



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Identificación del receptor tipo Toll-4 en macrófagos de ovino y su activación, al interactuar con
Microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* A2 en condiciones *in vitro*”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CHRISTIAN ÁVALOS GÓMEZ

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya

FES Cuautitlán, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez FES Cuautitlán, UNAM

Dr. Efrén Díaz Aparicio FES Cuautitlán, UNAM

MÉXICO, D.F. Enero 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 52 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) bajo la dirección de la Dra. G. Mireya de la Garza Amaya junto con la Dra. Cynthia González Ruíz de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM, con el financiamiento del proyecto PAPIIT con No. TA200113-2.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. G. Mireya de la Garza Amaya y a los miembros del comité tutorial el Dr. Víctor R. Tenorio Gutiérrez y el Dr. Efrén Díaz Aparicio, por sus valiosos comentarios y orientación en el desarrollo y culminación de este trabajo.

A los miembros del jurado, Dr. Carlos Gerardo García Tovar, Dr. Eduardo García Zepeda, Dr. Francisco Aguilar Romero y Dr. José Francisco Morales Álvarez por su dedicación en la revisión de este trabajo y sus comentarios para la mejora del mismo.

A la Dra. Cynthia González Ruíz por su apoyo incondicional durante todo el proceso en la realización de este proyecto y la paciencia para llegar a la culminación que difícil pero que finalmente se ha conseguido. Gracias infinitas.

A los doctores Saúl Villa Treviño y el Dr. José Eduardo Pérez Salazar del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV, por el apoyo brindado para los trabajos de cultivo celular.

Al M. en C. Víctor Hugo Rosales García encargado del Citómetro de Flujo de Laboratorios Centrales del CINVESTAV por su ayuda en el procesamiento y análisis de la citometría de flujo.

A la Bióloga Lourdes Rojas del Microscopio Electrónico de CINVESTAV por su apoyo en la toma de las fotografías del proyecto.

A mis compañeros del laboratorio 52 Elia, Magda, Sarahí, Carolina, Guillermo, María Luisa, así como los del departamento de Biología Celular, Isis, Joseline, Nelly y Javier por su amistad y sus conocimientos que amablemente me transmitieron durante este proceso. Y principalmente a Fernando por la gran ayuda brindada en el análisis y entendimiento de la PCR.

Finalmente, pero no menos importante a mis amigos de generación Ana, Karla, Jonathan y Ari por la amistad lograda a lo largo de este maravilloso proceso.

DEDICATORIAS

A mis padres por apoyarme incondicionalmente durante el largo camino de esta Maestría, siempre estaré agradecida por los valores inculcados de fortaleza y perseverancia que aunado al esfuerzo siempre te llevarán al ÉXITO.

A mi hermana por ser mi apoyo en todo momento a pesar de las dificultades del camino.

A Emilio, por alentarme a seguir y nunca rendirme, así como ayudarme a mantener la calma en los momentos de mayor desesperación y frustración durante todo mi proceso de crecimiento. Muchas gracias.

CONTENIDO

RESUMEN.....	3
I. INTRODUCCIÓN	4
I.1 LAS NEUMONÍAS EN LA OVINOCULTURA.....	4
I.2. ETIOLOGÍA: <i>Mannheimia haemolytica</i>	5
I.3. FACTORES DE VIRULENCIA	6
I.4 MICROVESÍCULAS	8
I.5. RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDERO	12
I.5.1. Inmunidad innata	13
I.5.2 Receptores tipo Toll.....	14
I.5.3. TLR4 y sus ligandos	16
I.5.4. Los TLRs en animales domésticos.....	17
I.5.5. Función de los TLRs en la respuesta inmunitaria	17
I.5.6. Receptores tipo Toll y la respuesta inflamatoria.....	18
II. JUSTIFICACIÓN	19
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVO GENERAL.....	20
V. OBJETIVOS PARTICULARES	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
VI.1. Obtención de Microvesículas (MVs) de <i>M. haemolytica</i> A2	20
VI.2. Extracción de membrana externa de <i>M. haemolytica</i> A2.....	21
VI.3. Precipitación de proteínas en solución, en presencia de detergentes y lípidos	23
VI.4. Cuantificación de proteína por el método de Bradford.....	23
VI.5 Corrimiento electroforético mediante SDS-PAGE.....	23
VI.6. Tinción negativa para microscopía electrónica.....	24
VI.7. Diferenciación de monocitos de sangre periférica de ovino a macrófagos.....	24
VI.8. Citometría de flujo	25
VI.9. Condiciones de cultivo celular.....	25
VI.10. Cuantificación de Interleucinas mediante qRT-PCR.....	26
VII. RESULTADOS	27

VII.1. Obtención e identificación de MVs de <i>M. haemolytica</i> A2.....	27
VII.2. Las MVs de <i>M. haemolytica</i> A2 contienen LPS en su interior	30
VII.3. Purificación y caracterización de monocitos ovinos	31
VII.4. Los monocitos ovinos se diferencian a macrófagos mediante estímulo con GM-CSF y expresan receptores de membrana (CD14, TLR4, MHC II, CD1a, CD86) en su superficie	34
VII.5. Los macrófagos aumentan la transcripción de genes de citocinas de IL-1 β y TNF- α pero no de IL-10, a diferentes tiempos.....	39
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
IX. CONCLUSIONES	48
X. BIBLIOGRAFÍA	49

RESUMEN

Las neumonías a nivel mundial, son consideradas la principal causa de muerte en los ovinos. Las pérdidas económicas que éstas originan, incluyen la muerte de los animales, disminución de la ganancia de peso, deficiente conversión alimenticia y elevados costos en tratamientos de neumonías crónicas, alcanzando altos costos de producción. La etiología de la Mannheimiosis Neumónica, como es conocida la enfermedad en ovinos, se considera multifactorial e incluye una combinación de estrés e infección viral, que resulta en una enfermedad aguda final donde *Mannheimia haemolytica* es el principal patógeno bacteriano involucrado. Se sabe que *M. haemolytica* tiene la capacidad de producir unas estructuras esféricas formadas por una capa de fosfolípidos llamadas Microvesículas (MVs), formadas a partir de la membrana externa de las bacterias en cualquier fase de crecimiento y que engloban al momento de su formación, importantes factores de virulencia, entre los cuales se encuentra el Lipopolisacárido (LPS), principal endotoxina de las bacterias Gram-negativas y responsable de la respuesta inflamatoria que monta la célula hospedadora ante la bacteria. Por otro lado, se sabe que las células presentadoras de antígenos como los macrófagos, expresan receptores tipo Toll y pueden ser estimulados por Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) contenidos en estas estructuras; desencadenando así diferentes vías de señalización involucradas en la respuesta inmune innata. Debido a estos antecedentes, en este trabajo se evalúa el papel que juega el LPS de las MVs de *M. haemolytica* A2 cuando interacciona con macrófagos de ovinos en condiciones *in vitro*. Dicho efecto, fue medido a través de la cuantificación mediante qRT-PCR de mRNA de tres citocinas de importancia en la respuesta inmune innata que fueron, IL-1 β , TNF- α e IL-10, la cuantificación de estas citocinas se realizó posterior al tratamiento de los macrófagos ovinos con 2 concentraciones de MVs correspondientes a 5 y 10 μ g de estas, después de 1 y 3 hrs del tratamiento. Dichos resultados fueron normalizados mediante el método $\Delta\Delta$ CT con el gen de referencia GAPDH, y finalmente analizados mediante una técnica de ANOVA de una vía. En conclusión los resultados de este estudio demuestran la estandarización de una técnica de diferenciación de macrófagos a partir de monocitos ovinos, utilizando una metodología modificada para la separación de células humanas, así como reactivos usados para este mismo fin. Se identificó al LPS anclado a las MVs de *M. haemolytica* A2 como un potente estimulador de citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , en macrófagos y se demostró que esta respuesta es dependiente del tiempo y de la dosis utilizada en el tratamiento. Además, confirmamos que el aumento en la transcripción de estos genes es mediado específicamente por la vía de señalización LPS-TLR4 utilizando a la Polimixina B como un inhibidor de esta ruta.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 LAS NEUMONÍAS EN LA OVINOCULTURA

Las neumonías son consideradas la principal causa de muerte en los ovinos, a nivel mundial. Las pérdidas económicas que éstas originan, incluyen la muerte de los animales, disminución de la ganancia de peso, deficiente conversión alimenticia y elevados costos en tratamientos de animales con neumonía crónica.^{1,2}

El porcentaje de morbilidad por neumonías en rumiantes en producción, es considerado uno de los más severos en la economía de esta industria. Este porcentaje incluye alrededor del 75% de las enfermedades clínicas. En cuanto al nivel de mortalidad ocasionado por neumonías los porcentajes varían, van desde el 5% hasta el 40%.³ En Estados Unidos se han evaluado los gastos médicos que se generan y el porcentaje es de alrededor del 8% del costo total de producción, sin tomar en cuenta las pérdidas económicas debidas a las prácticas zootécnicas que suman un porcentaje similar a éste.⁴ Por lo anterior, la disminución de las neumonías en bovinos y en particular en ovinos, se ha convertido en absoluta prioridad, además, se sabe que el costo en gastos zootécnicos tiene el principal impacto en los beneficios de la unidad de producción, independientemente del precio de la carne en el mercado.^{3,5}

La neumonía ovina anteriormente se denominaba Pasteurelosis Neumónica Ovina, llamada así por el nombre de su principal agente etiológico bacteriano involucrado *Pasteurella haemolytica*. Recientemente, debido a que la bacteria ha sido reclasificada a un nuevo género bacteriano, ahora nombrada *Mannheimia haemolytica*, el nombre de la enfermedad cambio a Mannheimiosis Neumónica. Al referirnos al Complejo Neumónico Respiratorio ovino, esta enfermedad invariablemente queda incluida.⁵

La etiología de la Mannheimiosis Neumónica es considerada multifactorial, e incluye una combinación de estrés e infección viral que resulta en una enfermedad aguda, donde *M. haemolytica* es el principal patógeno bacteriano involucrado. Las neumonías causadas por *M. haemolytica* se caracterizan por ser una pleurobronconeumonía fibrinopurulenta severa y pueden variar de intensidad.¹

Los microorganismos asociados al Complejo Neumónico Respiratorio ovino son virus, bacterias y micoplasmas. Sin embargo, el sinergismo que conlleva a la interacción virus-bacteria es considerado uno de

los factores claves para desencadenar la colonización por *M. haemolytica* en el pulmón. Entre los principales agentes virales involucrados se encuentran el virus de Parainfluenza tipo 3 (VPI3) ⁶, el Virus Respiratorio Sincicial (VRS) y el Adenovirus, para la especie ovina. ⁷ Estudios serológicos en México indican que la infección por el virus de PI3 se encuentra ampliamente difundida en los bovinos y ovinos del país, con 16% al 86% de animales seropositivos. ⁸

I.2. ETIOLOGÍA: *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia haemolytica ha sido el tema de una extensa reclasificación en el pasado: en 1885 ⁹ fue llamada "*Bacterium multocidum*" y fue retitulada como *Pasteurella haemolytica* en 1932 ¹⁰, al mismo tiempo fue clasificada en dos biotipos A y T, basados en su capacidad de fermentar azúcares, arabinosa y trealosa, respectivamente. ¹¹ Hasta ese momento existían identificados 13 serotipos A y 4 serotipos T, estos últimos fueron reclasificados como *Pasteurella threalosi* en 1990. ¹² En 1999, Angen y col. ¹³ basados en una extensa evaluación cuantitativa de fenotipo y características genómicas, propusieron un nuevo género en la familia *Pasteurellaceae* para las especies trealosa-negativas llamado *Mannheimia*, así como también cinco nuevas especies para este género. Estudios basados en hibridaciones de DNA, condujeron a reclasificar los serotipos anteriores A (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) como *Mannheimia haemolytica*, mientras que el serotipo restante A11 se convirtió en *M. glucosida*. Finalmente las nuevas especies son, *M. haemolytica*, *M. glucosida*, *M. ruminalis*, *M. granulomatis* y *M. varigena*.^{5,13} El nombre de *Mannheimia* se otorgó en tributo a Walter Mannheim, biólogo alemán que investigó y mejoró la comprensión de la taxonomía de la familia *Pasteurellaceae*. ¹³

Mannheimia haemolytica es una bacteria Gram-negativa que crece en agar sangre en forma de pequeñas colonias con un engrosamiento central. En agar sangre de caballo, oveja o conejo, forma colonias circulares rodeadas por una zona estrecha de β -hemólisis, mientras que en las placas hechas con sangre de corderos muy jóvenes (1 mes de edad), da una doble zona de β -hemólisis. Su crecimiento es mesófilo y anaerobio facultativo o microaerófilico. Todas las cepas de *Mannheimia* fermentan manitol, glucosa, maltosa, sorbitol y sacarosa sin producción de gas. Las pruebas de indol, ureasa, azul de metilo (MB) y Voges-Proskauer (VP) son negativas. Oxidasa y catalasa son siempre positivas.¹⁴

M. haemolytica coloniza la cavidad nasal y las criptas de tonsilas de ganado bovino y ovino sano. Sin embargo, después de haber sufrido estrés y una infección viral, la bacteria se incrementa rápidamente en número y pasa a los pulmones, desencadenando rápidamente un cuadro de neumonía aguda. ¹⁴ En ovinos el serotipo más importante a nivel de mucosa respiratoria es el A2; los estudios realizados en México han demostrado mayor incidencia de los serotipos A1, A2, A6, A7 y A9 en corderos y los serotipos A1 y A2 en bovinos.¹⁵

I.3. FACTORES DE VIRULENCIA

Los miembros del género *Mannheimia* producen diversos factores que están asociados a la virulencia de este grupo de microorganismos. La especie más virulenta de este género es *M. haemolytica*. Esta bacteria es patógena para ganado bovino, ovino y caprino, pero apatógena para animales de laboratorio cuando se inocula por la vía usual de infección (vía aerosol o contacto directo). Entre los antígenos importantes producidos por *M. haemolytica* se encuentra la cápsula, el lipopolisacárido (LPS), algunas proteínas de membrana externa (PME), las proteínas reguladas por hierro (PMERH), algunas adhesinas, la leucotoxina (LKT) y la neuraminidasa (**Tabla 1**).¹⁴

Tabla 1: Funciones de los principales factores de virulencia de *Mannheimia haemolytica*

FACTORES DE VIRULENCIA	EFECTO
CÁPSULA	La cápsula afecta negativa y severamente la interacción entre el microorganismo y los macrófagos alveolares. Además, se ha reportado que el material capsular puede interactuar con la sustancia surfactante pulmonar, de tal modo que facilita la adherencia local de los microorganismos a las diferentes células hospedero. ¹⁶
PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME)	Tienen un papel importante en el proceso de infección. Algunas tienen función de porinas que permiten el transporte de sustancias a través de la membrana externa y algunas otras pueden actuar como receptores de alta afinidad para obtener hierro del hospedero. ¹⁷

<p>PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA REGULADAS POR HIERRO (PMERH)</p>	<p>Están involucradas en el proceso de adquirir hierro del ambiente, el cual es un nutriente esencial para la sobrevivencia de todas las células de mamíferos y las bacterias. Estas proteínas llamadas PMERH trabajan específicamente compitiendo con proteínas transportadoras del hospedero, para quitarles el hierro.¹⁸</p>
<p>LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)</p>	<p>El LPS es considerado como uno de los componentes de la bacteria con alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria. La interacción del LPS con los macrófagos puede determinar muchos de los efectos patológicos asociados. Los macrófagos interactúan con LPS y son activados para producir citocinas proinflamatorias, sustancias procoagulantes, radicales de oxígeno y proteasas involucradas en la respuesta inflamatoria.¹⁹</p>
<p>LEUCOTOXINA (LKT)</p>	<p>El producto celular bacteriano de mayor importancia en la patogénesis de la enfermedad causada por <i>M. haemolytica</i> es la leucotoxina (LKT), la cual tiene la habilidad de lisar leucocitos de rumiantes. Las especies de <i>Mannheimia spp</i> requieren de una alta concentración de hierro para la producción de esta exotoxina, la cual liberan durante su fase de crecimiento logarítmico.^{5, 14}</p>
<p>PLÁSMIDOS</p>	<p>En <i>M. haemolytica</i> se ha podido demostrar la existencia de plásmidos de resistencia a antibióticos; aun cuando la presencia de plásmidos no es un fenómeno característico entre todas las especies, algunas cepas poseen sólo un plásmido pequeño (aproximadamente 4.2 kpb), el cual es responsable de la resistencia a estreptomina y sulfonamidas.^{20,21,22}</p>
<p>NEURAMINIDASA</p>	<p>Esta enzima reduce la viscosidad del moco respiratorio y permite la exposición bacteriana sobre la superficie de la célula hospedero.¹⁴</p>

