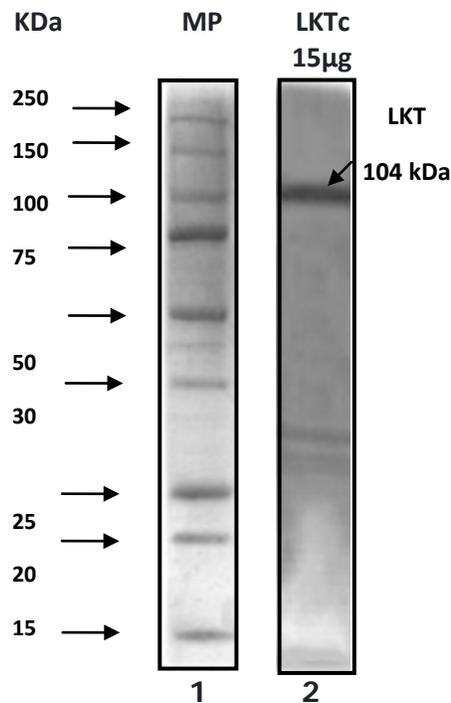


Figura 9. SDS-PAGE al 12% de la LKT obtenida a partir de RPMI 1640. En el 1^{er} carril se observa el marcador de peso molecular standard. El 2^{do} carril corresponde a LKT obtenida a partir de RPMI 1640. Sobre el corrimiento se muestra, la presencia de una banda de 104 kDa marcada con flecha que corresponde a la LKTc.

VI.7. SDS-PAGE al 12% del Lipopolisacárido crudo (LPSc) obtenido a partir de cultivo bacteriano

Se procedió al corrimiento electroforético de la fracción de PME así como de MVs completas. En ambas fracciones, se procedió a determinar la presencia del LPS mediante tinción de plata modificada para dicha estructura. Como se aprecia en la **Figura 10**, tanto la fracción de PME como de MVs, evidencian la presencia de LPS, el cual se observa como una banda de color café oscuro en el fondo de ambos carriles a nivel de los marcadores de 10 a 15 kDa. Corroborando así, que las MVs de *M. haemolytica* A2, arrastran durante su proceso de formación, LPS a partir de membrana externa.

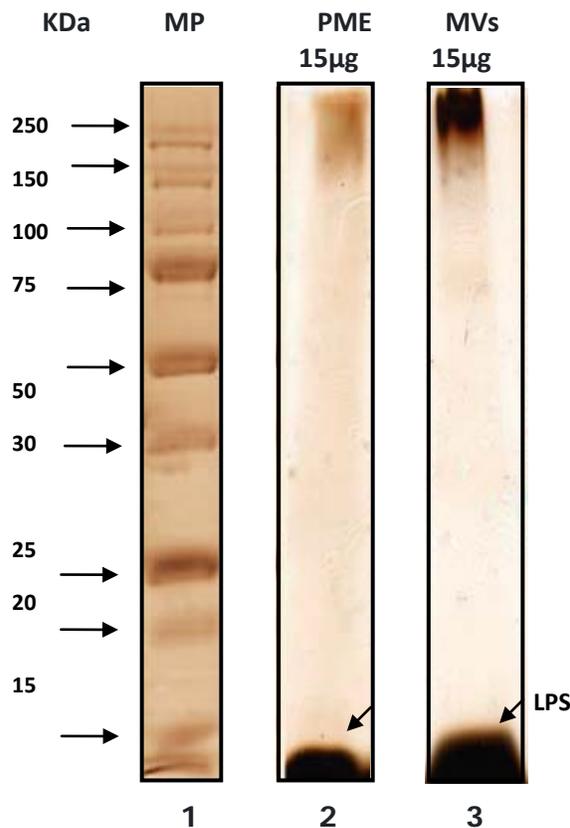


Figura 10. SDS-PAGE al 12% teñido con plata para evidenciar LPS. En el 1^{er} carril, se aprecian los marcadores de peso molecular standard, en el 2^{do} carril se observa la fracción de PME. En el 3^{er} carril, se muestra corrimiento de MVs completas. En los últimos dos carriles, se aprecia al fondo de los mismos, una banda de color café oscuro que se ubica entre los marcadores de 15 kDa y 20 kDa, que corresponde al LPS.

VI.8. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50).

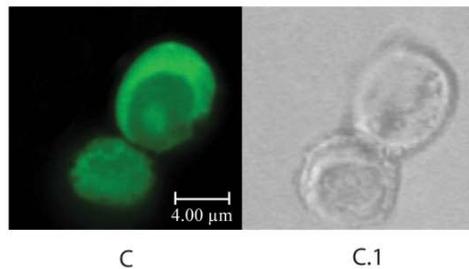
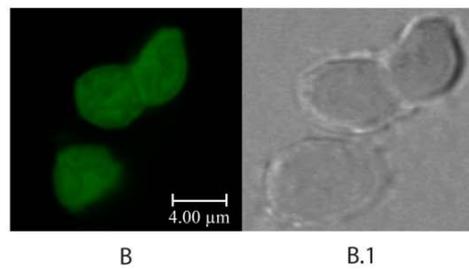
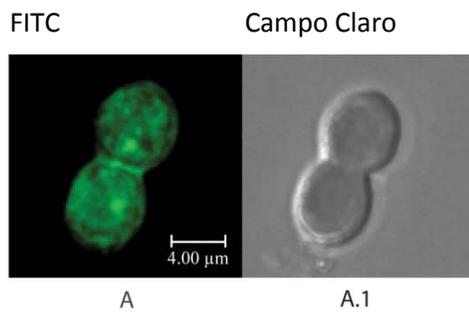
La determinación de la DL50 reveló, que a 300 μg de la LKTc concentrada al 100%, causó la muerte celular del 50% de las células estandarizadas a 1×10^6 , por pozo en placa de cultivo celular. Una vez establecida la concentración de la DL50 de la LKTc, se procedió a homogenizar la concentración de proteína de LPSc, MVS completas y MVs sonicadas. Lo anterior se realizó, con el fin de homogenizar la concentración de las toxinas a evaluar en todos los casos. Estableciendo el daño celular, por efecto de las diferentes muestras con efecto citotóxico (LKTc, LPSc y MVs completas y sonicadas). Es importante mencionar que se decidió evaluar por separado el LPSc, ya que ésta endotoxina es arrastrada *per se*, en la envoltura de la MVs y podría enmascarar el efecto de la LKTc. Por lo que se separó y evaluó de forma independiente, utilizándola en el ensayo de citotoxicidad como control positivo, estableciendo así, el efecto y las diferencias que induce dicha endotoxina, con respecto a las induce la LKTc y las respectivas toxinas que arrastran las MVs completas y sonicadas.

VI.9 Microscopía Confocal

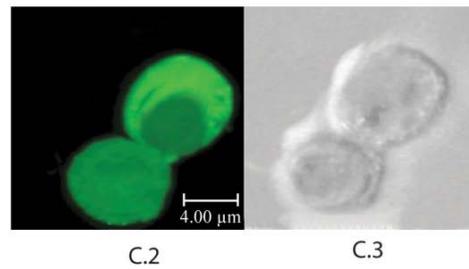
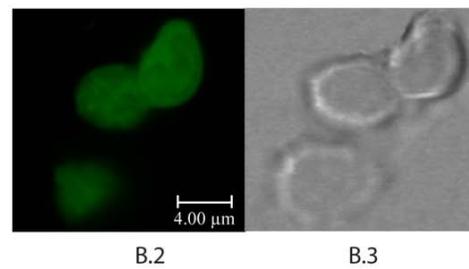
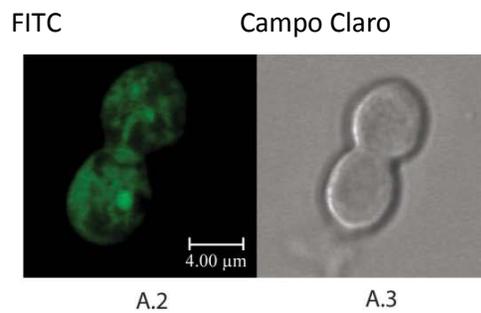
Grupo A: control (-) de mononucleares sanguíneos.