ADHESINAS	Las adhesinas ayudan a colonizar el tracto respiratorio. Se ha reportado una adhesina de 68 kDa que es una sialoglicoproteína. ²³
FIMBRIAS	Las fimbrias son estructuras filamentosas que pueden estar involucradas en la iniciación de la infección. Las fimbrias permiten que las bacterias se adhieran y no sean barridas por las secreciones respiratorias. ²⁴

I.4 MICROVESÍCULAS

La patogenicidad de las bacterias Gram-negativas se basa, en gran parte, en su capacidad para secretar numerosos factores de virulencia en el medio que las rodea (por ejemplo: hemolisina, aerolisina y verotoxina). Estos factores se difunden en el tejido e inician su destrucción para su colonización exitosa.^{25,26} Las bacterias Gram-negativas producen estructuras esféricas liberadas a partir de su membrana externa que son llamadas Microvesículas (MVs) y contienen proteínas biológicamente activas y que realizan diversas funciones. A diferencia de otros mecanismos de secreción, las MVs permiten a las bacterias secretar moléculas insolubles en complejos con material soluble.²⁷ Cabe mencionar, que actualmente está reportado que también las bacterias Gram-positivas y arqueas pueden liberar vesículas de membrana producidas a partir de sus paredes celulares.^{28, 29, 30}

La secreción de factores de virulencia por patógenos Gram-negativos es compleja, debido a que la bacteria está envuelta por dos capas lipídicas, la membrana externa y la interna y el periplasma entre ambas. Los patógenos Gram-negativos tienen varias estrategias que permiten la activación de los factores de virulencia para que, posteriormente, ganen acceso al medio extracelular. Se ha identificado una gran cantidad de mecanismos de secreción de proteínas y por lo menos cinco de estos están bien caracterizados. Los sistemas de secreción Tipo II y V son procesos mediante los cuales las proteínas pasan a través de las membranas interna y externa en dos pasos.^{31, 32, 33, 34} Primero las proteínas pasan a través de la membrana interna por un camino péptido-dependiente (llamado camino Sec-dependiente) con una escala transitoria en el periplasma y posteriormente se da la siguiente translocación donde atraviesan la membrana externa y llegan al medio extracelular, este último proceso está mediado por proteínas adyacentes y específicas.³¹

Por otro lado, en las vías de secreción Tipo I, III y IV el material es transferido directamente hacia el medio extracelular o hacia el interior de otra célula. Se cree que la proteína puede cruzar las membranas internas y externas en un solo paso, posiblemente a través de algunos sitios de adhesión de la membrana. Todos estos sistemas de secreción liberan proteínas individuales o complejos de tamaño reducido. Se especula que el mecanismo de secreción de las MVs es de Tipo VI, es decir, éste permite a la bacteria secretar proteínas de alto peso molecular y grupos de proteínas y lípidos hacia el medio extracelular.²⁵

La pared celular de las bacterias Gram-negativas tiene una característica en común y es que sus MVs están en constante liberación en la superficie de la célula durante su crecimiento. Durante el proceso de formación y liberación, las MVs engloban algo del periplasma subyacente, de modo que son partículas realmente pequeñas formadas a partir de la membrana externa de estas bacterias. Las MVs contienen antígenos que regularmente la bacteria completa produce bajo ciertas condiciones, 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 50 años atrás y reportes adicionales han sido recién publicados (**Tabla 2a y 2b**).^{35, 28} La importancia general de su liberación ha sido actualmente reconocida y son nombradas también vesículas de membrana externa.

36

Las MVs pueden proveer de una ruta alterna para la liberación de diversos 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 dentro del lumen de las MVs cuentan con la ventaja de estar protegidos contra la acción inactivante de enzimas ambientales.^{36, 37}

Una aplicación médica muy importante de las MVs es como biológicos vacunales acelulares, porque cuando dichas estructuras son liberadas por las bacterias, ellas contienen la identidad de superficie de la bacteria donadora, por lo cual importantes antígenos de virulencia están presentes en su superficie. Serotipos de *P. mirabilis* y *S. marcescens*, poseen adhesinas (pilis o fimbrias) y tienen estas estructuras asociadas a sus MVs. Claramente, las MVs son potentes estructuras antigénicas que pueden poseer cualidades para inducir la activación de la respuesta inmune del hospedero.²⁵

Tabla 2a: Factores de virulencia asociados a Microvesículas bacterianas.²⁵

ESPECIE	FACTOR DE VIRULENCIA	BIBLIOGRAFÍA
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Proteasas, ApxI	Negrete, Abascal 2000.
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Leucotoxina	Nowotny 1982, Kato 2002.
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica (ETEC)	LT	Wensink 1978, Gankema 1980, Wai 1995, Horstman y Kuehn 2000.
<i>E. coli</i> productora de la tóxina-shiga (STEC) y <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	Tóxina shiga	Kolling y Matthews 1999, Yokoyama 2000.
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	ClyA	Wai 2003.
<i>Helicobacter pylori</i>	VacA	Fiocca 1999, Keenan 2000.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Peptidoglicano hidrolasa, fosfolipasa C, hemolisina, fosfatasa alcalina	Kadurugamuwa y Beveridge 1995, Li 1998.
<i>Salmonella typhi</i>	ClyA	Wai 2003.
<i>Mannheimia haemolytica</i>	LPS, Leucotoxina, Proteínas de membrana externa	González 2007.

Tabla 2b: Estudios para la identificación de proteínas contenidas en MVs de géneros bacterianos.

ESPECIE BACTERIANA	No. de proteínas identificadas	BIBLIOGRAFÍA
<i>Neisseria meningitidis</i> Serogrupo B	50	Post 2005 ³⁸
<i>Neisseria meningitidis</i> NZ98/254	63	Ferrari 2006 ³⁹
<i>Escherichia coli</i> DH5α	132	Lee 2007 ⁴⁰
<i>Legionella pneumophila</i>	181	Galka 2008 ⁴¹
<i>Helicobacter pylori</i> J99	86	Mullaney 2009 ⁴²
<i>Francisella philomiragia</i> ATCC 25015	238	Pierson 2011 ⁴³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	314	Choi 2011 ⁴⁴
<i>Staphylococcus aureus</i> 06ST1048	143	Gurung 2011 ³⁰
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	159	Lee 2012 ⁴⁵
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	105	Maredia 2012 ⁴⁶
<i>Neisseria meningitidis</i> H44/76 (serogroup B)	140	van de Waterbeemd 2013 ⁴⁷
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (EcN)	92	Aguilera 2014 ⁴⁸
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	151	Veith 2014 ⁴⁹
<i>Campylobacter jejuni</i> 11168	134	Jang 2014 ⁵⁰
<i>Vibrio cholerae</i>	90	Altindis 2014 ⁵¹

Mannheimia haemolytica libera múltiples proteínas de interés inmunogénico, contenidas en sus MVs, liberadas en mayor cantidad cuando los cultivos se someten a condiciones de estrés.³⁷ A partir de dichas estructuras se han caracterizado los principales antígenos liberados por la bacteria durante la patogénesis de la misma. Entre estos se ha determinado a la LKT, LPS, proteínas de membrana externa de interés inmunogénico (45, 54 y 60 KDa), y un fragmento de DNA de 23 kpb.^{52,53}

Se ha demostrado que, bajo condiciones experimentales, corderos de 3 meses de edad en promedio, inmunizados con MVs de *M. haemolytica* A2 por vía intranasal y posteriormente desafiados experimentalmente con una cepa de campo patógena de *M. haemolytica* A2, desarrollaron una elevada respuesta de IgA a nivel de mucosa nasal, que los protege al 100% del desafío y evita el desarrollo de lesiones neumónicas características de la enfermedad en los animales por esta vía.⁵²

Vacunas basadas en MVs contra *Neisseria meningitidis* serogrupo B (MenB) fueron desarrolladas desde hace 20 años atrás y probadas en pacientes. Estas estructuras nanométricas presentan un notable potencial en la modulación de la respuesta inmune y la liberación de antígenos de meningococos incorporados dentro de la estructura de estas vesículas.⁵⁴ El uso de vacunas de MVs de tipo silvestre contra MenB ha sido investigado desde la década de los 70s y en las instituciones de Salud Pública en países como Cuba, Noruega y Nueva Zelanda han demostrado su eficacia, con alta efectividad estimada en adultos y jóvenes y en la región en la que la cepa circulante fue la misma que la cepa utilizada en la vacuna.⁵⁴

La vacuna cubana VA-MENGOC-BC® mostró 83% de efectividad (por más de 16 meses), la vacuna noruega MenBVac® mostró 87% de efectividad (por más de 10 meses) y la MeNZB administrada en Nueva Zelanda, mostró una efectividad del 73%, todas estas vacunas se administraron a jóvenes y adultos por igual. En general, el porcentaje de efectividad estimado en niños y bebés es de más de 70%, aunque el número de dosis requeridas es diferente entre cada vacuna con el fin de mantener la inmunidad protectora por un período largo de tiempo. La vacuna Cubana es administrada en dos dosis, mientras que la MenBVac es dada en tres dosis y la MeNZB en cuatro dosis.⁵⁴ En la **Tabla 3** se muestran las características generales de cada una de las vacunas hechas a partir de MVs para MenB.

Tabla 3: Vacunas de MVs de *N. meningitidis* serorupo B* ^{55, 56, 57, 58, 59}

NOMBRE DE LA VACUNA	HISTORIA	COMENTARIOS
VA-MENGOC-BC®	Desarrollada en el Instituto Finlay de Cuba, para hacer frente a una epidemia y evaluada entre 1987 y 1989. La cepa utilizada fue B:4:P1.19,15	Aplicada por el programa de Inmunización en Cuba por más de 20 años.
MenBvac®	Desarrollada en el Instituto Noruego de Salud Pública (NIPH), contra una epidemia y evaluada entre 1988 y 1991. La cepa para su producción fue 44/76-SL, tipo B:15:P1.7,16	Aplicada en la región de Normandía, Francia.
MeNZB®	Desarrollada con la cepa NZ 98/254 (cepa tipo B:4:P1-7-2) usada entre 2004 y 2008. El proyecto fue una asociación del gobierno de Nueva Zelanda, la Universidad de Auckland, el NIPH y Chiron.	Aplicada durante epidemias en Nueva Zelanda.
Bexsero®	Desarrollada por Novartis y designada para proveer protección de amplio-espectro. Recientemente con licencia por la Agencia de Medicinas Europeas.	Combinación de MVs de la cepa NZ 98/254 con tres antígenos recombinantes, dos de los cuales son proteínas de fusión.

Una formulación multivalente que contiene MVs nativas de *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri* produjo altos niveles de IgG (en suero) e IgA (en saliva) en ratones y ratas inmunizadas por vía oral. ⁶⁰

I.5. RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDERO

El sistema inmune en mamíferos está constituido por una respuesta innata y una adaptativa. ⁶¹ La inmunidad innata filogenéticamente es primitiva, por lo que la comparten vegetales y animales (invertebrados y vertebrados, incluyendo mamíferos). Es mediada por monocitos, macrófagos y células dendríticas. Se caracteriza por ser de respuesta rápida, actúa directamente sobre el patógeno sin necesidad de selección o maduración celular, no tiene memoria y es fundamental en la génesis de la sepsis y choque séptico. La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por la selección clonal de linfocitos antígeno específicos, es tardía, tiene memoria, da protección prolongada, no participa en la patogénesis de la sepsis

y el choque séptico y exclusivamente se presenta en los animales vertebrados. Sin embargo, la inmunidad adquirida no ocurre inmediatamente en respuesta a un antígeno o patógeno nuevo y el retardo en la respuesta podría tener un efecto devastador en la supervivencia del hospedero.⁶²

I.5.1. Inmunidad innata

La respuesta inmune innata es la primera defensa del hospedero contra microorganismos invasores. Se caracteriza por ser inmediata, inespecífica y sin memoria, mientras que la respuesta adquirida tarda en desarrollarse y se le debe enseñar a través de la generación somática de un repertorio diverso de receptores, con objeto de desarrollar una respuesta inmunitaria apropiada contra los patógenos invasores^{61, 62}. Esta diferencia de reacción sugiere que la respuesta de inmunidad innata se debe basar en el reconocimiento de patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPS). Por tanto, las respuestas inmunitarias innata y adquirida están coordinadas, de tal forma que la respuesta inmune innata representa el proceso inicial e instructor en la defensa del hospedero. El hospedero vertebrado ha desarrollado receptores de reconocimiento específicos de patrones para detectar a estos PAMPS (PRR). Dichos receptores pueden dividirse en varias clases: receptores secretados, endocíticos y de señalización; estos últimos son capaces de inducir la expresión de una variedad de citocinas que subsecuentemente amplifican la respuesta inmune innata y dirigen la respuesta inmune adaptativa. Este mecanismo, sin embargo, es más complejo de lo que se pensaba.^{63, 64, 65}

El sistema inmune ha desarrollado diferentes métodos para discriminar moléculas propias de moléculas extrañas. La estrategia de reconocimiento microbiano se basa en la detección de PAMPS conservados, los cuales son productos esenciales e invariantes de la fisiología microbiana. Éstos se caracterizan por ser expresados únicamente por patógenos (no son producidos por el hospedero); son relativamente conservados en microorganismos similares y su expresión es esencial para la sobrevivencia del microorganismo. Algunos de los PAMPs más importantes incluyen el RNA viral de doble cadena; los dinucleótidos CpG no metilados comunes en el DNA bacteriano, pero escasos en el DNA de vertebrados; las mananas de las levaduras; los glicolípidos de las micobacterias; las lipoproteínas de bacterias y parásitos; los ácidos lipoteicoicos de bacterias Gram-positivas y el LPS de bacterias Gram-negativas. Debido a que los PAMPs son producidos sólo por los microorganismos, el sistema inmune innato los reconoce como “firmas moleculares” de la infección, y su reconocimiento por los PRRs propicia la inducción de una respuesta

inmunitaria. Los PRRs han sido recientemente estudiados y uno de los receptores de señalización que han tomado mayor importancia en los últimos años son los receptores tipo Toll que contribuyen en gran medida a la respuesta inflamatoria en el hospedero.^{66,67}

I.5.2 Receptores tipo Toll

El concepto de inmunidad innata ha tenido un cambio notable durante los últimos años, debido al descubrimiento de los receptores tipo Toll (TLRs, proteínas transmembranales expresadas por células del sistema inmune innato) en los mamíferos y su participación en el reconocimiento de patógenos microbianos. Actualmente, el estudio de estos receptores es de gran interés, sobre todo en medicina humana y muy recientemente en medicina veterinaria, debido a que desempeñan un papel central, tanto en el desencadenamiento de la inmunidad innata, como en la coordinación entre la inmunidad innata y la adaptativa. La participación de los TLRs en la respuesta innata se describió por primera vez en un artrópodo, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. La proteína Toll de *Drosophila* originalmente se identificó como un factor requerido para el establecimiento de la polaridad dorso-ventral en el embrión en desarrollo.⁶⁸

La proteína Toll además se reconoció como un receptor transmembranal que activa el factor de transcripción denominado Dorsal (que es homólogo al factor de transcripción NF- κ B en vertebrados) al mediar la degradación de Cactus, una proteína represora de Dorsal. Una vez liberada de Cactus, Dorsal puede traslocarse al núcleo donde activa genes específicos. Debido a la homología de Toll con el receptor de interleucina 1 (RIL1)⁶⁹ y a la conservación de los canales de señalización en ambos sistemas, se propuso que Toll estaba involucrado en la regulación de la respuesta inmune, lo cual se corroboró con la demostración de su participación en la inducción de resistencia a infecciones producidas por hongos.⁷⁰

Poco tiempo después, mediante búsquedas en las bases de datos de identificadores de secuencias expresadas (EST), y utilizando secuencias conservadas en el dominio de señalización de Toll/RIL1, se identificó un homólogo del receptor Toll de *D. melanogaster* en el ser humano. A partir de dicho hallazgo, y utilizando estrategias similares, se identificó una familia de proteínas estructuralmente relacionada con la proteína Toll de *D. melanogaster* que colectivamente se les denomina receptores tipo Toll (TLRs) y que consiste de 11 miembros: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10⁷¹ y el recién identificado TLR11.⁷²

Asimismo, se ha indicado que seguramente en un futuro próximo se descubrirán más TLR.⁷³ Cabe señalar que la familia de TLR humanos se subdivide en cinco subfamilias que, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos son: TLR3, TLR4, TLR5, TLR2 y TLR9.⁷⁴ La subfamilia TLR2 está compuesta de TLR1, TLR2, TLR6 y TLR10; la subfamilia TLR9 está compuesta de TLR7, TLR8 y TLR9. Los TLRs se expresan tanto en tejido linfoide como no linfoide. A continuación se indica, por orden numérico, cada uno de los TLR conocidos y su expresión en células del sistema inmune:

TLR1: se expresa en monocitos, neutrófilos, células B y células asesinas naturales.

TLR2: en monocitos, neutrófilos y células dendríticas.

TLR3: en células dendríticas.

TLR4: en monocitos, neutrófilos, células dendríticas y endoteliales.

TLR5: en monocitos y células dendríticas.

TLR10: en linfocitos B de tejidos inmunitarios, como bazo, nódulos linfáticos y timo.

TLR11: en células epiteliales del riñón y la vejiga, y en menor cantidad en células del hígado.

El resto de TLRs se expresan fundamentalmente en monocitos y células dendríticas.^{66, 75, 76}

Los TLR que comprenden la clase de PRRs expresados en la superficie celular, activan vías de señalización que inducen respuestas efectoras antimicrobianas y de inflamación al reconocer los PAMPs.⁷⁷

A continuación se enlistan los PAMPs que reconocen los diferentes receptores tipo Toll:

TLR1-2: péptidoglicanos de bacterias Gram-positivas. Lipoproteínas de bacterias Gram- negativas. TLR2 también reconoce lipopolisacárido (LPS) atípico de *Leptospira interrogans*, y LPS atípico de *Porphyromonas gingivalis*, lo que sugiere que TLR2 tiene capacidad específica de reconocimiento de los LPS de forma cilíndrica que inducen la producción de citocinas.

TLR3: virus de RNA.

TLR4: lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas.

TLR5: flagelina bacteriana.

TLR6: lipopéptidos y péptidoglicanos derivados de micoplasmas. TLR6 actúa de manera sinérgica con TLR2 para reconocer péptidoglicanos, que son componentes de bacterias Gram positivas.

TLR7: componentes antivirales pequeños. Este receptor reconoce compuestos sintéticos considerados inmunomoduladores como los derivados de la imidazoquinolina, además de loxoribina y bropirimina, que

tienen capacidad antiviral debido a que inducen la producción de citocinas proinflamatorias, en especial INF- γ .

TLR9: DNA bacteriano. Es esencial para el reconocimiento de motivos CpG no metilados de ADN bacteriano.

TLR10: Está filogenéticamente relacionado con TLR1 y TLR6. Se desconoce cuál es el ligando de este receptor.

TLR11: Fue recientemente descubierto en ratón y los análisis filogenéticos lo clasifican en un subgrupo junto con el TLR5. El TLR11 en humanos podría no expresarse, ya que a las secuencias analizadas a la fecha muestran codones de terminación dentro del marco abierto de lectura del gen.^{67, 76, 78}

I.5.3. TLR4 y sus ligandos

El receptor tipo Toll 4 (TLR4), es el receptor del LPS de las bacterias Gram-negativas; TLR4 es el miembro mejor caracterizado de la familia de los TLRs. El LPS se une en el suero a la proteína de unión al LPS (LBP), la cual libera LPS al CD14 que es una proteína que existe en 2 formas, una forma soluble y su forma de glicosilfosfatidilinositol (GPI) anclada a la membrana externa. El CD14 se asocia físicamente como un complejo que incluye a TLR4 y una proteína accesoria extracelular llamada MD-2. MD-2 es una glicoproteína de 20 a 30 kDa que carece de dominio transmembranal la cual, a semejanza de CD14, presenta un dominio extracelular para la endotoxina de TLR4. Cada componente de este complejo es requerido para la eficiente señalización inducida por el LPS. De hecho, las mediciones bioquímicas de la unión de LPS purificado a MD-2 muestra una relativamente alta afinidad por el LPS, con una constante de disociación [$K_d = 65\text{nM}$], similar al CD14.⁷⁹

Además del LPS, TLR4 parece mediar la respuesta inflamatoria de muchos y diferentes ligandos propios y no propios, aunque no está completamente claro si estos, también se unen adicionalmente al complejo CD14-TLR4-MD-2 directamente. Entre algunos otros componentes que pueden ser ligandos para TLR4, está el Taxol, que se ha observado mimetiza la señalización inducida por LPS en células de ratón. Otra estructura extraña reconocida por TLR4 es la proteína de fusión del virus respiratorio sincitial (proteína F). La proteína F induce una potente producción de citocinas por monocitos y macrófagos y este efecto está completamente ausente en células de ratón deficiente de CD14 o TLR4 funcional, sugiriendo que el complejo CD14-TLR4 media dicha respuesta.⁷⁹

I.5.4. Los TLRs en animales domésticos

El estudio de los receptores tipo Toll en animales domésticos es más reciente y limitado en comparación con las investigaciones realizadas en ratones y seres humanos. Actualmente, ya se han caracterizado algunos receptores tipo Toll en caninos, felinos, gallinas, cerdos y bovinos. Específicamente en esta última especie, se han detectado mediante técnicas moleculares de RT-PCR, mRNA de BoTLR2 y BoTLR4 en monocitos, macrófagos y células dendríticas de bovino.⁶² Al comparar la habilidad de macrófagos y células dendríticas (CDs) de bovino para expresar TLR y responder a distintos ligandos, se sugiere que los dos tipos de células (ambas derivadas de monocitos) muestran diferencias en la expresión de TLR, especialmente de TLR2. En ese mismo estudio se observó que tanto los macrófagos como las CDs respondieron a los ligandos de TLR con la producción de TNF, pero las CDs produjeron más IL-12, mientras que los macrófagos produjeron más IL-10.⁸⁰ Aunque no se ha determinado, se ha sugerido que el CpG DNA podría estimular CDs de bovino vía TLR9, como se ha descrito para linfocitos B, macrófagos de bovino y para CDs de otras especies.⁸¹ En bovinos se ha visto que los motivos CpG inducen respuestas inmunitarias celulares caracterizadas por inducir proliferación de células B, producción de IL-12 e INF- γ ; siendo necesaria la generación de anticuerpos específicos de TLR de bovino para reconocer los receptores involucrados en estas respuestas.⁶⁷

I.5.5. Función de los TLRs en la respuesta inmunitaria

La activación de los TLRs expresados en células presentadoras de antígeno (CPA) especializadas como las células dendríticas y los macrófagos, desempeña un papel crucial en la respuesta inmune innata y la iniciación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Como ya se mencionó, los TLRs sólo reconocen péptidos propios de los patógenos, debido a que la activación de los TLRs de una CPA provoca que esta célula exprese péptidos antigénicos sobre su superficie celular, que están unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y activan células T específicas de antígeno. Los péptidos propios expresados y presentados por las CPA no son reconocidos como extraños, porque las células T específicas para estos péptidos son eliminadas durante la selección negativa en el timo. De esta manera, la selección negativa y la inducción microbiana de moléculas coestimuladoras juntas, aseguran que la respuesta inmunitaria adaptativa sea generada contra patógenos infecciosos, pero no contra antígenos propios.⁷⁸

Las células inmunitarias utilizan múltiples TLRs y otros PRRs para detectar simultáneamente varias estructuras de un microorganismo; de esta manera, la información sobre un patógeno en particular se

envía a la célula, permitiendo la generación de respuestas ligeramente diferentes, pero con alto grado de especificidad. Como ya se ha señalado, la activación de los TLR propicia no sólo la inducción de respuestas inflamatorias, también provoca una respuesta inmunitaria adaptativa antígeno-específica.⁷⁴

Los TLRs actúan a través de moléculas adaptadoras que activan varios factores de transcripción y cinasas, de tal manera que el hospedero puede responder a los agentes infecciosos con una importante respuesta inflamatoria. Estas moléculas adaptadoras incluyen MyD88, TIRAP, TIRP, TOLLIP y TRIF, las cuales interactúan y activan al receptor de IL-1 asociado a la familia de cinasas (IRAK), las cuales a su vez activan los receptores para TNF asociado al factor TRAF-6, que finalmente permite la activación del factor NF- κ B. Mientras que la mayoría de los TLRs utilizan más de un adaptador, ciertas moléculas adaptadoras son esenciales para la señalización de un solo TLR, por ejemplo el TLR4, cuya señalización es dependiente de la expresión de TIRP.⁶⁷

La dimerización de determinados TLRs puede detectar características individuales que son comunes a diferentes clases de microorganismos. Por ejemplo, el TLR4 junto con el TLR5, detectan un organismo flagelado Gram-negativo, mientras que el TLR5 junto con el TLR2 y el TLR6, detectan un organismo Gram-positivo. El resultado final de esta sorprendente capacidad de tipificación es la expresión de citocinas y otras moléculas activadoras de las células de la respuesta inmune adaptativa, dirigiendo entonces la ofensiva hacia el microorganismo invasor.⁷⁹

1.5.6. Receptores tipo Toll y la respuesta inflamatoria

La inmunidad innata, una vez activada por un proceso infeccioso, induce la síntesis de interleucinas (IL) conocidas genéricamente como citocinas, por monocitos, macrófagos, células cooperadoras TCD4 y células dendríticas, proceso que es parte fundamental de la respuesta inflamatoria sistémica, que tiene como finalidad limitar el proceso infeccioso e iniciar la reparación tisular, pero que de no ser controlada evoluciona a lesión tisular generalizada y a una alteración orgánica múltiple, con eventos secundarios como: hipoperfusión refractaria, daño endotelial, inflamación no controlada, coagulación intravascular y apoptosis celular. Con base en lo anterior, una fuerte respuesta inflamatoria y sostenida (choque séptico), es el resultado de una grave desregulación de la inmunidad innata, secundaria a falla en la inhibición de la actividad del NF- κ B y/o estimulación persistente de los receptores tipo Toll, lo que lleva a síntesis continua

y exagerada de citocinas proinflamatorias con desequilibrio proinflamatorio/antiinflamatorio, que evoluciona a una alteración orgánica múltiple, apoptosis y muerte.⁸²

II. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que las MVs de diferentes géneros bacterianos, principalmente los de interés médico, acarrean importantes factores de virulencia, entre los cuales se encuentra el LPS. A su vez, las células presentadoras de antígenos como los macrófagos, expresan en su superficie receptores tipo Toll que pueden ser estimulados por PAMPs contenidos en estas estructuras. De esta manera, se desencadenan diferentes vías de señalización involucradas en la respuesta inmune innata entre las cuales se encuentra la producción de algunas citocinas que pueden polarizar posteriormente a una inmunidad adaptativa, proporcionándoles a las MVs características esenciales para ser utilizadas como agentes vacunales acelulares, rubro que no ha sido muy explotado, contando únicamente con algunas vacunas hechas a partir de MVs de *Neisseria meningitidis* en el Sector Salud. A pesar de esta información, hasta ahora en México se cuentan con muy pocos reportes sobre el papel que juegan las MVs de géneros bacterianos, de interés veterinario como *M. haemolytica* para la prevención de las enfermedades que estas provocan. Por lo que, resulta muy interesante saber si el LPS de MVs de *Mannheimia haemolytica* A2 puede estimular TLR4 expresado en macrófagos ovinos y así conferirles la capacidad para promover la producción de algunas citocinas de respuesta inmune innata que finalmente le pueda permitir a las células del hospedero desencadenar una respuesta adaptativa y prevenir la infección por la bacteria. Ayudando así a tener más herramientas para la prevención y lucha contra la enfermedad.

III. HIPÓTESIS

El LPS contenido en las MVs de *M. haemolytica* A2 es un potente estimulador del receptor TLR4 y promueve la transcripción de genes de citocinas de respuesta inmune innata (IL-1 β , TNF- α , IL-10) en macrófagos ovinos, que pueden servir como unión entre la respuesta inmune innata y la adaptativa desencadenando así una respuesta en contra de la bacteria.

IV. OBJETIVO GENERAL

Identificar la expresión del receptor TLR4 en macrófagos de ovino y su activación vía LPS, mediante producción de citocinas de respuesta inmune innata, al interactuar con MVs de *M. haemolytica* A2 en condiciones *in vitro*.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener MVS de *M. haemolytica* A2 a partir de sobrenadante de cultivo e identificarlas por microscopía electrónica.
2. Identificar al LPS contenido en las MVs de *M. haemolytica* A2.
3. Diferenciar los monocitos de sangre periférica a macrófagos, mediante estímulo con GM-CSF por 5 días.
4. Identificar el receptor tipo Toll-4 (TLR4), así como algunos receptores de membrana (CD14, MHCII, CD1a, CD86), que expresan los macrófagos de ovino, mediante citometría de flujo.
5. Interaccionar macrófagos de ovino con MVs de *M. haemolytica* A2 en condiciones *in vitro*.
6. Cuantificar niveles de mRNA de citocinas de respuesta innata (IL-1 β , TNF- α , IL-10, IL-4) mediante qRT-PCR.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Obtención de Microvesículas (MV) de *M. haemolytica* A2

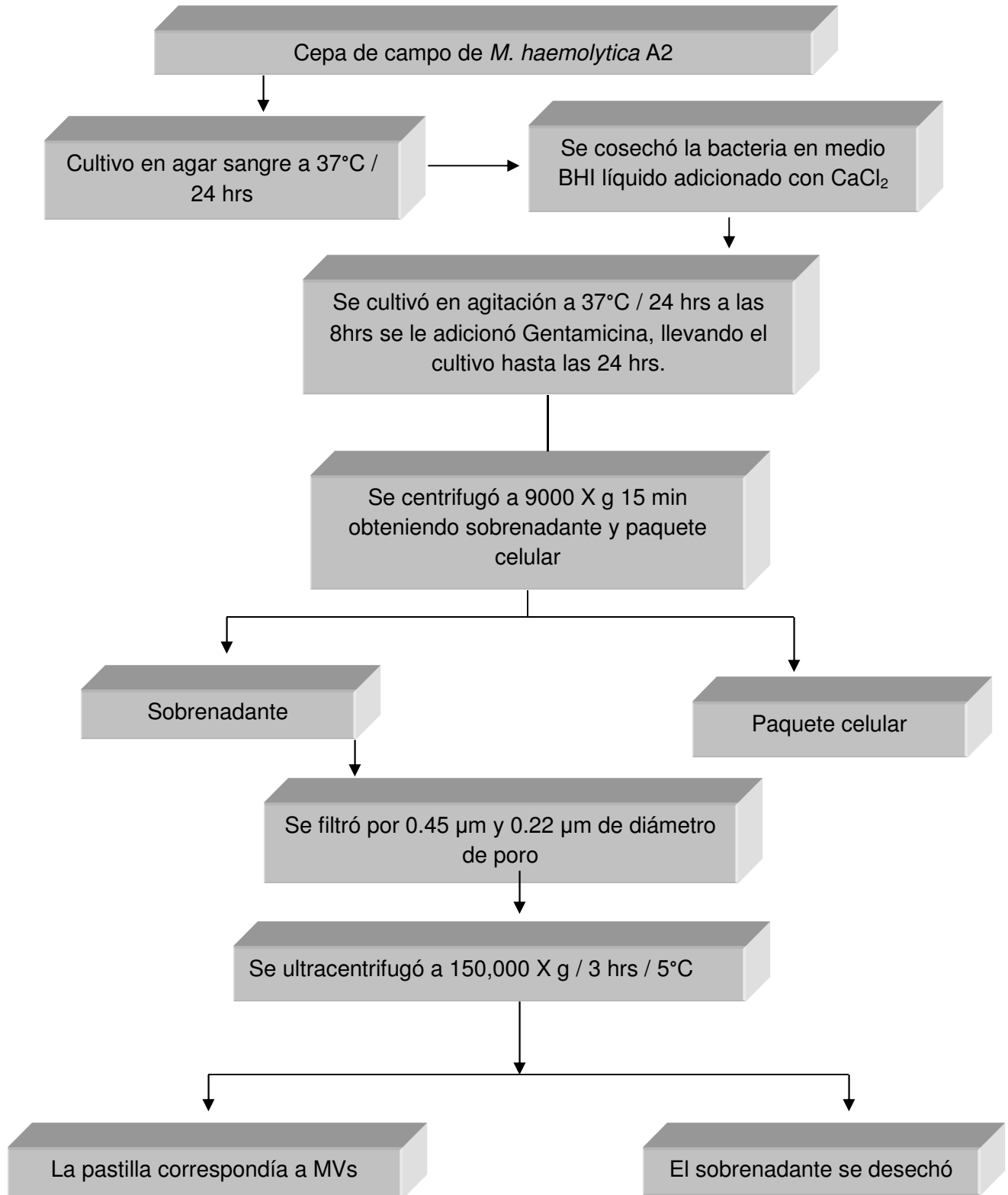
En el **Esquema 1** se muestra el diagrama de flujo para la obtención de las MVs de *M. haemolytica* A2. Se realizó el crecimiento bacteriano en cuatro placas de agar sangre mediante estría cerrada, incubándose a 37°C / 24 h. Para este paso se utilizó una cepa de *M. haemolytica* A2 de campo, obtenida a partir del aislamiento de un pulmón neumónico, de un ovino muerto por la enfermedad; esta cepa fue recuperada en un trabajo previo.⁵³ Se realizó tinción de Gram y un análisis bioquímico mediante un kit comercial (Api 20E, BioMérieux S.A., México), para corroborar la morfología e identidad bacteriana respectivamente.