El Grupo A, correspondió al control (-) de mononucleares sanguíneos que no recibieron tratamiento alguno. Las células se resuspendieron únicamente en RPMI 1640 y se mantuvieron en las mismas condiciones que el resto de los grupos tratados. La evaluación de éstas células mediante Microscopía Confocal, reveló integridad de las membranas citoplasmáticas teñidas con FITC. Los diferentes cortes realizados a las células, revelaron la morfología intacta de las membranas citoplasmáticas y en algunos casos se evidenció la morfología e integridad nuclear, lo cual nos permitió establecer el tipo celular (linfocitos o monocito). Las características observadas en este grupo, determinaron los patrones morfológicos comparativos entre los diferentes grupos tratados. En el **Cuadro 5**, se muestran linfocitos principalmente, a los cuales, dadas las características de microscopía utilizadas, se les realizaron cortes longitudinales de 0.5 a 1.0 μm . Determinando así, posibles alteraciones bajo la observación y evaluación de un determinado corte. En los paneles A, A.1, A.2 y A.3, del **Cuadro 5**, se observa claramente la integridad de la membrana citoplasmática así como la presencia nuclear y la integridad de la membrana nuclear. Conservando dichas características en todos los cortes realizados, en el panel A.2, se muestra el 2° corte a la célula, confirmando así las características antes mencionadas. En el panel B, se muestra un grupo de monocitos que conservan su integridad nuclear y citoplasmática. El panel B.2, muestra el 5° corte a las células, que denotan las características morfológicas antes mencionadas. Así mismo, el mayor tipo celular evaluado en este grupo, correspondió a linfocitos, los cuales conservaron intactas sus membranas citoplasmáticas y nucleares, como se aprecia en panel C: máxima proyección y C.2: 3° corte respectivamente.

Máxima Proyección



Cortes



Cuadro 5. Grupo A: control (-) de mononucleares sanguíneos sin tratamiento. Panel A muestra un grupo de linfocitos en máxima proyección. Panel A.1 muestra campo claro de la imagen anterior. Panel A.2 corresponde al 2^{do} corte a la misma y el panel A.3 muestra campo claro respectivamente. En el panel B, se muestra un grupo de monocitos en máxima proyección. En el panel B.1, se muestra el campo claro respectivo. En el panel B.2, se observa el 5^{to} corte a las células y el panel B.3, corresponde al campo claro respectivo. En el panel C, se aprecia un grupo de linfocitos en máxima proyección y el panel C.1 corresponde al campo claro respectivo. Finalmente en el panel C.2 se observa el 3^{er} corte a las células con su respectivo campo claro (panel C.3).

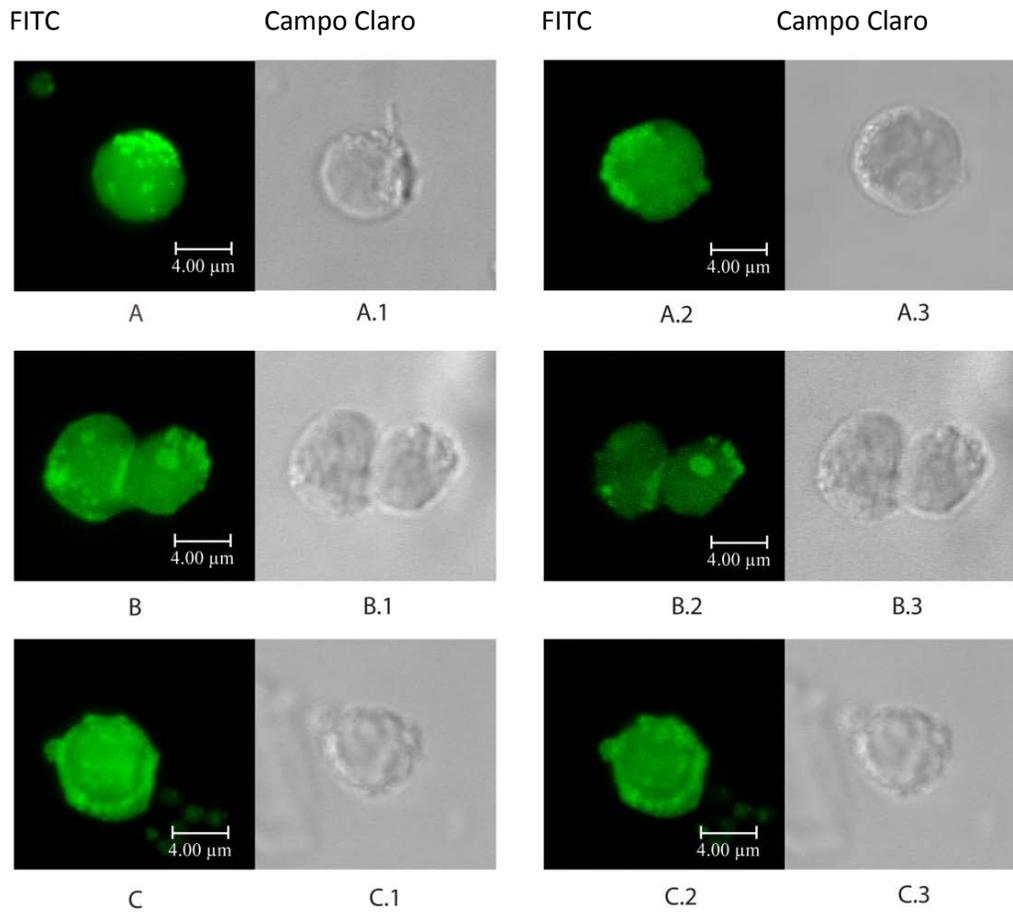
Grupo B: control (+) de mononucleares sanguíneos, tratados con DL50 de LKTc de *M. haemolytica* A2

El Grupo B, correspondió, al control (+) de mononucleares sanguíneos tratados con la DL50 (300 μ g) de la LKTc. La evaluación mediante Microscopía Confocal de este grupo, evidenció una serie de estructuras a nivel de membrana celular, compatibles con la formación de múltiples poros en las superficies de la mismas (**Cuadro 6**). La tinción con FITC, exacerbó cúmulos del colorante, que en los diferentes cortes persistieron solo a nivel de membrana citoplasmática. Otra característica observada correspondió a la modificación de la morfología celular. La LKT pertenece a la familia de toxinas RTX, las cuales se sabe, lisan sus células blanco, a través de la formación de poros transmembranales y eventualmente lisis celular. El tamaño del poro que induce la LKT, varía entre las diferentes especies de la bacteria, los cuales pueden ir de 0.6 a 1 nm⁶⁰⁻⁶² y hasta los 2-3 nm de diámetro^{63,64}. El mecanismo de formación del poro transmembranal inducido por la LKT de *M. haemolytica*, no ha sido descrito aún. Sin embargo, se podría sugerir que su formación ocurre de manera similar al mecanismo de acción observado en otras toxinas de la familia de las RTX⁶⁵. En el panel A del **Cuadro 6**, se aprecia un linfocito que ha perdido su núcleo y evidencia en la superficie de la membrana citoplasmática, pérdida de continuidad y cúmulos multifocales de FITC, que en sus diferentes cortes a la misma, se muestran constantes sobre dichas estructuras. El panel A.2 muestra el 6^{to} corte a la misma, donde se observan claramente los poros transmembranales en los diferentes polos de la célula. En otros casos, como se muestra en el panel B, fue evidente la fragmentación del contenido nuclear en el interior de la célula, lo cual se observó como conglomerados densos homogéneos en el interior de la misma. Así mismo, se aprecian en la superficie celular, que sugieren dichos poros. En el panel B.2, se muestra el 4^{to} corte a las células, donde es evidente la pérdida de continuidad de la superficie celular, además de la exacerbada evidencia de poros transmembranales. En el panel C, se observa un linfocito en

máxima proyección con núcleo evidente, que presenta múltiples poros en su superficie. El panel C.2, correspondió al 9° corte a la célula, donde se aprecia pérdida de la continuidad de la membrana, así como distensión de la misma hacia uno de los polos (ángulo superior derecho) de dicha célula.