Posteriormente al cultivo de las bacterias, se cosecharon en 500 ml de medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) enriquecido con cloruro de calcio (CaCl_2 , 1ml/250 ml BHI) a 37°C / 8 hrs en agitación suave. Al cabo de 8 hrs se adicionó Gentamicina⁸³ a una dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cultivo y se incubó nuevamente el cultivo en las condiciones antes mencionadas, hasta completar 24 hrs. Paralelamente, se realizó tinción de Gram para verificar morfología bacteriana.

El cultivo anterior se centrifugó a $9000 \times g$ / 15 min, en este paso se separó la biomasa, la cual se lavó por centrifugación en 2 ocasiones con amortiguador de Hepes 10 mM con inhibidores de proteasas (HIP) y se congeló a -70°C hasta su uso. El sobrenadante se filtró por membranas de nitrocelulosa (Millipore, Irlanda), primero por $0.45 \mu\text{m}$ y posteriormente por $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro de poro, el producto de la filtración se ultracentrifugó (BECKMAN COULTER, EUA) a $150,000 \times g$ / 3 hrs / 4°C . Se eliminó el sobrenadante y la pastilla resultante enriquecida con MVs, se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 o HIP según la finalidad del experimento con las MVs.⁸³

VI.2. Extracción de membrana externa de *M. haemolytica* A2

Para esta metodología se utilizó el botón de células completas. Se descongeló la pastilla conservada a -70°C y se dividió la muestra en varias porciones, a las que posteriormente se les realizaron 10 pulsares de 60 s con 1 min de descanso en baño de hielo con sonicador de punta (Ultrasonic Proccesor, VC 130, SONICS & MATERIAL INC). Posteriormente se centrifugó la muestra sonicada a $1,000 \times g$ / 15 min para la remoción de restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se ultracentrifugó a $100,000 \times g$ / 2 hrs. La pastilla correspondía a una fracción de la envoltura celular cruda que contenía, las membranas externa e interna y el sobrenadante contenía al citosol. La pastilla de membranas totales se disolvió en amortiguador con sarcosyl al 1% y se colocó en agitación suave por 30 min / T° ambiente. Finalmente, se ultracentrifugó la muestra a $100,000 \times g$ / 1 hrs donde el paquete resultante correspondiente a la membrana externa se disolvió en HIP, y el sobrenadante correspondía a la membrana interna, ambos se conservaron en congelación a -70°C hasta su uso. Es importante mencionar que para el corrimiento electroforético se necesitó que las muestras a utilizar fueran previamente limpiadas por el método de purificación de proteínas en presencia de detergentes y lípidos, técnica que se describirá más adelante.⁸³



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

VI.3. Precipitación de proteínas en solución, en presencia de detergentes y lípidos

Se colocaron 200 μ l de la muestra problema (MVs, PME, PMI) conservada en congelación más 400 μ l de metanol para precipitar las proteínas; esta solución se sometió a la acción del vortex para mezclar y se centrifugó por 1 min / 9,500 X g. Al resultado de este paso se le adicionaron 200 μ l de cloroformo y se sometió nuevamente a la acción del vortex, se centrifugó por 10 seg / 9,500 x g. A esta muestra se le adicionaron 300 μ l de agua desionizada y se siguió el mismo procedimiento que en los pasos anteriores. La fase superior se removió cuidadosamente y fue desechada, se adicionaron 300 μ l de metanol al resto de la fase clorofórmica y la interfase con las proteínas precipitadas, esta última muestra se mezcló con vortex y se centrifugó por 2 min, el sobrenadante se retiró y la pastilla se secó bajo rocío de aire. La pastilla se conservó a -70°C hasta su uso.

VI.4. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas por el método de Bradford ⁸⁴ se realizó en una placa de microtitulación de 96 pozos. Para determinar la concentración de proteína que contenía cada muestra, se realizó una curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB) que iba de menor a mayor concentración a partir de un stock de trabajo de 1 mg/ml. Se colocaron 10 μ l de la muestra problema más 200 μ l de reactivo de Bradford y se mezcló mediante agitación por 5 min. Finalmente, la placa se leyó en un lector de ELISA (BIO-TEK ELX 808) a 590 nm y por regresión lineal se calculó la cantidad de μ g de proteína por μ l contenidos en la muestra problema.

VI.5 Análisis Electroforético mediante SDS-PAGE

Posterior a la cuantificación de la proteína por el método de Bradford, se observó el patrón de proteínas que acarrean las MVs mediante la técnica de SDS-PAGE (Bio-Rad) por el método de Laemmli ⁸⁵ en geles de poliacrilamida al 12%, corroborando la presencia de las proteínas previamente reportadas por González y col. (LKT, LPS, PME de diferentes pesos moleculares). ⁵³ Además, se comparó con muestras de proteínas de membrana externa, para corroborar la similitud entre ambas dado el origen de éstas, previamente descrito. Se colocó un marcador de peso molecular (MPM) en el primer carril y en los siguientes carriles se colocaron las muestras de las MVs, previamente solubilizadas en amortiguador de muestra y hervidas durante 10 min. Se dejó correr el gel en una cámara de electroforesis, conectada a una

fuerza de poder a 120 V / 2 hrs. Posteriormente, se tiñó el gel con azul de Coomassie, colocando el gel en la solución de tinción, a temperatura ambiente y en agitación suave (1-3 hrs), posteriormente el gel se destiñó con una solución desteñidora (metanol 50% - ácido acético 7% - agua) por tres veces, con intervalos de 30 min cada uno, hasta visualizar las bandas de proteínas. Finalmente, el gel se conservó en ácido acético al 10%. En otro de los casos, el gel se tiñó con plata utilizando un kit comercial (Silver Stain Plus, BIO-RAD, 161-0449) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para identificar con mayor exactitud las proteínas con pesos moleculares similares entre la fracción de membrana externa y las MVs, se analizaron los pesos moleculares de los geles, utilizando el software SynGene Gene Tools File Versión 4.00.00, en donde se compararon diferentes muestras de MVs y PME.

VI.6. Análisis de MVs mediante tinción negativa por microscopía electrónica

Para observar a las Mvs, éstas se prepararon mediante tinción negativa para posteriormente ser observadas al microscopio electrónico. Una vez obtenidas las MVs se colocaron en una rejilla (Electron Microscopy Sciences) y se contrastaron con ácido fosfotúngstico al 1% pH 6.0 por 1 min, la muestra se dejó secar y posteriormente se observaron al microscopio electrónico (JEOL, JEM 2000 EX).

VI.7. Diferenciación de monocitos de sangre periférica de ovino a macrófagos

Para la obtención de los macrófagos, se realizó la diferenciación de monocitos obtenidos a partir de sangre periférica de ovinos clínicamente sanos. Para ello, se obtuvieron 160 ml de sangre heparinizada, esta muestra se sometió a gradiente de Lymphoprep (Axis-Shield) siguiendo una técnica modificada a partir de las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el paquete celular (leucocitos) se procedió a la separación de las células CD14⁺ mediante la utilización del sistema de separación magnética MiniMacs human CD14 (Miltenyi), siguiendo las indicaciones de fabricante. La muestra resultante de esta separación fue teñida y analizada para el Cluster (Grupo o Cúmulo) de Diferenciación 14 (CD14, Anti-CD14 Pacific Blue, BioLegend) mediante citometría de flujo (FORTESSA, BECTON DICKINSON) para confirmar su identidad. Además se analizaron otros marcadores de receptores de membrana, como el Complejo Principal de Histocompatibilidad tipo II (MHC-II), Cluster de Diferenciación 86 (CD86) y Cluster de Diferenciación 1a (CD1a). Posteriormente los monocitos se cultivaron en placa de 12 pozos colocando 2×10^6 células por pozo en medio RPMI 1640 suplementado con: suero fetal bovino al 10% (SFB, GIBCO), L-glutamina 2 mM

(GIBCO) y antibióticos y antimicótico (CAISSON) al 1% (Mo-MQ); finalmente, se dejaron incubando a 37°C en condiciones de 5% CO₂ durante 24 hrs para propiciar la adhesión celular. Al cabo del tiempo determinado se realizó un cambio de medio monocitos-macrófagos y se agregaron 100 ng de Factor estimulante de colonia Granulocito-Macrófago (GM-CSF), por 1 x 10⁶ células. Este cultivo se llevó hasta los 5 días y se le adicionó GM-CSF nuevo cada tercer día para mantener el estímulo de diferenciación. Al día 5 se le adicionaron los diferentes tratamientos con MVs para cuantificar la cinética de producción de citocinas.

VI.8. Citometría de flujo

Con la finalidad de identificar la presencia de los diferentes receptores de membrana tales como, TLR4 y CD14 permitiendo este último, la identificación de monocitos a partir de la muestra obtenida, así como otros receptores de membrana (MHC II, CD86, CD1a), se utilizó una técnica de tinción de citometría de flujo. Para ello se obtuvo una muestra representativa de aproximadamente 5 x 10⁵ células, éstas se bloquearon con SFB por 30 min a 4°C. Después, se lavó la muestra en 2 ocasiones para eliminar el exceso de SFB con una solución de tinción (Facs Flow), posteriormente se colocó el anticuerpo de interés y se incubó en cuarto oscuro a 4°C / 20 min. Se volvió a lavar en 2 ocasiones con la solución de tinción y finalmente se fijó la muestra con paraformaldehído al 1% para su lectura en el citómetro de flujo (FORTESSA, BECTON DICKINSON).

VI.9. Condiciones de cultivo celular

Una vez identificados los macrófagos mediante citometría de flujo, se asignó el primer pozo como control, es decir, células sin ningún tratamiento, los siguientes pozos correspondían a los diferentes tratamientos que fueron: 2 µg de LPS (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma Aldrich) como control positivo, 5 y 10 µg de MVs de *M. haemolytica*, 10 µg de MVS con Polimixina B (PB, Sigma Aldrich, utilizada como inhibidor de LPS a dosis de 0.4 mg/ml) y finalmente como control de la inhibición de la PB, se adicionaron 2 µg de LPS con PB (a la misma dosis). En todos los casos se determinó la presencia del receptor TLR4 y la actividad de las células mediante la cuantificación de mRNA de las diferentes citocinas. El cultivo se mantuvo en estufa de CO₂ a 37°C y se obtuvieron muestras para la medición de transcripción de citocinas a los tiempos de 0, 1 y 3 h, en todos los casos.

VI.10. Cuantificación de Interleucinas mediante qRT-PCR

Finalmente, a partir de las muestras obtenidas en los diferentes tiempos, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR), para medir la producción de mRNA de las diferentes interleucinas. Las citocinas a evaluarse fueron: IL-1 β , TNF- α e IL-10. Para ello, primero se debió proceder a la extracción de RNA de la siguiente manera. A partir de las células mantenidas en cultivo, se obtuvo RNA mediante el reactivo de Trizol (Life Thecnologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. La purificación e integridad de los extractos de RNA fueron evaluados por un Nano Drop 2000, UV-Vis Spectrophotometer y mediante geles de agarosa al 1%. Posterior a este procedimiento se utilizó un kit para realizar la qRT-PCR (Qiagen Quantitect SYBR one-step RT-PCR kit) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron: 30 min a 50°C, 15 min a 95°C y 50 ciclos de 20 s a 95°C, 45 s a 90°C, 30 s a 72°C. Los iniciadores (*primers*) que se utilizaron para este último paso se presentan en la **Tabla 4.**⁸⁶

Tabla 4: Primers utilizados para la cuantificación del RT-PCR en tiempo real.⁸⁶

	Oligonucleótidos	Secuencia	Longitud (bp)
GAPDH	ovGAPDH F	5' GCGTGAACCACGAGAAGTATAA 3'	120
	ovGAPDH R	5' CCCTCCACGATGCCAAAGT 3'	
IL-1β	ovIL-1 β F	5' CGAACATGTCTTCCGTGATG 3'	143
	ovIL-1 β R	5' TCTCTGTCCTGGAGTTTGCAT 3'	
TNF-α	ovTNF α F	5' GGTGCCTCAGCCTCTTCTC 3'	136
	ovTNF α R	5' GAACCAGAGGCTGTTGAAG 3'	
IL-10	ovIL-10 F	5' TGCTGGATGACTTTAAGGG 3'	
	ovIL-10 R	5' AGGGCAGAAAGCGATGACA 3'	

El análisis de la expresión relativa se realizó mediante el método $\Delta\Delta C_t$ utilizando como gen de referencia el que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y para observar la diferencia significativa entre grupos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba múltiple de comparación Tukey con un intervalo de confidencialidad del 95%.⁸⁷

VII. RESULTADOS

VII.1. Obtención e identificación de MVs de *M. haemolytica* A2

Se realizó la obtención de las MVs por la metodología ya descrita y se cuantificó el total de proteína en cada nuevo experimento por la técnica de Bradford. Se observaron los patrones de proteína de las MVs mediante geles de poliacrilamida al 12% teñidos con azul de Coomassie y se identificaron 3 proteínas de membrana externa (PME) de interés inmunogénico previamente reportadas^{52,53} de 60, 54 y 45 kDa respectivamente. Al mismo tiempo, se observaron similitudes entre patrones de proteínas de membrana externa y de MVs de *M. haemolytica* A2, para confirmar la biogénesis de estas estructuras. Se pudo observar que la fracción de membrana externa y las MVs comparten una gran cantidad de proteínas en su estructura que van desde los 75 hasta los 25 kDa. Es evidente que en las MVs se observa una mayor cantidad de proteínas debido a que éstas están compuestas, además de PME, de algunas proteínas periplásmicas que se encuentren en tránsito al momento de su formación (**Fig. 1**).

Para identificar con mayor exactitud las proteínas con pesos moleculares similares entre la fracción de membrana externa y las MVs, se analizaron los pesos moleculares de los geles, utilizando el software SynGene Gene Tools File Versión 4.00.00, en donde se compararon diferentes muestras de MVs y PME (**Tabla 5**). Se encontraron 6 proteínas con pesos iguales y 6 con pesos muy similares, esto aplicándose únicamente a las bandas de proteínas más visibles en los geles de poliacrilamida, lo cual corrobora la identidad que adoptan la MVs a partir de la membrana externa de las bacterias completas. Cabe mencionar que se necesitarían otro tipo de pruebas para determinar los pesos moleculares exactos de las proteínas y poder confirmar que efectivamente se tratan de las mismas que ya han sido descritas.

Finalmente y como prueba fehaciente del enriquecimiento de la pastilla con MVs, estas se contrastaron mediante tinción negativa con ácido fosfotúngstico para su visualización al microscopio electrónico (**Fig. 2**). Es importante mencionar que se observa la morfología particular de su doble membrana y el tamaño variable desde los 50 hasta los 250 nm de diámetro, debido a la característica de coalescencia que estas estructuras pueden llegar a desarrollar. En los **paneles A y C** se observan estructuras redondeadas con doble membrana, de forma homogénea y tamaños ligeramente variables que corresponden a las MVs. En el **Panel B** Se muestra una vista panorámica donde se observa a la bacteria completa y el momento de la liberación de una MV (**flecha negra**) a partir de su membrana externa; cabe

mencionar que la misma estructura de doble membrana observada en la fracción enriquecida con MVs se observa en esta microfotografía. En el **Panel D** se observa una estructura redondeada a mayor aumento de aproximadamente 200 nm de diámetro, es fácil de apreciar su doble membrana debido a su origen de formación.

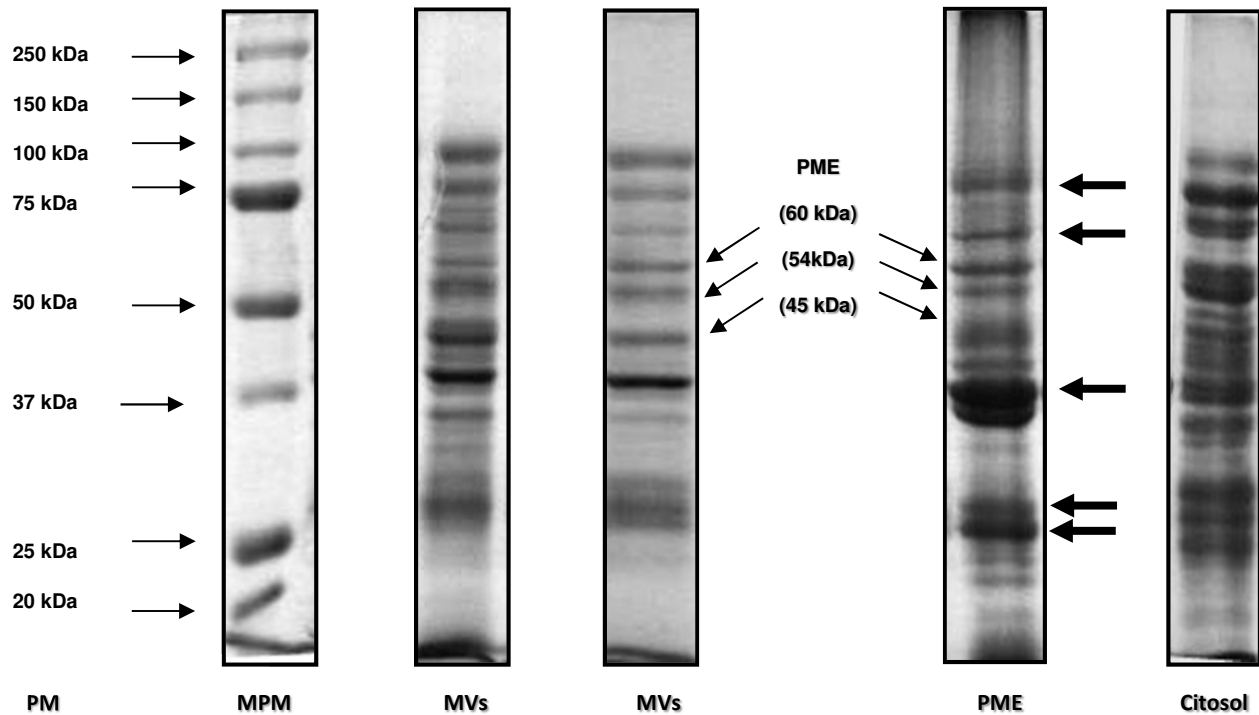


Figura 1: Las MVs de *M. haemolytica* A2 y la fracción de membrana externa comparten proteínas de interés inmunogénico. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. MPM: Marcador de peso molecular, MVs: Microvesículas de *M. haemolytica* A2, PME: Proteínas de membrana externa. Se señalan con flechas delgadas, las proteínas de interés inmunogénico presentes tanto en membrana externa, como en MVs. En el carril de PME se señalan con flechas gruesas, otras proteínas que se encuentran tanto en membrana externa como en MVs, que pudieran ser compartidas por ambas estructuras.