Máxima Proyección

Cortes



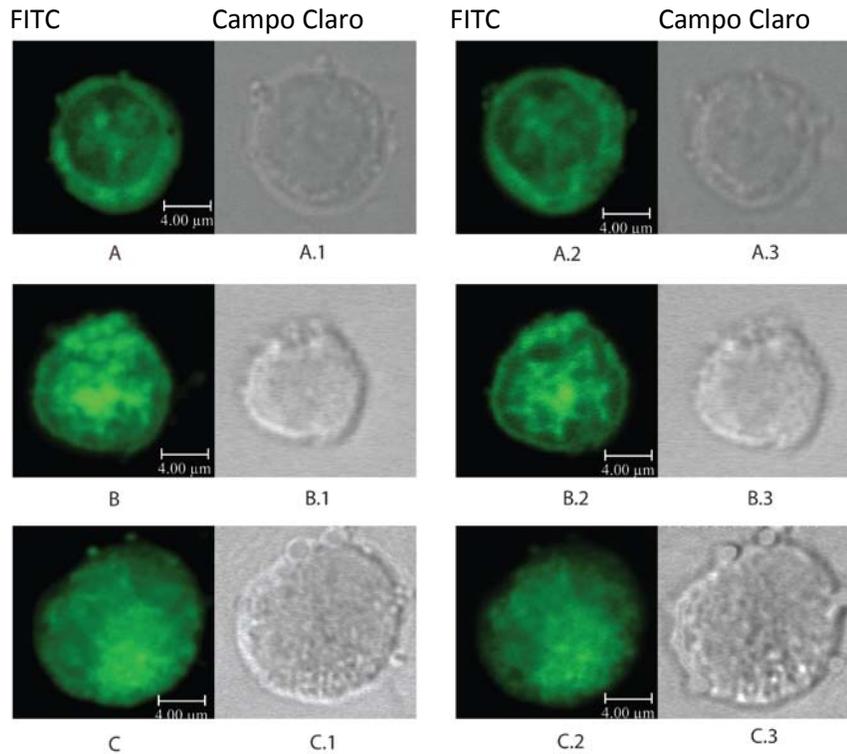
Cuadro 6. Grupo B: Mononucleares sanguíneos tratados con la DL50 de LKTC de *M. haemolytica* A2. En la imagen del panel A, se aprecia un linfocito en máxima proyección. El panel A.1 muestra el campo claro respectivo. El panel A.2, corresponde al 6^{to} corte de dicha célula. El panel A.3 muestra el campo claro de la célula anterior. El panel B, muestra un grupo de linfocitos en máxima proyección. En el panel B.1 se observa el campo claro respectivo. El panel B.2, muestra el 4^{to} corte a la imagen anterior. El panel C, muestra un linfocito en máxima proyección, C.1 muestra el campo claro respectivo, el panel C.2 correspondió al 9^{no} corte, que denota marcada pérdida de continuidad a la membrana celular y finalmente el panel C.3 corresponde al campo claro de la célula anterior.

Grupo C: control (+) de mononucleares sanguíneos, tratados con LPS de *M. haemolytica* A2

El grupo C correspondió, al control (+) de mononucleares sanguíneos tratados con 300 μ g de LPS extraído de la bacteria. La evaluación mediante Microscopía Confocal de este grupo celular se observa en el **Cuadro 7**. La imagen del panel A, corresponde a linfocitos que conservan claramente su núcleo. Sin embargo, es posible observar un citoplasma de aspecto granular, que evidencia diferentes densidades en dicha estructura, así mismo se aprecia, pérdida de la continuidad de la membrana citoplásmica. El LPS induce la salida de K⁺, el influjo de Ca₂⁺, como consecuencia existe una hinchazón osmótica coloidal. Lo anterior se confirma con la imagen del panel A.2 que corresponde al 3^{er} corte de dicha célula. La célula del panel B muestra marcada alteración a nivel nuclear, donde se aprecia cromatina laxa que se condensa a la periferia de la membrana nuclear, muestra una célula agrandada debido a la hinchazón osmótica y marcado acúmulo con formación de vacuolas en el polo superior de la superficie celular. En el panel B.2, muestra el 6^{to} corte de dicha célula evidenciando la presencia de las características antes mencionadas. En el panel C, se muestra un linfocito con marcada fragmentación nuclear, así como citoplasma de aspecto granular, hinchazón osmótica y evidente vacuolización en la superficie de la misma. En el panel C.2 se muestra en 8^{vo} corte a dicha célula evidenciando el daño celular y nuclear.

Máxima Proyección

Cortes



Cuadro 7. Grupo C: Mononucleares sanguíneos tratados con LPS de *M. haemolytica* A2. El panel A muestra la máxima proyección de un linfocito el cual conserva su núcleo. El panel A.1 muestra éste linfocito en campo claro. El panel A.2 muestra el 3^{er} corte de dicha célula, así como su campo claro (A.3). En el panel B se muestra la máxima proyección de un linfocito con marcada alteración a nivel nuclear y de membrana citoplasmática. El panel B.1 muestra el campo claro respectivo. El panel B.2 muestra el 6^{to} corte de dicha célula evidenciando las características antes mencionadas junto con su campo claro (B.3). El panel C muestra un linfocito en máxima proyección evidenciando fragmentación nuclear y citoplasma de aspecto granular y su respectivo campo claro (C.1). Finalmente el panel C.2 muestra el 8^{vo} corte de dicha célula evidenciando el daño celular y nuclear con su respectivo campo claro (C.3).

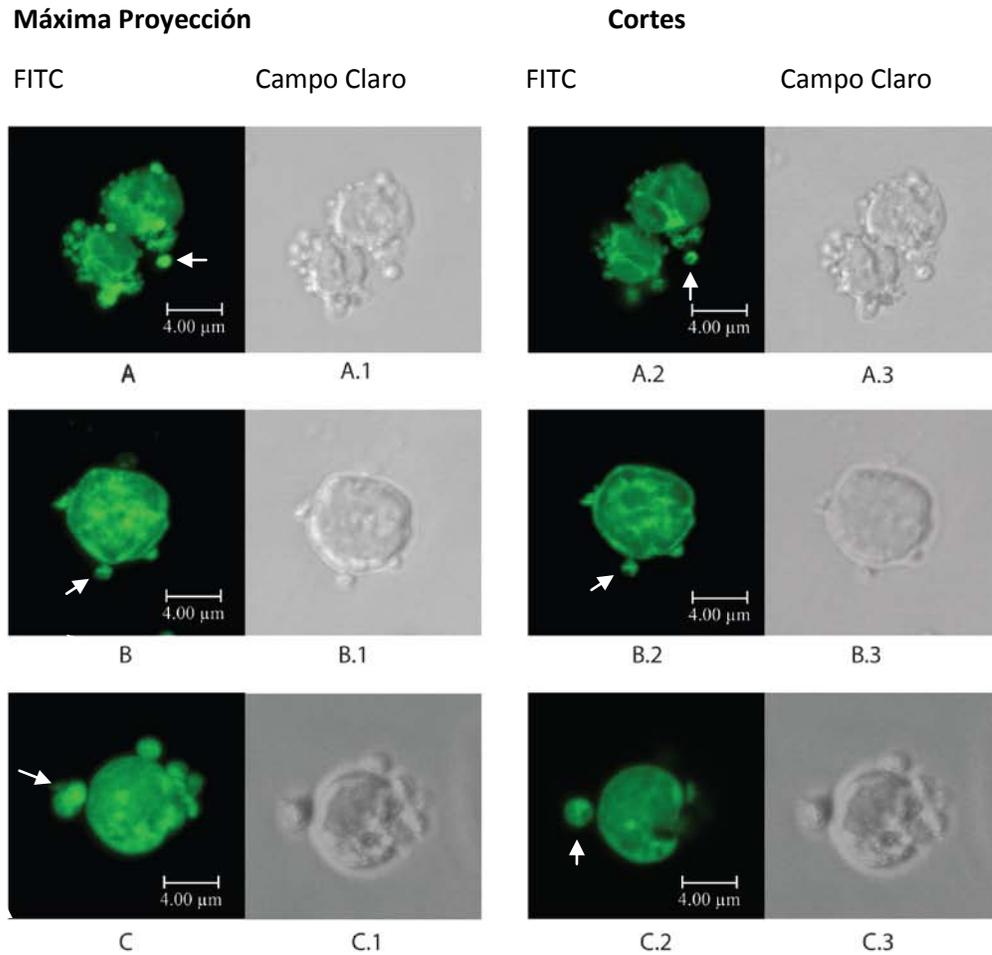
Grupo D y E: experimental de mononucleares sanguíneos, tratados con MVs completas y sonicadas respectivamente

El Grupo D correspondió, al grupo experimental de mononucleares sanguíneos tratados con MVs completas y el Grupo E correspondió a las células tratadas con MVs sonicadas. En ambos casos se utilizó una concentración de 300µg de proteína de MVs de *M. haemolytica* A2. La evaluación mediante Microscopía Confocal de estos grupos evidenció notable formación de estructuras esféricas de diferentes diámetros, las cuales se pueden observar en el **Cuadro 8 y Cuadro 9** .

El **Cuadro 8** muestra, principalmente linfocitos que corresponden al Grupo D. En el panel A, B y C, se observa dicho grupo de células en máxima proyección, que evidencian pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática, así como la formación de múltiples vesículas que en algunos cortes a las mismas, se muestra claramente su proceso de exteriorización al entorno. En el panel A.2 se muestra el 2^{do} corte, el B.2 muestra el 4^{to} corte y el C.2 muestra 7^o corte a dichas células tratadas con MVs completas.

En el **Cuadro 9** corresponde al Grupo E, en el cual se observan linfocitos tratados con MVs sonicadas. En el panel A, B y C se muestra la máxima proyección de las mismas, mostrando nuevamente estructuras esféricas en el interior de éstas. El panel A.2 muestra el 3^{er} corte, el panel B.2 el 6^{to} y el panel C.2 el 9^o corte a dichas células respectivamente. En todos los cortes, tanto del grupo tratado con Mvs completas como el de Mvs sonicadas, se observa la presencia de estructuras esféricas de diferentes diámetros, que al corte permitieron definir su contenido dada la condensación del colorante (FITC) en el interior de las mismas. Dicho contenido, sugiere restos citoplasmáticos y principalmente material nuclear fragmentado, que en la mayoría de las células observadas, se presentó con cierto grado de condensación y poca definición de la membrana nuclear (**Cuadro 8 y 9 mostrado con flechas**) . Así mismo, fue claro que las estructuras esféricas en la superficie celular, eran vesículas en formación a partir de la membrana citoplasmática. La Microscopía

Confocal confirmó que dichas estructuras, por las características antes mencionadas, correspondían a cuerpos apoptóticos, tanto del Grupo D, como del Grupo E, sin mostrar diferencia alguna entre éstos.



Cuadro 8. Grupo D: Mononucleares sanguíneos tratados con Mvs completas de *M. haemolytica* A2. En el panel A, B y C se observa un grupo de linfocitos en máxima proyección. El panel A.2 se muestra el 2^{do} corte, el B.2 el 4^{to} y el C.2 muestra el 7^o corte. Dichas vesículas observadas en todas las células, corresponden a cuerpos apoptóticos.

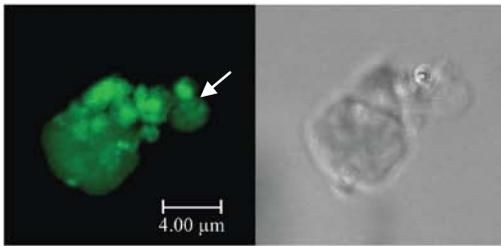
Máxima Proyección**Cortes**

FITC

Campo Claro

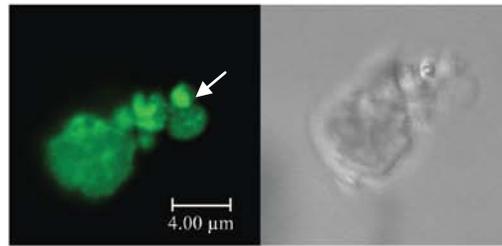
FITC

Campo Claro



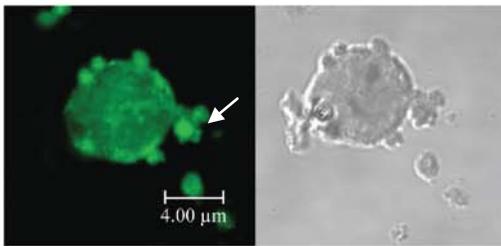
A

A.1



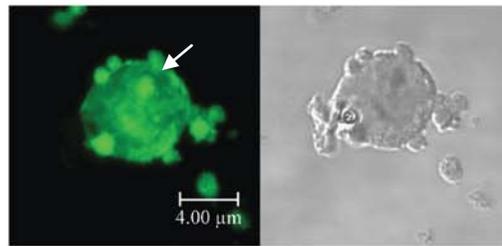
A.2

A.3



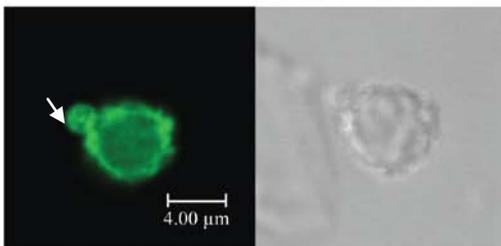
B

B.1



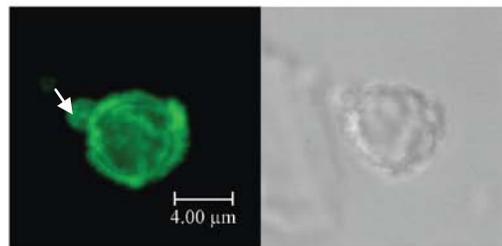
B.2

B.3



C

C.1

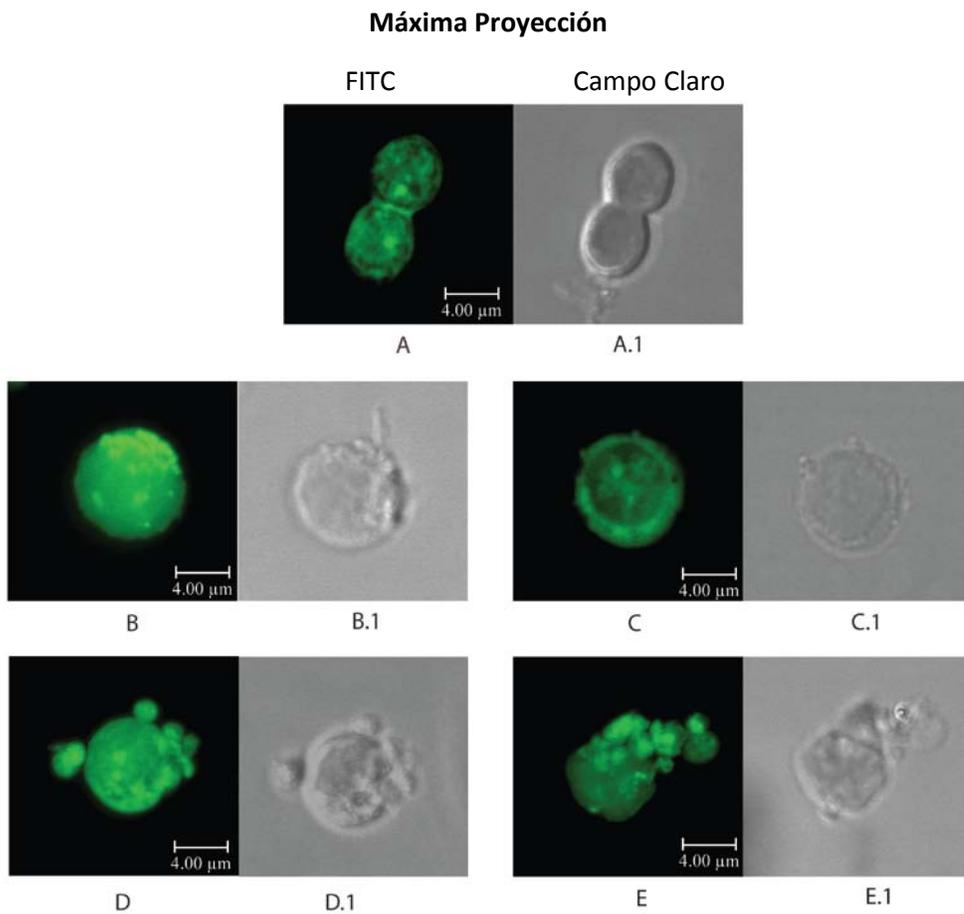


C.2

C.3

Cuadro 9. Grupo E: Mononucleares sanguíneos que corresponden a células tratadas con Mvs sonicadas de *M. haemolytica*. En el panel A, B y C se observan linfocitos en máxima proyección. En el panel A.2 se muestra el 3^{er} corte, el B.2 muestra el 6^{to} corte y el C.2 muestra el 9^o corte. En todas las células se observa la presencia de estructuras esféricas de diferentes diámetros correspondientes a cuerpos apoptóticos.