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR	
	MICROVESÍCULAS	PME
1	94.18	93.06
2	77.75	77.75
3	71.09	–
4	67.38	66.87
5	58.71	58.27
6	53.56	53.16
7	44.66	44.66
8	–	40.80
9	38.13	38.13
10	34.36	34.54
11	29.15	29.15
12	27.36	27.36
13	26.36	26.36
14	16.00	15.86

Tabla 5: Las MVs de *M. haemolytica* A2 y la fracción de membrana externa (PME) comparten proteínas con igual peso molecular. Se realizó el análisis de los pesos moleculares de los patrones de proteínas de MVs y de membrana externa (PME), mediante el software SynGene Gene Tools File Versión 4.00.00. En *cursivas* se presentan las proteínas con pesos idénticos. En rojo se resaltan las proteínas que han sido identificadas previamente como de interés inmunogénico.

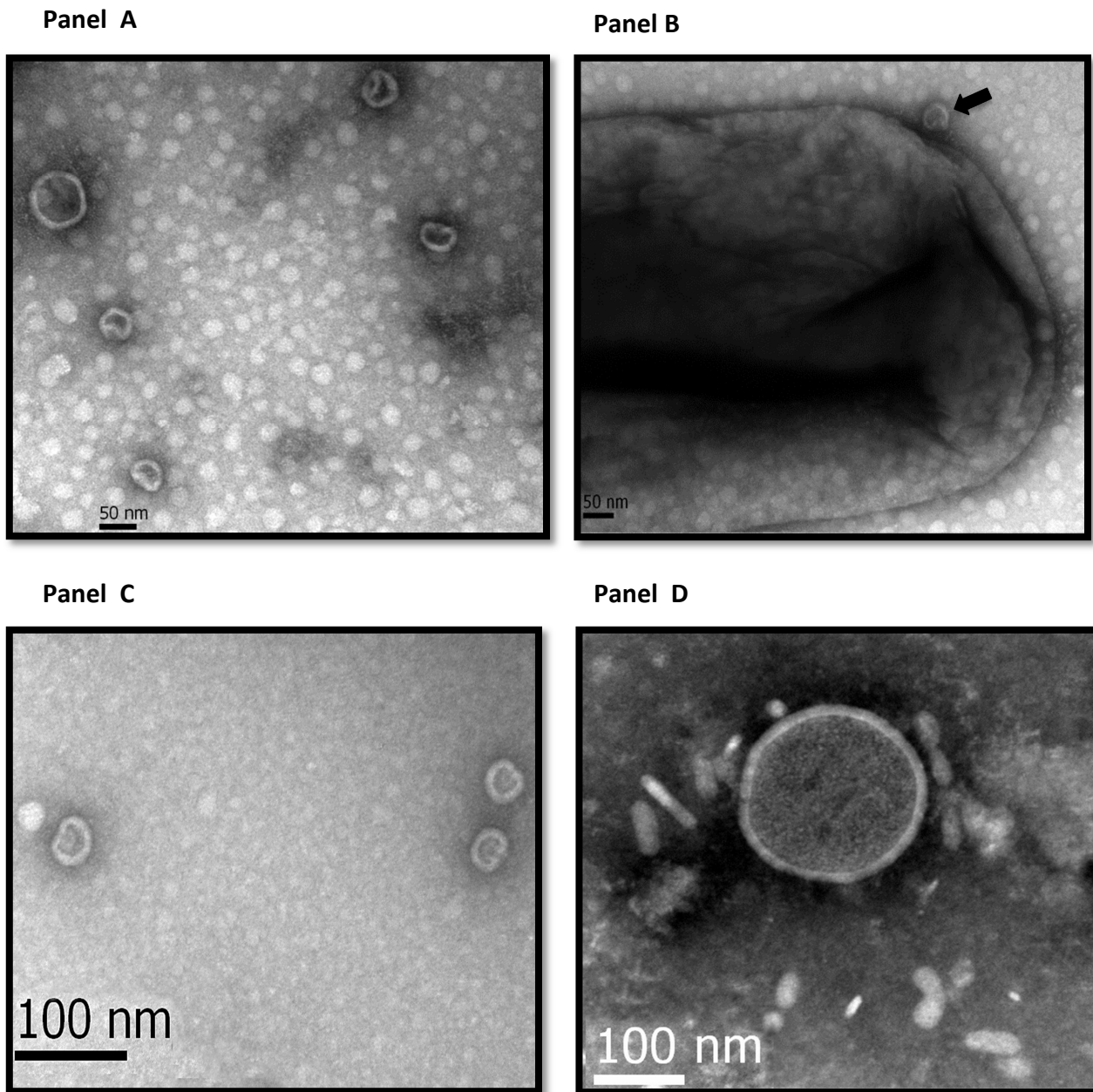


Figura 2: Microvesículas de *M. haemolytica* A2. Panel A y C: Se observan muestras de las MVs. Panel B: Se muestra una bacteria completa con la liberación de una MVs (flecha negra). Panel D: Se observa un mayor aumento de una MVs (100 y 50 nm).

VII.2. Las MVs de *M. haemolytica* A2 contienen LPS en su interior

Debido a que el TLR4 identifica al LPS de las bacterias, se determinó el LPS en diferentes muestras de MVs de *M. haemolytica* A2, mediante tinción de plata específica para LPS (Fig. 3); como control positivo

se utilizó una fracción de membrana externa y como control negativo una fracción de citosol. En todas las muestras de MVs se pudo observar la banda al final del carril correspondiente al LPS (de peso molecular aproximado de 20 kDa), así como su ausencia en las muestras del citosol, lo que confirma que nuestras muestras de MVs contienen como parte estructural al ligando del TLR4.

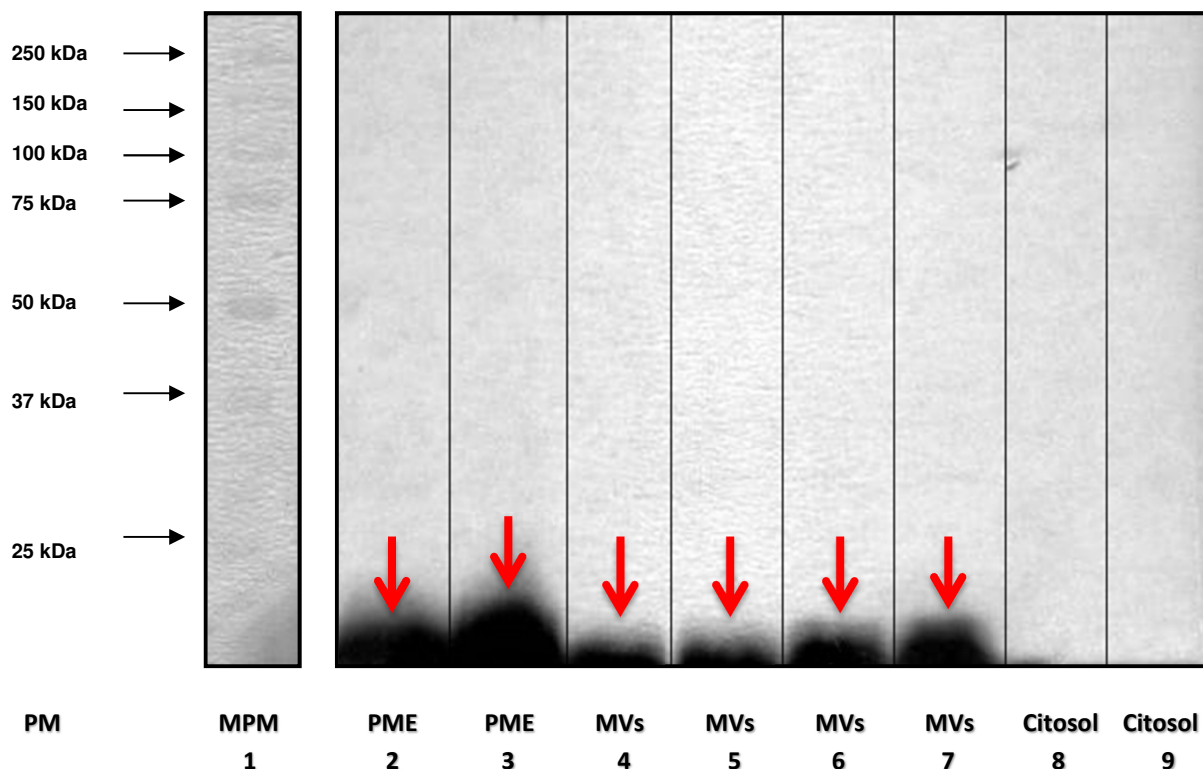


Figura 3: Las MVs de *M. haemolytica* A2 contienen LPS. Tinción de plata específica para LPS donde se analizaron varias muestras de MVs de *M. haemolytica* A2. Carril 1: Marcador de Peso Molecular (MPM). Carril 2 y 3: Control + (positivo), proteínas de membrana externa (PME). Carril 4-7: Muestras de las MVs. Carril 8 y 9: Control – (negativo), citosol. La reacción en el gel se observa al fondo del carril como una banda negra señalada con una flecha roja.

VII.3. Purificación y caracterización de monocitos ovinos

Para realizar la purificación de los monocitos ovinos, que posteriormente iban a ser diferenciados hacia macrófagos mediante estímulo con GM-CSF, se siguió el método de extracción como ya se mencionó en la metodología. Al término de esto, se tomó una muestra representativa del paquete celular para su análisis mediante citometría de flujo. En la **Fig. 4** se muestra la región de las células obtenidas después del gradiente, a la cuales llamaremos “Mononucleares de Sangre Periférica de Ovinos (MSPO)”. En el **panel A** se

muestra la gráfica que indica tamaño contra granularidad de la población de los MSPO, comparada contra células más granulares que se encuentran en una región más arriba de éstas (que probablemente correspondan a polimorfonucleares) y en el **panel B** se muestra la gráfica y el histograma de los MSPO teñidos para el marcador CD14⁺ que era nuestra población de interés (monocitos), presentando en promedio de todos los experimentos un 5% de la población total obtenida mediante el gradiente de densidad.

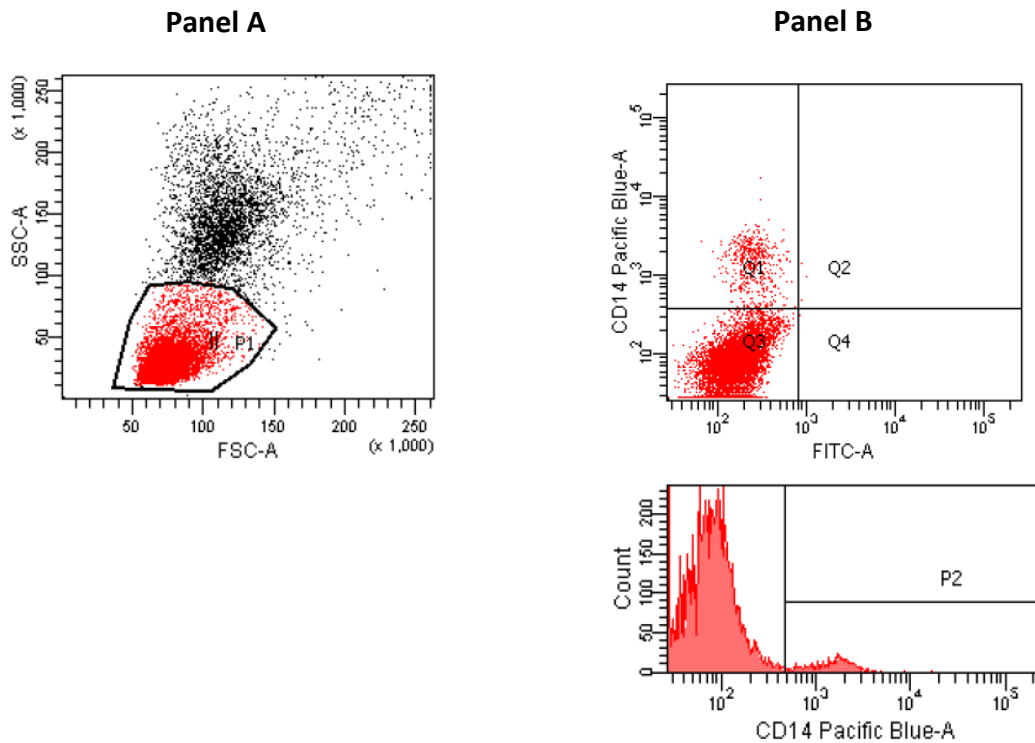


Figura 4: Gráfica e histograma de células Mononucleares de Sangre Periférica de Ovino (MSPO) teñidas para CD14. En el **panel A** se muestra tamaño y granularidad de las células MSPO obtenidas a partir del gradiente de densidad y en el **panel B** se muestra esta misma población celular teñida para el receptor CD14 la cual identifica a nuestra población de interés (solamente monocitos).

Finalmente se realizó la separación magnética y se observó el enriquecimiento de la fracción celular obtenida con células CD14⁺. En la **Fig. 5** se muestran las gráficas del antes y después de la purificación de las células, en el **panel A** se observa la gráfica y el histograma de las células MSPO, mientras que en el **panel B** se muestran las células posterior a la separación magnética, las cuales corresponden a monocitos ovinos es decir, células CD14⁺. Es evidente el cambio del porcentaje de positividad a este receptor antes y después de la purificación, que va de un 5% en la población de MSPO, a un valor del 90% mínimo en promedio

obtenido de todos los experimentos, posterior a la purificación, lo cual nos corrobora la efectividad de la separación celular. Cabe mencionar que el porcentaje de separación nunca llegó al 100% probablemente debido a que el sistema de separación está diseñado para células humanas.