A continuación se muestra en el cuadro 10, un imagen representativa de las lesiones descritas para cada grupo evaluado (Grupo A, Ctrl (-): sin tratamiento, Grupo B, Ctrl (+) tratado con DL50 de LKTc, Grupo C, Ctrl (+): tratado con LPS, Grupo D, Experimental: tratado con MVs completas y Grupo E, Experimental: tratado con MVs sonicadas). En este cuadro se muestran las células teñidas con FITC en máxima proyección, así como su respectivo campo claro, con el fin de establecer claramente las alteraciones morfológicas que desarrollaron los diferentes grupos evaluados.



Cuadro 10. Mononucleares sanguíneos que recibieron diferentes tratamientos. En el panel A y A1 se muestra en máxima proyección el grupo de células que corresponde al control negativo(sin tratamiento alguno). En el panel B y B1 se muestra en máxima proyección el grupo de células que corresponde a DL50. El panel C y C1 se muestra en máxima proyección las células tratadas con LPS. En el panel D y D1 se muestra en máxima proyección el grupo experimental tratado con MVs completas. Y finalmente en el panel E y E1 se muestra en máxima proyección el grupo de células tratadas con MVs sonicadas.

VII.- DISCUSIÓN

Las bacterias Gram negativas han desarrollado diferentes mecanismos para la secreción de sus factores de virulencia, los cuales tienen efecto directo sobre las células tisulares y de defensa del huésped, provocándoles cambios que favorecen la colonización bacteriana. La secreción extracelular de sus productos, es el principal mecanismo mediante el cual los patógenos Gram negativos se comunican e intoxican al hospedador ⁶⁶. Estos sistemas de secreción extracelular incluyen los tipos I y VII que transportan factores de virulencia activos tales como proteasas, adhesinas, hemolisinas y toxinas. Además de éstos, se propone que las microvesículas (MVs) de membrana externa se incluyan como vía alterna de secreción. La liberación de vesículas de la envoltura durante el crecimiento de la bacteria, sirve como vehículo para secretar proteínas, lípidos y DNA ⁶⁷.

En 2007, González y col., caracterizaron los principales antígenos acarreados en MVs de *M. haemolytica* A2. En este trabajo se determinó mediante SDS-PAGE e inmunoreacción, la presencia de la LKT en MVs, utilizando un suero policlonal de conejo, anti-Hemolisina (Apx1) de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Dicha toxina es estructuralmente muy similar a la LKT en forma, tamaño y funcionamiento, ambas pertenecen al tipo de toxinas RTX que son producidas principalmente por géneros bacterianos que pertenecen a la familia *Pasteurellaceae*. En este trabajo, sólo se estableció, que la LKT, se arrastra estructuralmente completa (104 kDa) en las MVs de la bacteria. Sin embargo, no se evaluó su actividad citotóxica sobre células ⁷.

El objetivo del presente trabajo, fue establecer la actividad citotóxica de la LKT de *M. haemolytica* A2, acarreada y liberada a partir de MVs por la bacteria. Las MVs son estructuras que durante su proceso de formación, arrastran constitutivamente a partir de la membrana externa al LPS, la cual es la principal endotoxina de las bacterias Gram (-). Por lo que para evaluar a la LKT, fue necesario obtener y evaluar por separado ambas toxinas, a partir de extractos crudos de bacterias completas, para posteriormente reconocer su efecto citotóxico sobre las

células tratadas y comparar así, con el efecto que dichas toxinas ejercen al ser secretadas en las MVs de la bacteria.

Se ha reportado en diversos estudios, lo complicado de establecer el efecto causado por la LKT y el LPS por separado en este género bacteriano, ya que no actúan de manera individual, y más bien en la mayoría de los casos forman un complejo. Cuando lo anterior ocurre, ambas toxinas exacerbaban la respuesta en sus células blanco ⁶⁸, transmitiendo una gran cantidad de señales dentro y fuera de la célula, controlando así, la supervivencia y lisis de la misma. Algunos de los efectos biológicos que inducen como complejo la LKT y el LPS es la elevación de calcio intracelular, activación del complejo NF- κ B y liberación de citocinas.

Para la evaluación de la LKT de forma individual, fue necesario determinar la dosis letal 50 (DL50) de LKTc (cruda) de *M. haemolytica* A2, obtenida a partir de sobrenadante de cultivo en fase franca de crecimiento logarítmico de la bacteria. De esta manera se estableció, la concentración necesaria (300 μ g) para matar el 50% de un 100% de células mantenidas en las mismas condiciones, utilizándola como indicador general de toxicidad aguda y control positivo en los ensayos de citotoxicidad. Posteriormente, mediante Microscopía Confocal se determinó la actividad citotóxica de la LKTc evaluada individualmente sobre células mononucleares sanguíneas. Este grupo (Grupo B), celular evidenció ausencia de núcleo, pérdida de continuidad de la membrana citoplasmática y presencia de cúmulos multifocales de FITC de manera irregular, sobre la superficie de la membrana citoplasmática. Lo cual es muy sugestivo a la posible formación de poros transmembranales en dicha estructura de las células.

La Leucotoxina secretada por *M. haemolytica*, es una proteína de 104 KDa y pertenece a la familia de toxinas RTX, ésta, considerada uno de los principales factores de virulencia que contribuyen al desarrollo del daño al tejido pulmonar ⁶⁹.

Hsuan y col., en 1998, demostraron que la LKT estimula la elevación del calcio intracelular (Ca_2^+) y el posterior influjo extracelular de éste. Resultados similares

fueron observados al evaluar neutrófilos de humano desafiados con LKT de *Aggregatibacter actinomycetemcomytans*. Estos estudios indican que la elevación de calcio es causa de una respuesta temprana hacia la LKT durante la activación de leucocitos ⁷⁰.

Por otro lado, en el presente estudio se obtuvo y estableció el efecto tóxico del LPSc (crudo) de *M. haemolytica* A2, evaluando mediante Microscopía Confocal, las alteraciones morfológicas que desarrollaron mononucleares de ovino, en presencia de 300 μ g de la toxina. La evaluación de éste grupo (Grupo C), resultó en alteración de las membranas citoplasmáticas y nucleares, así como citoplasmas de aspecto granular, hinchazón osmótica coloidal y marcada fragmentación nuclear, las cuales fueron características altamente compatibles con el inicio de lisis parcial. El ensayo de citotoxicidad en este trabajo, se limitó a una hora de exposición a la toxinas, lo cual fue suficiente para generar moderadas alteraciones, sin llevar a las células a su lisis total. Además está reportado que el tipo celular evaluado es el más resistente al efecto de dichas toxinas a diferencia de PMN o macrófagos alveolares. Es importante mencionar que dichas características observadas en las células tratadas tanto con LKT como con LPS, se exacerbaban al interaccionar las células con MVs completas y sonicadas, lo cual sugiere claramente que ambas toxinas se encuentran en MVs, formando un complejo tóxico.