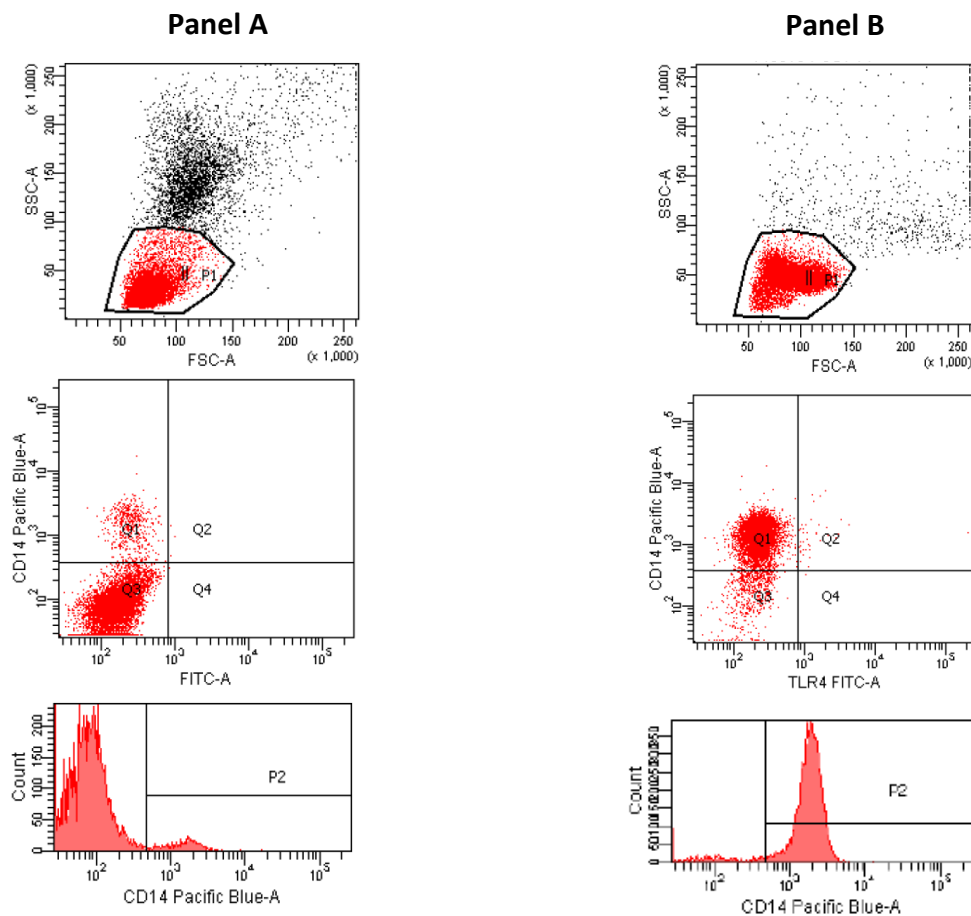


Figura 5: Análisis de la expresión de receptores de membrana antes y después de la purificación. En el **panel A** se muestran las gráficas de las células Mononucleares de Sangre Periférica de Ovino. Aproximadamente, el 5% de la población es positiva al receptor CD14 que es nuestra población de interés. En el **panel B** se muestran las gráficas de los monocitos ovinos, después de la purificación. El porcentaje de la población CD14⁺ aumenta a un 95%.

VII.4. Los monocitos ovinos se diferencian a macrófagos mediante estímulo con GM-CSF y expresan receptores de membrana (CD14, TLR4, MHC II, CD1a, CD86) en su superficie

Para corroborar si los monocitos ovinos se diferenciaban a macrófagos, después de aplicado el tratamiento con GM-CSF, se procedió al análisis de la expresión de los diferentes receptores de membrana y cómo es que estos niveles cambiaron según el estadio de las células; se analizaron los valores al día 0 y al día 5 posteriores a la adición del GM-CSF. En la **Tabla 6**, se presentan los valores en porcentaje de la positividad de las células a los diferentes receptores de membrana expresados en ellas. En esta tabla, se puede observar que al día 0, en donde las células aún no tienen estímulo, son prácticamente negativas a todos los receptores excepto a CD14, debido a que se hizo la selección para este Cluster de diferenciación, por otra parte son ligeramente positivos (14%) para el MHC II, esto es normal ya que se sabe que los monocitos pueden ser MHC II^{low}. Los valores se observan aumentados al día 5 después de la aplicación del factor de crecimiento (GM-CSF) para los receptores TLR4 y MHC II, mientras que se observa un ligero aumento para los receptores CD86 y CD1a, en este punto las células han completado su diferenciación y el porcentaje de positividad para los receptores cambia en casi todos los casos, exceptuando al CD14 que permanece prácticamente igual.

Receptor/ Día	Día 0	Día 5
CD14	91	98.6
TLR4	0.65	98.35
MHCII	14.9	95.5
CD86	0.6	12.65
CD1a	0.6	3.85

Tabla 6: Los niveles de expresión de receptores de membrana aumentan del día 0 al día 5 post-estímulo con GM-CSF. En la tabla se muestra el valor en porcentaje (%) de la expresión de los diferentes receptores de membrana (CD14, TLR4, MHC II, CD86, CD1a) en las células, al inicio del experimento y al día 5 después de la aplicación continua de GM-CSF. El valor mostrado es el promedio de 3 experimentos independientes.

Estos valores fueron tomados de los histogramas y las gráficas obtenidas de los análisis hechos a varios experimentos. En la **Fig. 6** para el día 0 y en la **Fig. 7** para el día 5, se reporta un experimento representativo de los niveles de expresión de los receptores en las células a tratar.

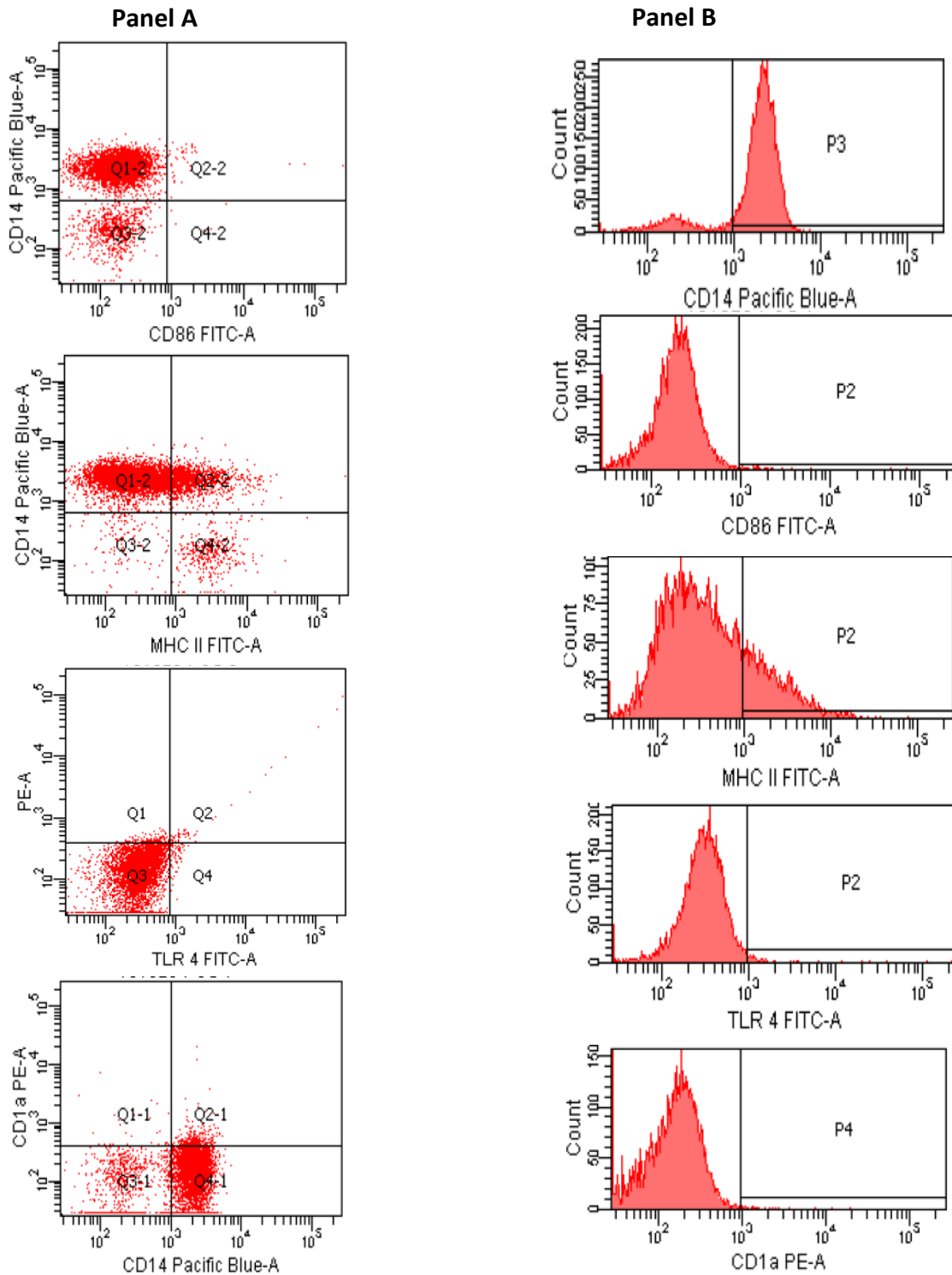


Figura 6: Los monocitos ovinos son CD14⁺ y negativos a los demás receptores de membrana. En la figura se muestran las gráficas en el **Panel A** para los receptores en el siguiente orden: CD14, CD86, MHC II, TLR4, CD1a. En el **Panel B** se observan los histogramas para los valores de positividad de los diferentes receptores de membrana, en el mismo orden que las gráficas, expresados en los monocitos que corresponden a las células del día 0. La población es solamente positiva a CD14 y MHC II en diferentes niveles.

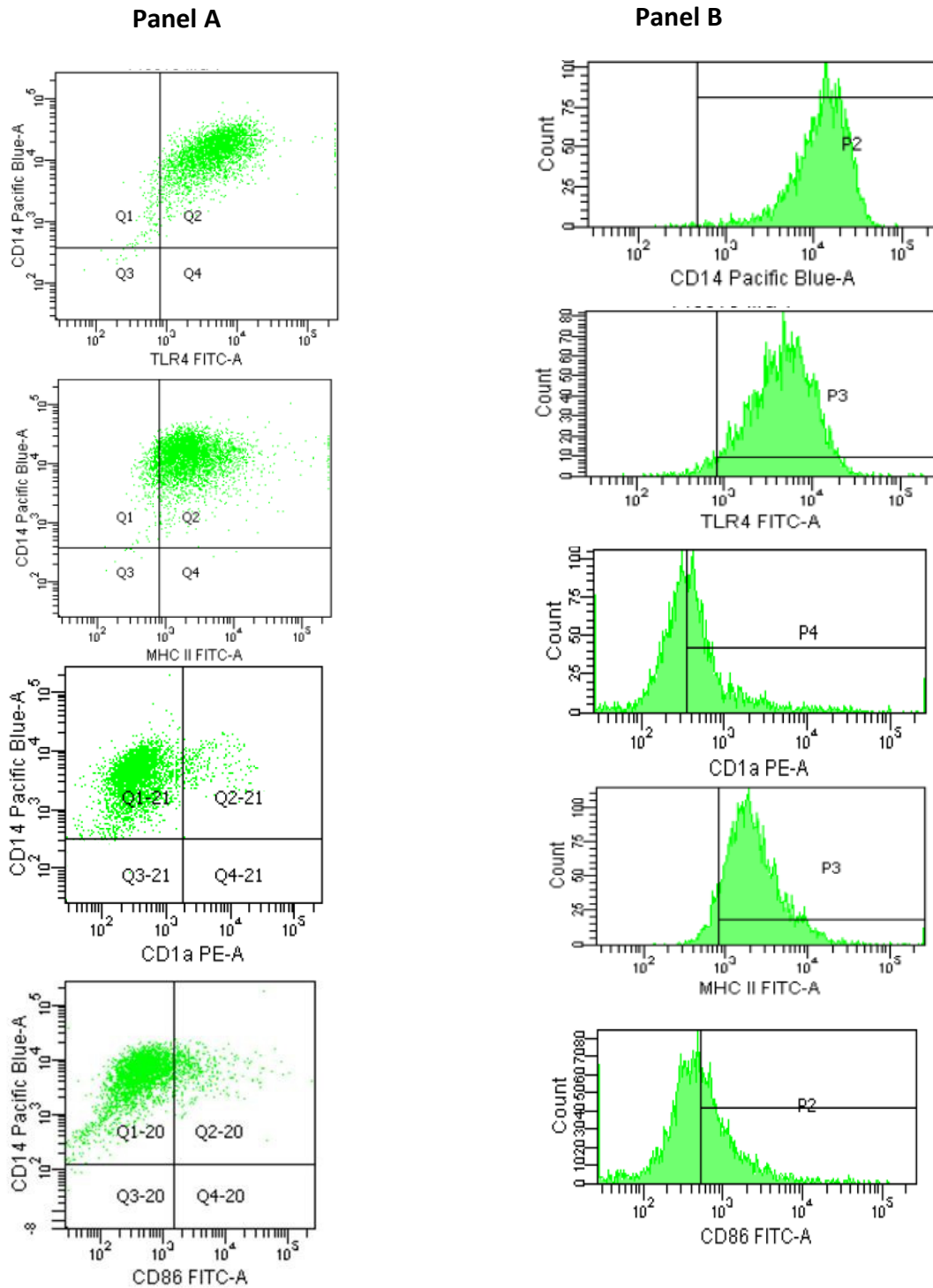


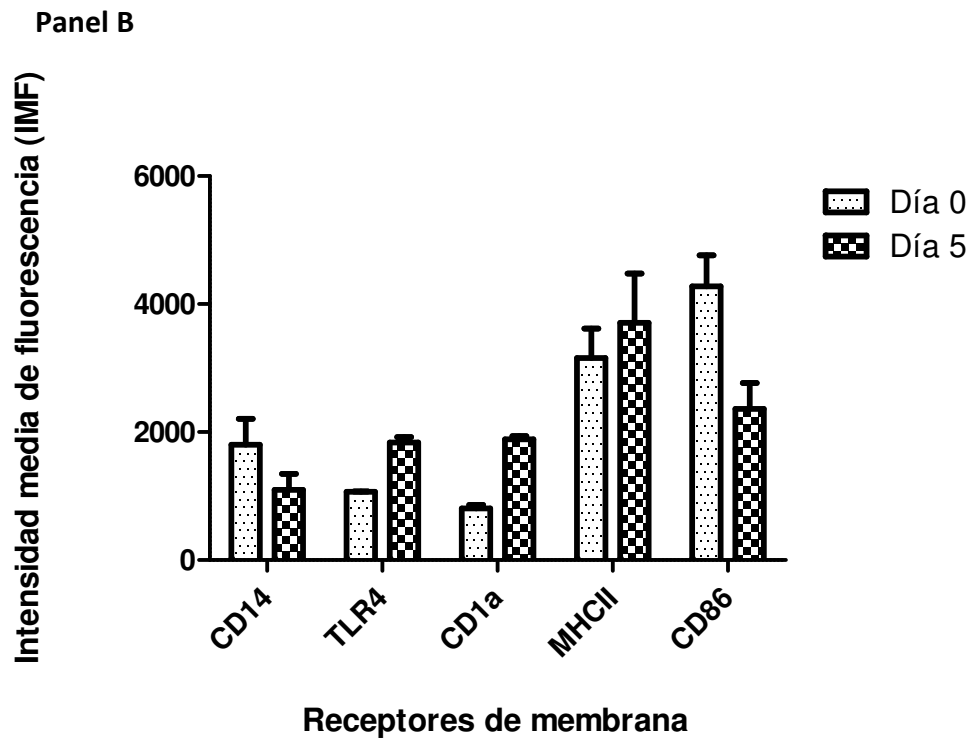
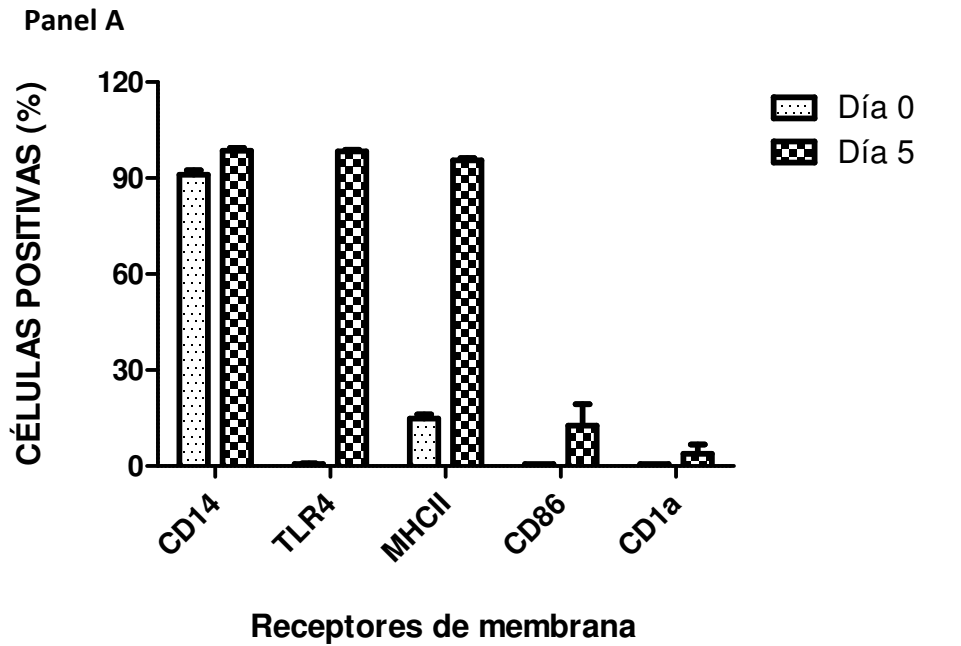
Figura 7: Los monocitos ovinos se diferencian a macrófagos ante la presencia de GM-CSF. En la figura se muestran las gráficas en el **Panel A** para los receptores: CD14, TLR4, MHC II, CD1a y CD86. Mientras que en el **Panel B** se observan los histogramas con los valores de la misma población celular. Estas fueron tratadas con el factor de crecimiento (GM-CSF) durante 5 días, al finalizar el tiempo de incubación se observa un alto porcentaje de células positivas a estos receptores comprobando la identidad característica de los macrófagos.