El LPS del género *Mannheimia* comprende del 10 al 25% del peso seco de la bacteria. Este antígeno generalmente se encuentra asociado a la célula bacteriana, pero ha podido detectarse libre en infecciones pulmonares ⁷¹. Se le considera también, uno de los componentes de la bacteria con alta capacidad de inducir una respuesta inflamatoria ⁹⁵. Tanto la LKT como el LPS inducen expresión de genes de citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 y TNF- α ⁶⁹.

El LPS liberado por bacterias patógenas es un importante activador de células fagocíticas. De hecho ha sido demostrado que incrementa la fagocitosis, a su vez incrementa el efecto citotóxico y microbicida de leucocitos, también estimula la liberación de enzimas lisosomales y estallido respiratorio ¹⁴.

Wessely-Szponder y col. en 2005, evaluaron el papel de la LKT de *M. haemolytica* y el LPS de *E. coli* cepa:055:B5 sobre cultivo celular de neutrófilos (PMN) de bovinos. Tanto la LKT como el LPS generaron degranulación de enzimas lisosomales así como la producción de radicales oxidrilo y ácido nítrico. Por lo que en éste trabajo, se procedió a evaluar las toxinas por separado, para establecer las diferencias en la respuesta del PMN hacia cada una de éstas. Los cultivos tratados individualmente, desarrollaron lisis parcial a partir de una concentración de 300µg/ml para ambas toxinas. Una mayor concentración de ambas, resultó letal para las células. En este estudio se concluyó, que los PMN de bovino incrementan la producción de sustancias que resultan letales para dichas células tanto en presencia de LKT como de LPS. Lo anterior, trae como consecuencia que los PMN exacerben el daño en el tejido pulmonar *in vivo*, en presencia de ambas toxinas ⁶⁸.

En el presente estudio, se estableció el efecto de las células tratadas tanto con LKTc, como con LPSc. Observándose en el primer caso, una serie de acúmulos de colorante (FITC) sobre la superficie celular de las mismas, que como se mencionó anteriormente, son compatibles con la formación de poros transmembranales. En el segundo caso, (células tratadas con LPSc), se observó pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática así como, pérdida de la definición de la membrana nuclear. Es importante resaltar que no se evidenció el acúmulo de FITC sobre la superficie celular, es decir, no hubo formación de poros transmembranales para las células tratadas con LPSc. Dicho lo anterior, podemos establecer que hay diferencias en cuanto a el efecto individual de ambas toxinas y que en éste caso, es necesaria una mayor concentración de éstas, para causar lisis sobre las células, esto en base a la evaluación de lo observado por separado mediante Microscopía Confocal. El efecto de ambas toxinas, se evidenció, en las células tratadas con MVs completas y sonicadas, ya que dichas estructuras arrastran por un lado a la LKT activa y anclada en la membrana que forma la MVs al LPS, resultando finalmente en este caso en un efecto tóxico sinérgico que induce a la apoptosis de los mononucleares sanguíneos de ovino, sin llevarlos a la lisis celular total.

Hsuan y col. en 1998, establecieron los diferentes vías por la que el LPS y el LKT de *M. haemolytica* A1, inducen elevación de calcio intracelular, sobre macrófagos alveolares de bovino. La LKT induce la elevación en la concentración de calcio en el medio extracelular mediante la salida de éste elemento de la célula blanco por canales de alto voltaje ⁶⁹. Por otro lado el LPS induce el incremento de calcio intracelular mediante la activación de los mecanismos de señalización de la Fosfolipasa C (PLC) y Fosfolipasa D que trae como resultado la producción de Inositol 1,4,5-Trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ estimula la liberación de calcio intracelular en muchos tipos de células. El LPS entonces activa el mecanismo de señalización en el interior de célula para la liberación del calcio y dar paso a una serie de lesión es en dichas células ⁶⁹.

En el presente trabajo se confirmó el efecto citotóxico de la LKT arrastrada en MVs de *M. haemolytica* A2, dadas las características morfológicas inducidas en los mononucleares expuestos a MVs completas y sonicadas. Es importante señalar que además de lo anterior se estableció paralelamente, las alteraciones morfológicas que induce el LPS en las células evaluadas. La evaluación por Microscopía Confocal en estos grupos (Grupo D y E), evidenció la pérdida de continuidad de la membrana citoplasmática y de las características nucleares, así como también exacerbó la formación de múltiples cuerpos apoptóticos emanados a partir de las células dañadas, que por cortes (8 a 10) mediante el microscopio confocal (0.5 a 1.0 μm), confirmó que dichas estructuras contenían material citoplasmático y nuclear. Esta claro, que cada una de las toxinas evaluadas tiene diferentes mecanismos de acción sobre sus células blanco, favoreciendo el desarrollo de alteraciones características. Sin embargo, cuando trabajan formando un complejo, dichas alteraciones en las células derivan en este caso, en apoptosis. Esta bien documentado, que ambas toxinas a mayor concentración, individualmente o formando un complejo, inducen lisis celular. En el presente trabajo, utilizamos una concentración de 300 μg de proteína total de MVs, completas y sonicadas, por lo que la concentración neta de cada toxina en este caso, pudo haberse reducido en ambas muestras. Considerando que las MVs,

arrastran una serie de componentes antigénicos de la bacteria y que muchos de éstos podrían estar participando en el daño celular, fue determinado entonces el efecto particular de ambas toxinas (LKT y LPS) que las MVs de *M. haemolytica* A2 contiene en dichas estructuras. Se evaluaron las Mvs sonicadas, ya que la literatura menciona que las MVs bacterianas tienen la capacidad de fusionarse a las membranas celulares para ejercer así un mayor efecto, pero se desconoce el tiempo en que estas tardan en llevar a cabo dicho proceso. Sonicarlas entonces nos permitió exponer con mayor facilidad las toxinas a evaluar. Lo anterior estableció el efecto de ambas toxinas en las células expuestas a MVs completas y sonicadas. Fue evidente en ambos casos, que la LKT y el LPS, de *M. haemolytica* A2, podrían estar formando un complejo tóxico que potencializa el efecto de las toxinas a partir de MVs, activando los mecanismos que llevan a la células a entrar en apoptósis, sin causarles un efecto de lisis celular propiamente. Por la concentración utilizada (300 μg), en dicho ensayo podríamos considerar a las MVs de *M. haemolytica* A2, en potenciales agentes tóxicos, que al ser liberados al medio que las rodea previa infección, favorecen el desarrollo de nichos en el tejido del órgano blanco que permiten posteriormente la invasión y colonización de la bacteria patógena completa.

Estudios realizados por Kato y col. en el 2002 en *Agreggibacter actinomycescomitans*, demostraron que dicha bacteria transporta en sus MVs a su leucotoxina (LTX), formadora de poros transmembranales en células HL60 (línea celular promielocítica). Dichas células mostraron muerte celular inmediata, al exponerse a altas concentraciones (300 μg) de la toxina extraída a partir de MVs. Las células sufrieron cambios morfológicos evidentes de muerte celular. Lo cual indica que las MVs de este género bacteriano se encuentran asociadas a una leucotoxina biológicamente activa ^{70,71}.

Cabe mencionar que a bajas y altas concentraciones de LKT o LPS, se inducen respectivamente apoptósis y lisis celular en leucocitos de bovino. La habilidad de la LKT a bajas concentraciones, induce apoptósis en los leucocitos del hospedador permitiendo que la bacteria evada al sistema inmune del huésped mediante la

destrucción de los factores que participan en la respuesta inmune innata (macrófagos y neutrófilos) los cuales potencializan el proceso inflamatorio. A altas concentraciones, los mecanismos de apoptosis pueden verse rebasados y ocurrir entonces la necrosis, permitiendo así el desarrollo de las lesiones a nivel pulmonar ¹⁴.

La liberación de toxinas mediada por vesículas es un potente mecanismo de defensa exhibido por diversos patógenos Gram negativos ⁶⁷. El papel principal que juegan las microvesículas en la patogenia de la enfermedad, es el de la formación de nichos, que permitan que la bacteria completa se establezca y colonice, exponiendo factores de virulencia a los tejidos del huésped, así como también modulando las respuestas de defensa del hospedador ⁶⁷.