Por último, en la caracterización celular se midió la intensidad media de fluorescencia correspondiente al número de moléculas presentes del receptor evaluado. Estos datos se presentan en la **Tabla 7**, donde se puede observar que los valores de expresión aumentan ligeramente en los casos del TLR4, MHC II y CD1a, mientras que disminuyen de la misma manera para CD14 y CD86, comparando el día 0 donde las células aún son monocitos con el día 5 post-estímulo (GM-CSF), donde ahora estas células tienen funciones de células presentadoras de antígenos (APC), debido a que ya cuentan con los receptores de membrana como MHC II y CD86, esta última es una molécula coestimuladora con una importante función en la presentación de antígeno. A su vez, también presentan TLR4, que es parte del complejo para realizar el reconocimiento del LPS.

Receptor/Día	Día 0	Día 5
CD14	1801	1097
TLR 4	1068	1838.5
MHC II	3157	3707
CD86	4277	2362.6
CD1a	807	1885

Tabla 7: El número de moléculas presentes de los receptores de membrana en monocitos ovinos aumenta ligeramente al diferenciarse a macrófagos. En la tabla se muestran los valores de intensidad media de fluorescencia del día 0 y del día 5 después del tratamiento con GM-CSF. Estos aumentan ligeramente en el día 5 en el que las células ya se pueden considerar como macrófagos. El valor mostrado es el promedio de tres experimentos independientes.

Así mismo, estos datos se ven reflejados en la **Gráfica 1**. En el **panel A** se muestran los datos de positividad de los receptores de membrana del día 0 comparado con el día 5 y en el **panel B** se muestran los datos de intensidad media de fluorescencia, igualmente entre el día 0 y el día 5. Es evidente observar el cambio en la positividad de las células a los receptores, mientras que para el caso de la IMF se observa únicamente un ligero aumento en algunos de los receptores.

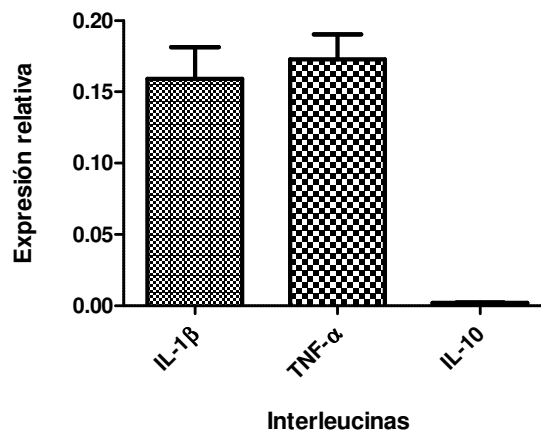


Grafica 1: El porcentaje de células positivas y la IMF de los receptores de membrana en monocitos ovinos aumentan al diferenciarse a macrófagos. Panel A: Porcentaje de positividad. **Panel B:** Intensidad media de fluorescencia. Se muestra cómo se aumentan los valores de células positivas a los receptores, además de cómo incrementan ligeramente en algunos de los casos para la intensidad media de fluorescencia del día 0 (monocitos) al día 5 (macrófagos).

VII.5. Los macrófagos aumentan la transcripción de genes de citocinas de IL-1 β y TNF- α pero no de IL-10, a diferentes tiempos

Finalmente, para observar si las MVs de *M. haemolytica* A2 eran capaces de estimular a los macrófagos, fue necesario poner en contacto a las células con las MVs, siguiendo el protocolo de tratamientos que anteriormente se definió. Es importante recordar que como control negativo (Ctl -) se utilizaron células sin ningún tratamiento; como control positivo (Ctl +) se colocaron 2 μ g de LPS; como tratamientos problemas se utilizaron 5 y 10 μ g de MVs de *M. haemolytica* A2; como inhibidor de nuestro tratamiento problema se colocaron 10 μ g de MVs con PB y finalmente para ver la efectividad del inhibidor se utilizó un último grupo control en el que se colocaron 2 μ g de LPS con PB. El resultado de estos tratamientos se observó a diferentes tiempos que quedaron definidos como: Tiempo 0 (0 hrs de tratamiento), Tiempo 1 (1 hr de tratamiento) y Tiempo 3 (3 hrs de tratamiento). Para este paso se realizó qRT-PCR y se analizaron los resultados mediante la técnica $\Delta\Delta$ Ct normalizados con el gen de referencia GAPDH, los resultados que se muestran a partir de ahora son el promedio del triplicado de tres experimentos independientes.

Para el tiempo 0 los niveles de expresión se encuentran muy cercanos al cero para las interleucinas IL-1 β y TNF- α , lo cual indica que la transcripción de los genes se encuentra silenciada hasta ese momento, esto es normal debido a que las células se encuentran sin estímulo. En cuanto a los niveles de la IL-10, estos se encuentran muy por debajo de las otras dos citocinas que se midieron, lo cual indica un nivel de expresión basal muy bajo para este gen. En la **Gráfica 2** se muestran los niveles de expresión de las interleucinas.

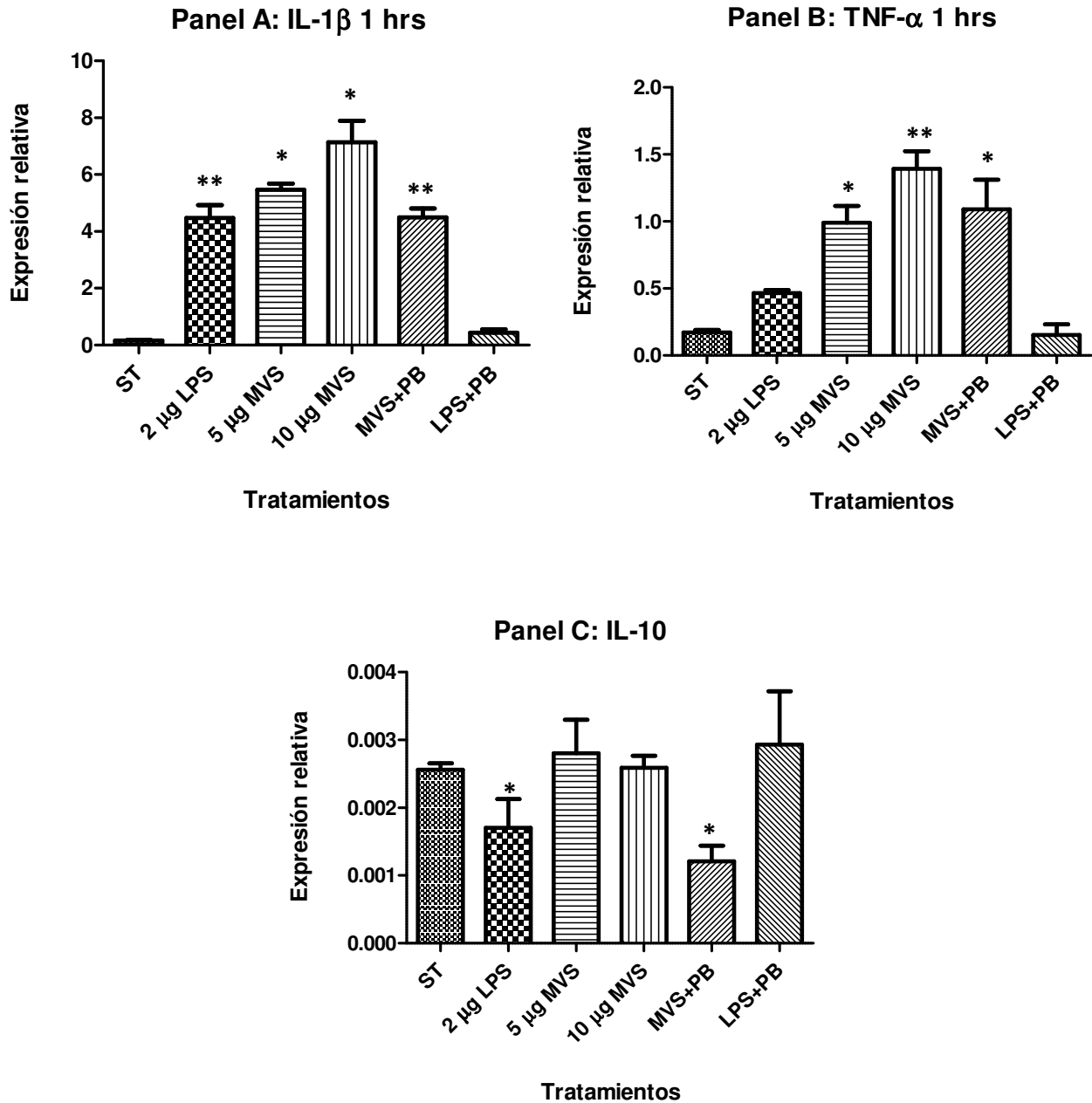


Gráfica 2: La transcripción de las interleucinas al tiempo 0 se encuentra silenciada. En la Gráfica se muestran los valores para las interleucinas IL-1 β , TNF- α e IL-10. Los valores son muy cercanos a 0 en este tiempo debido a que se encuentran sin estímulo.

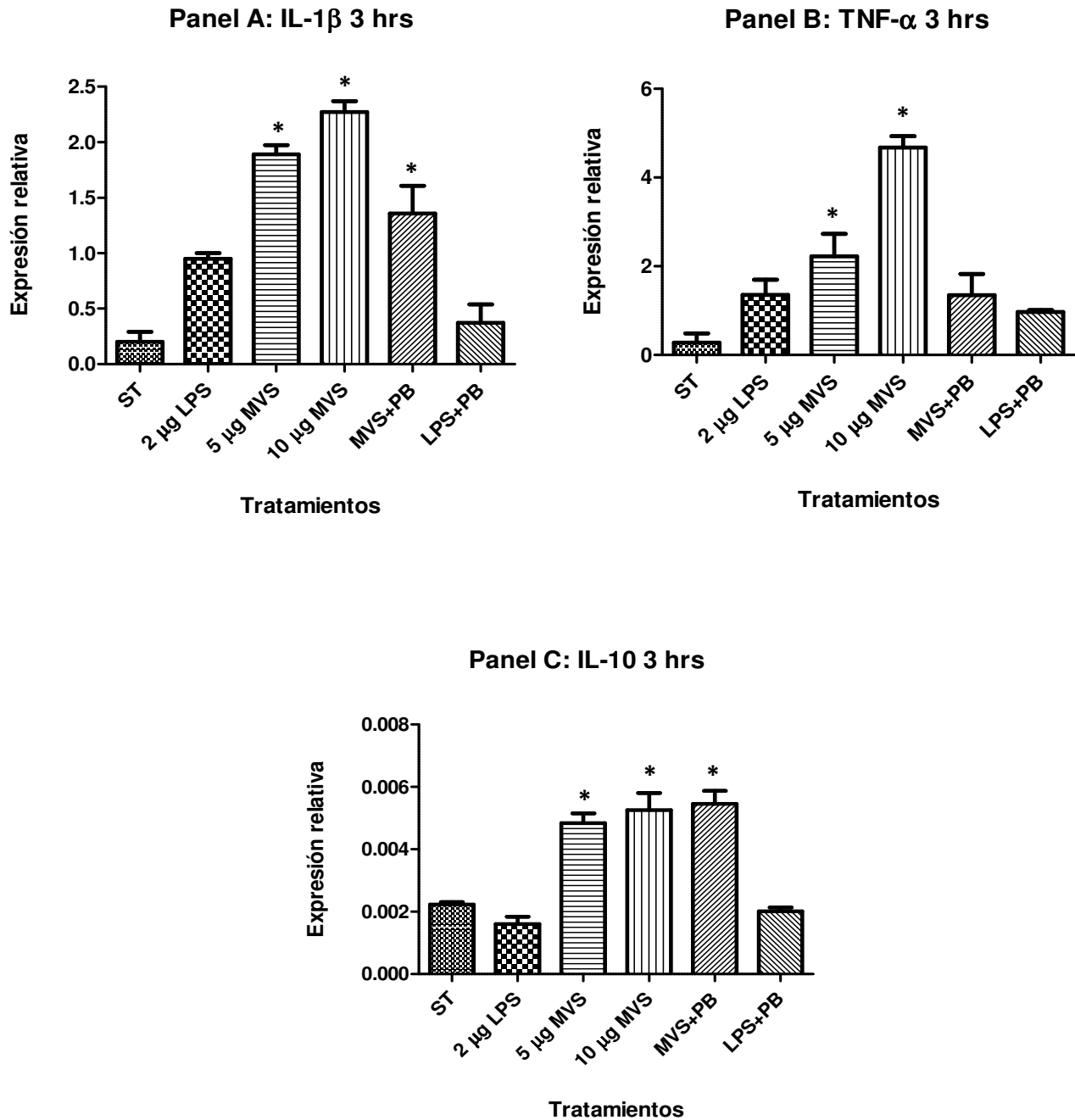
Posteriormente a esta medición, se realizaron las siguientes cuantificaciones para observar el comportamiento de las interleucinas a lo largo del tiempo y con los diferentes tratamientos. En la **Gráfica 3** se observa el comportamiento de estas interleucinas al tiempo 1, la gráfica está dividida en tres paneles (**A-C**) en los que se muestra el comportamiento de las diferentes interleucinas. En el **panel A** se observa la gráfica de la IL-1 β , en la cual la expresión aumentó para los tratamientos de 5 y 10 μ g de MVs, dándose mayor respuesta en este último, mientras que para el tratamiento de 10 μ g de MVs y al que además se le añadió el inhibidor de LPS (Polimixina B), la respuesta se ve disminuida sin llegar a abatirla por completo. Los controles de tratamientos, es decir, sin tratamiento (control -) y con LPS (control +), así como del inhibidor (LPS con Polimixina B) funcionaron adecuadamente, mostrando valores disminuidos para el inhibidor del LPS y aumento en el control positivo con LPS puro, por lo cual se obviarán su explicación en gráficas posteriores. En el **panel B** se muestran los valores de expresión para TNF- α , al igual que para IL-1 β . Los valores para 5 y 10 μ g de MVs aumentaron significativamente y en mayor proporción para 10 μ g, mientras que el efecto se ve disminuido al adicionar Polimixina B. Estos resultados indican que las MVs de *M. haemolytica* A2 estimulan la transcripción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos después de 1 hr de tratamiento. Para el **panel C** se muestran los valores para IL-10, en esta gráfica podemos observar que, al igual que en el tiempo 0, los niveles para esta citocina son muy bajos. En ninguno de los grupos se muestra una diferencia significativa comparada con el control sin tratamiento, incluso se puede decir que los niveles de expresión de esta citocina están muy por debajo de lo esperado, por lo que se puede concluir que bajo estas condiciones, en este tipo celular, las MVs de *Mannheimia haemolytica* A2 no modifican la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 después de 1 hr de tratamiento.

Finalmente, se cuantificó la expresión de citocinas a las 3 hrs con el protocolo definido anteriormente. En la **Gráfica 4** se muestran los valores para las diferentes interleucinas, en el **panel A** se pueden observar los niveles de IL-1 β aumentados para los tratamientos de 5 y 10 μ g de MVs de *M. haemolytica*, siguiendo con el patrón de resultados que se observó al tiempo 1; igualmente es más evidente para el grupo con mayor concentración, este efecto también se ve disminuido al adicionarle a las MVs el inhibidor de LPS. Cabe mencionar que, comparados con los niveles de expresión mostrados al tiempo 1, los valores del tiempo 3 se encuentran disminuidos en todos los grupos para esta interleucina, por lo que se concluye que el mayor efecto para este gen se observa una hora después del tratamiento con MVs. En el **panel B** se muestra la gráfica para el TNF- α , esta interleucina, al igual que la IL-1 β , ve aumentada su expresión en los tratamientos con las vesículas de la bacteria, y disminuido de igual manera en el

tratamiento con Polimixina B, pero a diferencia de la IL-1 β , este aumento es más significativo, comparándolo con el que se observaba después de 1 hr de tratamiento.



Gráfica 3: La presencia de MVs de *M. haemolytica* A2 aumenta la transcripción de citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α a 1 hr post-tratamiento. En la gráfica se muestran los valores de expresión relativa para las tres interleucinas probadas, después de 1 hr de tratamiento con MVs de *M. haemolytica* A2 a dos concentraciones (5 y 10 μ g), así como sus diferentes controles. **Panel A:** IL-1 β , **Panel B:** TNF- α , **Panel C:** IL-10. ST: Sin tratamiento. LPS: Lipopolisacárido. PB: Polimixina B.



Gráfica 4: La presencia de MVs de *M. haemolytica* A2 aumenta la transcripción de citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , así como de la citocina antiinflamatoria IL-10 después de 3 hrs post-tratamiento. En la gráfica se muestran los valores de expresión relativa normalizada para las tres interleucinas, después de 3 hrs de tratamiento con diferentes concentraciones de MVs de *M. haemolytica* A2, así como sus grupos controles. **Panel A:** IL-1 β , **Panel B:** TNF- α , **Panel C:** IL-10. ST: Sin tratamiento. LPS: Lipopolisacárido. PB: Polimixina B.