Tanto la LKT como el LPS de *Mannheimia haemolytica* juegan un papel importante en la patogénesis de la Mannheimiosis Neumónica. Se piensa que éstos dos antígenos son los principales factores de virulencia de la bacteria durante su invasión, los cuales contribuyen a desarrollar la patología característica de esta enfermedad ⁷.

Aún no queda del todo claro, el mecanismo por el cual las MVs bacterianas se crean, pero es evidente que durante el proceso de formación de las mismas, la membrana externa bacteriana se invagina, resultando en proteoliposomas compuestos de membrana externa, que contienen a su vez, elementos del espacio periplásmico ^{4,6}.

El presente trabajo, es el primer reporte del efecto citotóxico de la LKT arrastrada en el interior de MVs y LPS anclada en la membrana de las mismas de *M. haemolytica* A2, en mononucleares sanguíneos de ovino. La mayoría de los reportes relacionados con actividad citotóxica de Leucotoxina presentes en MVs, corresponden a géneros bacterianos de interés en medicina humana, como lo es *Aggregatibacter actinomycencommitans* y para el LPS en *Escherichia coli*. Tanto la exotoxina (LKT) como la endotoxina (LPS) de *M. haemolytica* A2, son importantes toxinas que juegan un papel determinante en la patogénesis de la enfermedad, ya

que generan una exacerbada respuesta tanto inflamatoria como inmunológica del hospedador ante la bacteria.

VIII. CONCLUSIONES

1.- Se estableció la DL50 equivalente a 300 μ g de LKT obtenida a partir de sobrenadante de cultivo.

2.- *Mannhemia haemolytica* A2, acarrea dentro de sus MVS a su leucotoxina (LKT- exotoxina) biológicamente activa en mononucleares sanguíneos de ovino.

2.- La evaluación mediante Microscopía Confocal de mononucleares sanguíneos de ovino demostró, que la DL50 de la LKTc, indujo formación de poros en la superficie de la membrana de las células expuestas.

3.- La evaluación mediante Microscopía Confocal de mononucleares sanguíneos de ovino demostró, que la exposición al LPSc, indujo cambios estructurales tanto citoplasmáticos como nucleares en las células expuestas.

4.- La evaluación mediante Microscopía Confocal de mononucleares sanguíneos de ovino reveló, que la LKT y el LPS contenida y anclada en MVs respectivamente, están formando un complejo tóxico al ejercer su efecto sobre dichas células.

5.- La LKT y el LPS de MVs completas y sonicadas de *M. haemolytica* A2, inducen alteraciones morfológicas en mononucleares sanguíneos de ovino, que inducen apoptosis.

IX. ANEXO: SOLUCIONES

Cloruro de Calcio (1 M)

1 M = 147.026

147.026 g de CaCl en 1000 ml de agua destilada

Amortiguador 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

Amortiguador 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 μ m de diámetro (Millipore)

Amortiguador 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 μ m de diámetro (Millipore)

Archilamida-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

Amortiguador de corrida 10x

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

Ajustar pH 8.3

Amortiguador 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

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 μ m 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

X. Bibliografía:

1. Morales, A., J., F., Jaramillo, M., L., Oropeza, V., Z., Tórtora, P., J., L., Trigo, F., J., 1993. Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. Revista Veterinaria Vol. 24:2.
2. Jaramillo, A., C., J., Suárez, G., F., Trigo, J., F., 2009. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. Veterinaria México. 40 (3)
3. Tefera, G., Smola, J., 2001. *Pasteurella haemolytica* Complex of *Pasteurella sensu stricto* as new genus *Mannheimia*: changes in taxonomy. Vet. Med. 46:119-124.
4. Angen, O., Mutters, R., Caugant, D. A., Olsen, J. E., Bisgaard, M., 1999. Taxonomic relationship of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16 s rRna sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen.nov, *Mannheimia granulomatis* comb.nov., *Mannheimia glucosida* sp. Nov., *Mannheimia ruminalis* sp. Nov. and *Mannheimia varigena* sp. Nov., Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 67-86.
5. Smiths, G., R., Philips, J. E., 1990. *Pasteurella* and *Actinobacillus*. In: Parker M. T, Duerden B. I. Ed: Topley and Wilson's. Principles of Bacteriology, Virology and Immunology. Vol. 2, e ed. B. C. Decker Inc. USA. 383-399
6. Biberstein, E., L., Gills, M., G., Knight, H., 1960. Serological types of *Pasteurella haemolytica*. Cornell. Vet., 50,283-300.
7. González, 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.
8. Olguín, B., O., 2007. Complejo respiratorio bovino. Clínica de Bovinos I; UNAM; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
9. Burrows, L., L., Olah-Winfield E., Lo, R., Y., 1993. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. Immun, 61. Infect. Immun. 61, 5001-5007.

10. Hsuan y col., 1999. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin and endotoxin induced cytokine gene expression in bovine alveolar macrophages requires NF-kappaB activation and calcium elevation. *Microbial Pathogenesis* 26(5): 263-273.
11. Hsuan S.L., Kannan M.S., Jeyaseelan S., Prakash Y.S., Sieck G.C., Maheswaran S.K. 1998. *Pasteurella haemolytica* A1-derived leukotoxin and endotoxin induce intracellular calcium elevation in bovine alveolar macrophages by different signaling pathways. *Infect Immun.* 66:2836-2844
12. Leite F., O'Brien S., Sylte M. J., Page T., Atapattu D. and Czuprynski C.J. 2002. Inflammatory Cytokines Enhance the Interaction of *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin with Bovine Peripheral Blood Neutrophils *In Vitro*. *Infect.Immun.* 70.8:4336-4343
13. Highlander S.K., Fedorova N.D., Dusek D.M., Panciera R., Alvarez L.E., Rinehart C. 2000. Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect Immun.*68:3916-3922
14. Zecchinon, L., Fett, T., Desmecht, D., 2005. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defeats through a kiss of death mechanism. *Vet. Res.* 36 p. 133-156.
15. Murphy, G., Whitworth, L., Clinkenbeard, K., D., and Clikenbeard, A., P., 1995. Hemolytic Activity of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infection and immunity* . American society for Microbiology. Vol.63, No. 8, p. 3209-3212.
16. Biberstein, E., L., Dwight, C., H., 1999. *Pasteurella* In: Dwight C., Hirsh and Yaun Chung Zee (eds.): *Vet. Microbiol.* Blackwell Sei. Inc., USA, 135-140
17. Sun, Y. et Al., 1999. Correlation from *Pasteurella haemolytica* leukotoxin binding with susceptibility to intoxication of lymphoid cells from various species. *Infection and Immunity* 67 (12): 6264-6269
18. Marcatili y col., 2002. p53 and c-myc activation by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin is correlated with bovine mononuclear cells apoptosis. *New Microbiology* 25 (2): 195-204.
19. Lo, R., Y., C., Strathdee, C., A., and Shewen, P., E., 1987. Nucleotide sequence of the leukotoxin gene of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect. Immun.* 55: 1987–1996.

20. Strathdee, C., A., and Lo, R. Y., C., 1989. Cloning, nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. *J. Bacteriol.* 171:916–928.
21. Larsen J., Pedersen A. G., Davies R. L., Kuhnert P., Frey J., Christensen H., Bisgaard M., Olsen J. E. 2009. Evolution of the leukotoxin promoter in genus *Mannheimia*. *BMC Evolutionary Biology.* 9:121
22. Walker, R., D., Hopkins, F., M., Schultz, T., W., McCracken, M., D., Moore, R., N., 1985. Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*, *Am. J. Vet. Res.* 46: 2429–2433.
23. Hynes, R., O., 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* 69: 11–25.
24. Bailly, P., Tontti, E., Hermand, P., Cartron, J., P., Gahmberg, C., G., 1995. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins, *Eur. J. Immunol.* 25: 3316–3320.
25. Gahmberg, C., G., 1997. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 643–650.
26. Deshpande, M. S., Ambagala, T. C., Ambagala, A. P. N., Kehrl, M. E., Srikumaran, S., 2002. Bovine CD18 Is Necessary and Sufficient to Mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* Leukotoxin-Induced Cytolysis. *Infection and Immunity.* Vol 70, no.9 p. 5058-5064.
27. Dauphinee S. M., Karsan A. 2006. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. Laboratory investigation. *USCCAP INC.* 86, 9–22
28. Morrison D., Ryan J. 1987 Endotoxins and disease mechanisms. *Ann. Rev. Med.*, 38; 417-432.
29. Rietschel E.T., Brade H. 1992. Bacterial endotoxins. *Sci. Am* 276:26-33.
30. González, G., G., A., 2007. Comprendiendo la neumonía bovina producida por *Mannheimia haemolytica*. Virbac al día.
31. Squire, P.G., Smiley, D.W. and Croskell, R.B.: 1984. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infect. Immun.* 45: 667-673.

32. Kadurugamuwa, J. L., and T.J. Beveridge. 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: A novel mechanism of enzyme secretions. *J. Bacteriol.* 177 p: 3998-4008
33. Iovane, G., Galdiero, M., Vietello, M. and De Martino, L.: 1998. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins of bovine neutrophils. *FEMS, Immunol. Med. Microbiol.* 1: 29-36
34. Kimura, A., Gulig, P.A., McCracken, G.J.Jr. *et al.*: 1985. A minor high-molecular weight outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b is a protective antigen. *Infect. Immun.* 47: 253-259.
35. Morton R.J., Panciera R.J., Fulton, R.W. 1995. Vaccination of cattle with outer membrane -protein - enriched fractions of *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental challenge exposure. *Am. J. Vet. Res.* 56: 875-879.
36. Srinand S., Ames T., Maheswaran S., King V. 1995. Efficacy of various vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle: a meta-analysis. *Prev Vet Med.* 25:7-17.
37. Sabri M.Y., Zamri-Saad M., Mutalib A.R., Israf Da, Muniandy N. 2000. Efficacy of an outer membrane protein of *Pasteurella haemolytica* A2, A7 or A9-enriched vaccine against intratracheal challenge exposure in sheep. *Vet Microbiol*; 73.
38. Pandher K., Murphy G.L. 1996. Genetic and immunological analyses of a 38 kDa surface-exposed lipoprotein of *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet. Microbiol.* 51: 331-334.
39. Donachie, W.: 1996. Vaccines against *Pasteurella*. World Association of Microbiologists Immunologists and Specialists in Infection Disease. 14th International Symposium, Edinburgh. Annual Scientific Report. 1997.
40. Confer A.W., Panciera R.J. 1994. Testing of two new generation *Pasteurella haemolytica* vaccines against experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Agri-Pract.* 15: 10-15.
41. Confer A.W., McCraw R.D., Durham J.A. *et al.*: 1995. Serum antibody responses of cattle to iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* A1. *Immunol. Immunopathol.* 47: 101-110.

42. Terry, J., B., 2000. Minireview. Structures of Gram-Negative Cell Walls and their derived membrane vesicles *J. Bacter.* 181:4725-4733
43. Ratchapin, S., Girish, J., K., Lawrence, A., H. and Justus E. D. 2002. Modulation of Gamma interferon-Induces Major Histocompatibility Complex Class II Gene expression by *Porphyromonas gingivalis* membrane vesicle. *Infect. Immun.* 70:1185-1192.
44. Satsuki, K., Yusuke, K., Donald, R. D., 2001. Outer membrane like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. Elsevier Science Ltd.
45. Jubb, Kennedy & Palmer's. 2005. Pathology of domestic animals. Academic Press, 5th edition. Edited by M. Grant Maxie, DVM, PhD, DipACVP., vol.2
46. Banks, W., J., 1986. Applied Veterinary Histology, Second ed. Baltimore, Williams & Wilkins.
47. Thirkell, D., Spooner, R., K., Jones, G., E. & Russell, W., C., 1990. The humoral immune response of lambs experimentally infected with *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 24, 143–153
48. Hodgson, P., D., P., Aich, Manuja, A., K., Hokamp, F., M., Roche, F., S., L., Brinkman, A., Potter, L., A., Babuik & Griebel, P. S. 2005. Effect of stress on viral-bacterial synergy in bovine respiratory disease: Novel mechanism to regulate inflammation. *Comparative and Functional Genomics*, 6, 244–250.
49. Dinter, Z. & Morein, B., 1990. Virus Infections of Ruminants. Elsevier, Amsterdam.
50. Cutlip, R., C., Lehmkuhl H., D. & Brogden, K., A., 1993. Chronic effects of coinfection in lambs with parainfluenza-3 virus and *Pasteurella haemolytica*. *Small Ruminant Research*, 11, 171–178.
51. Cutlip, R. C., Lehmkuhl, Brogden H., D., K., A. & Hsu, N., J., 1996. Lesions in lambs experimentally infected with ovine adenovirus serotype “6” and *Pasteurella haemolytica*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8, 296–303.
52. Guitián, M., J., Respaldiza, Y., E., Sanjuán H., P., L., 1996. Síndrome respiratorio bovino. Concepto, papel que desempeñan el hospedador, los virus, bacterias y los factores ambientales y de manejo. Universidad de Santiago Compostela.

53. Weekley L. B., Tech V. V., Eyre P. 1998. Bovine pneumonic Pasteurellosis. Part I Pathophysiology, 20, No. 1.
54. Sambrook, J., Russell, W. D., 2001. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, E.U. Vol. 1, Protocols. Staining LPS in SDS-Polyacrylamide Gels with Silver salts (A9.5-A9.7)
55. Galdiero M., Vitiello M., De Martino L. 1998. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins on bovine neutrophils. FEMS Immun Med Microbiol; 20:29-36.
56. Dhammika, N., Atapattu, and Charles J. Czuprynski. 2005. *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin Induces Apoptosis of Bovine Lymphoblastoid Cells (BL-3) via a Caspase-9-Dependent Mitochondrial Pathway. Infection And Immunity. Vol. 73, No. 9 p. 5504–5513
57. Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. Anal Biochemistry. 72:248-254.
58. Laemmli, W. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature., 227:680-685
59. 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
60. Clinkenbeard K.D. Mosier D.A., Confer A.W. 1989. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect. Immun. 57. 420-425.
61. Ehrmann I.E., Gray M.C., Gordon V.M., Gray L. S., Hewlett E. L. 1991. Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. FEBS Lett. 278. 79-83
62. Jericho K.W., Yates W.D., Babiuk L.A. 1982. Bovine herpesvirus-1 vaccination against experimental bovine herpesvirus-1 and *Pasteurella haemolytica* respiratory tract infection: onset of protection. Am. J. Vet. Res. 43. 1776-1780.

63. Bhakdi S., Mackman N., Nicaud J.M., Holland I.B. 1986. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.* 63-69
64. Lalonde G., McDonald T.V., Gardner P., O'Hanley P.D. 1989. Identification of hemolysin from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and characterization of its channel properties in planar phospholipid bilayers, *J. Biol. Chem.* 13559-13564
65. Lally E.T., Kieba I.R., Sato A., Green C.L., Rosenbloom J., Korostoff J., Wang J. F., Shenker B. J., Ortlepp S., Robinson M.K., Billings P.C. 1997. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J. Biol. Chem.* 272. 30463-30469
66. Henderson I.R., Navarro, G.F., Desvaux, M., Fernández, R.C. and Ala'Aldeen, D. 2004. Type V protein secretion pathway: The autotransporter store. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 692-744
67. Atsuo A., Hiroki T., Nobumichi F. 2010. Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions. *Elvesier.* 12. 791-798
68. Maier, E., N. Reinhard, R. Benz, and J. Frey. 1996. Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 64:4415-4423.
69. Hsuan S. L., Kannan M. S., Jeyaseelan S., Prakash Y. S., Sieck G. C. 1998 *Pasteurella haemolytica* A1-Derived Leukotoxin and Endotoxin Induce Intracellular Calcium Elevation in Bovine Alveolar Macrophages by Different Signaling Pathways. *Infect. Immunity.* Vol. 66, No. 6
70. Kato S., Kowashi, Y., Demuth, R. D. 2002. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microbial Pathogenesis.* 32(1):1-13
71. Satsuki, K, Yusuke, K, Donald, RD. Outer membrane like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. Elsevier Science Ltd. 2001.