En el **panel C** se grafican los valores para IL-10. Para este tiempo, debido a los valores tan bajos de expresión relativa del gen, no se observa cambio en ninguno de los casos. Por lo cual, se concluye que la expresión de la IL-10 no se ve afectada por el tratamiento con MVs de *M. haemolytica* A2.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las bacterias Gram-negativas patógenas y no patógenas tienen la capacidad de secretar estructuras esféricas que contienen en su interior diversos factores de virulencia que la bacteria libera para ayudarle entre otras cosas, a la colonización en el hospedador y a la destrucción de su célula blanco. A estas estructuras liberadas a partir de la membrana externa de la bacteria, que se encuentran en constante formación en cualquier fase de crecimiento de la bacteria, se les conoce como MVs o también son denominadas Vesículas de Membrana Externa (VMEs). A lo largo del tiempo se han estudiado y caracterizado varios factores de virulencia asociados a estas estructuras en muchos géneros bacterianos, que causan enfermedades en medicina humana y han sido menos investigadas pero no menos importantes, en medicina veterinaria. Entre otros géneros se encuentran incluidos: *Escherichia coli*^{88, 89}, *Shigella* spp.^{36, 90}, *Neisseria* spp.^{91, 92}, *Bacteroides* (incluida *Porphyromonas*) spp.^{93, 94}, *Pseudomonas aeruginosa*³⁷, *Helicobacter pylori*⁹⁵, *Vibrio* spp.^{96, 97}, *Salmonella* spp.^{98, 99}, *Brucella melitensis*¹⁰⁰, *Campylobacter jejuni*¹⁰¹, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*¹⁰² y *Borrelia burgdorferi*¹⁰³. Estudios en estas vesículas de membrana externa apoyan una función en común: Las MVs son un medio por el cual las bacterias interactúan con células procariontas y eucariotas en su entorno. Las MVs producidas naturalmente por bacterias patógenas pueden contener adhesinas, toxinas y compuestos inmunomoduladores, que median directamente la unión bacteriana y la invasión provocando citotoxicidad, a la vez de que modulan la respuesta inmune del hospedero, participando en diversos aspectos de la interacción hospedero-patógeno. Por todos estos componentes, las MVs bacterianas son consideradas un potente sistema de inmunomodulación.

Recientemente, se describieron varios factores de virulencia asociados a las MVs de *Mannheimia haemolytica* A2⁵³, entre los cuales se encuentran la LKT, el LPS y algunas proteínas de membrana externa de interés inmunogénico de pesos moleculares de 60, 54 y 45 kDa, además de un fragmento de DNA de 23 kpb. Estos factores son muy importantes en la patogenia de la enfermedad en ovinos que son infectados por cepas patógenas de la bacteria. Sin embargo las MVs pueden proveer de una ruta alterna de secreción

de su contenido, que no necesariamente es mortal para las células del hospedero. Se sabe que muchos de los factores de virulencia asociados a estas estructuras son PAMPs que pueden ser reconocidos por receptores que se encuentran anclados a la membrana de la célula del hospedero, entre los cuales se encuentran los TLRs. Estos son importantes receptores que desencadenan diversas cascadas de señalización y que pueden converger en la activación del factor de transcripción NF- κ B, que tiene como una de sus finalidades la activación de la expresión genes para la producción de citocinas proinflamatorias. Uno de los PAMPs más estudiados es el LPS, que se une al TLR4 y que como ya se mencionó, desencadena, entre muchas otras cosas, la producción de citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 por macrófagos.¹⁰⁴

Debido a estos antecedentes, en el presente trabajo se investigó el papel que juega el LPS anclado a MVS de *M. haemolytica* A2, en la interacción con TLR4 expresado en macrófagos ovinos, considerando que estas estructuras pueden activar al TLR4 de la misma manera que lo hace el LPS liberado de manera natural al medio extracelular por la bacteria completa. La estimulación por MVs llevaría al macrófago a la producción de citocinas pro-inflamatorias, que desencadenan una respuesta que sirva como ligando entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Dicha característica le confiere a las MVs importantes propiedades, para poder ser utilizadas como agentes vacunales acelulares en la prevención contra la Mannheimiosis Neumónica en México en un futuro.

Reportes previos (Beverige, 1999)³⁶ indican que las MVs son estructuras esféricas de tamaños variables que van de los 50 a los 250 nm de diámetro, tal y como se muestra en la **Fig. 2**, donde se observa el tamaño y forma característica de doble membrana o capa de fosfolípidos de las MVs, forma que le es conferida por su origen de formación a partir de la membrana externa de las bacterias completas. González en el 2007⁵³, demostró previamente la presencia de LPS en las MVs de *M. haemolytica* A2, hecho que concuerda con lo que se muestra en la **Fig. 3**, donde se evidencia que el LPS es un elemento constitutivo de estas vesículas.

A lo largo del tiempo y debido a que los macrófagos son células muy importantes en el estudio de diversos efectos *in vitro*, se ha demostrado que los monocitos humanos pueden ser diferenciados a macrófagos mediante estímulos con factores de crecimiento como GM-CSF^{105, 106, 107}. En este estudio se demuestra que, los monocitos ovinos pueden ser diferenciados a macrófagos mediante la separación con perlas magnéticas utilizando el sistema MiniMacs human CD14, debido a la reacción cruzada que existe entre especies para este receptor. Como se muestra en la **Fig. 5**, se obtuvo un porcentaje de purificación

mínimo del 90% en todos nuestros experimentos. Una vez obtenidas las células, éstas se sometieron a estímulo con GM-CSF por 5 días en condiciones *in vitro*, como se muestra en la **Fig. 6 y 7** y en la **Gráfica 1**, donde se observó la expresión de los receptores característicos de macrófagos, los cuales se hacen presentes en las células después de 5 días de incubación con GM-CSF. Cabe mencionar que debido al poco acceso que se tiene en México a reactivos específicos para células ovinas, el GM-CSF que se utilizó para estos experimentos es de origen humano, por lo que este es el primer reporte en el que se logran diferenciar células ovinas utilizando reactivos de uso humano. Dicho hallazgo es de suma importancia para futuras investigaciones con células ovinas en nuestro país.

Basados en reportes previos, que han demostrado que las MVs de algunos géneros bacterianos pueden ser potentes estimuladores de secreción de citocinas proinflamatorias y activación de células de la respuesta inmune, en este estudio se investigó la posibilidad de que el LPS de las MVs de *M. haemolytica* A2 pueda estimular al receptor TLR4 de los macrófagos ovinos. Demostrando así, que las MVs de *M. haemolytica* A2, son capaces de estimular la producción de IL-1 β en macrófagos, observándose su mayor efecto después de 1 hr de tratamiento y a una concentración de 10 μ g de proteína total (**Gráfica 3; Panel A**). Estos datos concuerdan con los encontrados por Ellis en 2010¹⁰⁸ quien demostró que la citocina IL-1 β se aumenta en la línea celular RAW-264.7 que corresponden a macrófagos de ratón, después de que son estimulados con MVs de *Pseudomonas aeruginosa* por 3 hrs, aunado a esto el autor confirma que la respuesta dada por MVs es aún mayor que cuando se da tratamiento con LPS puro. Mientras que en el 2013 Zhao¹⁰⁹ demostró que las MVs de la misma bacteria estimulan la producción de esta citocina en las líneas celulares A549 y MLE-12 (Células epiteliales de pulmón humano y ratón respectivamente) con una máxima expresión a las 24 hrs post-tratamiento. Por otra parte Lee y colaboradores demostraron en 2013⁴⁵ que células HEp-2 (células humanas epiteliales de laringe) aumentan la transcripción de IL-1 β al ser tratadas con MVs de *Klebsiella pneumoniae* a diferentes tiempos (0, 1, 5, 20 hrs).

Para la citocina pro-inflamatoria TNF- α se demostró, que las MVs también aumentan la transcripción de su gen pero, al contrario de IL-1 β , esta mostró su máxima expresión a las 3 hrs de tratamiento (**Gráfica 4; Panel B**); estos datos concuerdan con los de Alaniz en el 2007¹¹⁰ que evidencia que MVs de *Salmonella typhimurium* aumentan la expresión de TNF- α en la línea celular J774 (Macrófagos murinos) después de 4 hrs de tratamiento. Al igual que con los de Ellis en 2010¹⁰⁸ que demuestran el mismo efecto para esta citocina proinflamatoria en macrófagos de ratón a las 3 hrs de tratamiento con MVs de *Pseudomonas aeruginosa*. Todos estos datos confirman la respuesta proinflamatoria contra MVs que

también se ha observado para otros patógenos Gram-negativos. Hasta ahora, nuestros datos sugieren que el LPS contenido en las MVs de *M. haemolytica* A2 puede ser un potente estimulador de producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos y este efecto es dependiente del tiempo de incubación y la concentración de MVs.

Por otra parte, se analizó la respuesta de una citocina antiinflamatoria como la IL-10, para observar si existía un efecto compensador de la respuesta proinflamatoria ocasionada por las MVs, ya que se sabe que la IL-10 es un potente inhibidor de producción de IL-1 β , TNF- α e IL-6, entre otras citocinas, además de que inhibe la expresión de antígenos de MHC clase II.¹¹¹ Sin embargo, los resultados demuestran que la expresión de IL-10 no se ve afectada por las MVs en macrófagos en ninguno de los casos. Con este resultado, sugerimos que las MVs de *M. haemolytica* A2, no modifican de manera efectiva la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 a estos tiempos de incubación, aunque no se descarta que a tiempos más prolongados se pueda observar algún cambio en la expresión de la misma. El efecto compensatorio de esta citocina efectora, regularía el aumento en la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias y modularía la respuesta contra las vesículas de membrana.

Después de observar que las MVs de *M. haemolytica* A2, pueden aumentar la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α), se averiguó si este efecto era exclusivamente provocado por el LPS, ya que se sabe que las MVs contienen una gran variedad de PAMPs que pudieran estar estimulando a diferentes receptores de las células.⁵³ Por lo cual se utilizó un inhibidor específico para Lípido A, componente estructural del LPS, que actuaría por competencia por el sitio de unión a TLR4, interfiriendo con la cascada de señalización y abatiendo la respuesta provocada por las MVs. Este inhibidor específico fue la Polimixina B (PB), que se utilizó a dosis de 0.4 mg/ml, valor que fue estandarizado en experimentos previos no mostrados. Como control del efecto inhibidor de la Polimixina B, se agregó un último grupo que fue tratado con LPS con PB a la misma dosis.

Los resultados de este experimento, demuestran que al agregar la misma cantidad de MVs (10 μ g de proteína total) más el inhibidor, el efecto de aumento en la producción de citocinas proinflamatorias se ve disminuido en todos los casos, aunque nunca abatido por completo. Estos resultados también concuerdan con los de Ellis en 2010¹⁰⁸ donde igualmente se demuestra que al utilizar a la Polimixina B como inhibidor para la vía del TLR4-LPS se disminuye la respuesta proinflamatoria contra MVs de *Pseudomonas aeruginosa*. En resumen, estos resultados evidencian que el LPS anclado en la membrana de

las MVs, está siendo específicamente detectado vía TLR4, desencadenando efectos biológicos río abajo que se muestran como un incremento en la transcripción de citocinas pro-inflamatorias que pudieran fungir como quimiocinas, frente a otras células en condiciones *in vivo*, modulando así la respuesta inmune innata contra estas estructuras. Sin embargo, es importante mencionar que debido a que en ninguno de los casos en los que se utilizó el inhibidor el efecto fue 100% abatido, se sugiere que puedan existir otros mecanismos de activación de este fenómeno. Recordemos, que las MVs contienen otros antígenos los cuales que pudieran estar actuando como PAMPS para otros TLRs presentes en los macrófagos o diferentes receptores no determinados en este estudio.

González y col. en el 2010⁵², utilizaron las MVs de *M. haemolytica* A2 como un agente vacunal para inmunizar ovinos y posteriormente desafiarlos con la cepa patógena de la bacteria. En ese trabajo, se observaron altos títulos de inmunoglobulinas IgG en sangre e IgA en mucosas, cuando los animales fueron inmunizados vía intranasal 15 días antes del desafío, conjuntamente los ovinos fueron capaces de combatir la infección sin presentar lesiones pulmonares. Además, existen actualmente vacunas elaboradas a partir de MVs de *Neisseria meningitidis* Serogrupo B (MenB), que han mostrado una alta efectividad en la vacunación de personas adultas y jóvenes, en donde la cepa utilizada en la vacuna fue la misma que la cepa circulante.⁵⁸ Por otra parte, en un estudio realizado en ratones knockout-TLR4 expuestos a un alérgeno, estos presentaron reducción de la respuesta inflamatoria en vías aéreas, acompañado por una disminución en la respuesta Th2.¹¹² Por lo tanto, el TLR4 es requerido para la inducción de una óptima respuesta a un antígeno o fuentes no patógenas, sugiriendo un importante papel de los ligandos de TLRs, tales como el LPS derivado de bacterias comensales o ligandos endógenos, asociados a la maduración del sistema inmune innato antes de la exposición a un patógeno. Estas investigaciones demuestran que, los TLRs son cruciales, no sólo en fase temprana de la infección cuando la respuesta innata es importante, sino en la interacción con la respuesta adaptativa a lo largo del curso entero de la respuesta de defensa del hospedero.

Por estos antecedentes y tomando como base la importancia de los TLRs en la respuesta inmune innata, que invariablemente están ligados a la respuesta inmune adaptativa por múltiples factores como citocinas efectoras, quimiocinas y células presentadoras de antígenos como los macrófagos, encargados de activar linfocitos B a través del MHC II, desencadenando así, una amplia respuesta que converge en la producción de anticuerpos que combaten la infección por el patógeno por el cual fue activada la respuesta, las MVs de *M. haemolytica* A2 son una futura opción para ser utilizadas como agentes vacunales acelulares en la lucha para la prevención y control de la enfermedad en las producciones ovinas en México. Aunado al

hecho, de que hasta el momento el mercado de vacunas comerciales elaboradas específicamente para ganado ovino es limitado, utilizándose en la mayoría de los casos, inmunógenos dirigidos a bovinos, los cuales el veterinario adecúa para la profilaxis en su unidad de producción ovina.

IX. CONCLUSIONES

- Se estandarizó una técnica de diferenciación *in vitro* de macrófagos ovinos a partir de monocitos sanguíneos mediante el sistema MiniMacs human CD14.
- El LPS anclado a las MVs de *M. haemolytica* A2, es un potente estimulador de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) en macrófagos ovinos.
- La respuesta de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) en macrófagos, es dependiente del tiempo y de la dosis de MVs de *Mannheimia haemolytica* A2 utilizada en el tratamiento de éstos.
- Se confirmó que el aumento en la transcripción de genes para citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) en macrófagos esta mediada específicamente por la vía de señalización LPS/MVs-TLR4.
- Las MVs de *M. haemolytica* A2 no modifican la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 en ninguno de las concentraciones y tiempos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Trigo, F. J. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Cien Vet* (1987).
2. Martin, S. W., Meek, A. H., Davis, D. G., Johnson, J. A., Curtis, R. A. Factors associated with mortality and treatment costs in feedlot calves: the Bruce County Beef Project, years 1978, 1979, 1980. *Can. J. Comp. Med.* **46**, 341–9 (1982).
3. Pijoan A. P., C. D. Cost of pneumonia in dairy calves lodged under two housing systems. *Vet. Méx* **34**, 333–342 (2003).
4. Griffin, D. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **13**, 367–77 (1997).
5. Zecchinon, L., Fett, T. Desmecht, D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet. Res.* **36**, 133–56 (2005).
6. Zamora, A., Burnes, J. Implementación y aplicación de la Técnica de Inmunohistoquímica para la detección del Virus de Parainfluenza Tipo 3 (PI3) en pulmones de ovinos. *Tu revista digiUAT* (2008).
7. Juárez B. F., Trigo T. F. J., Chávez GG, V. G. R. E. Identificación de agentes virales por inmunohistoquímica en enfermedades respiratorias de bovinos en corral de engorda. *Vet. Méx* **34**, 1–12 (2003).
8. Correa G., P., Brown, L. N. Presencia de anticuerpos contra rinotraqueitis infecciosa, diarrea viral bovina, parainfluenza 3, brucelosis, leptospirosis, vibriosis y *Haemophilus somnus* en sueros de bovinos con problemas patológicos reproductores y respiratorios. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* 25–33 (1975).
9. Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W. Mannheim, W. Reclassification of the Genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the Basis of Deoxyribonucleic Acid Homology, with Proposals for the New Species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 309–322 (1985).
10. Newson I.E., Cross, F. Some bipolar organisms found in pneumonia in sheep. *Vet. Med. Assoc* **80**, 711–719 (1932).
11. Smith, G. R. The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions in sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* **81**, 431–440 (1961).
12. Bingham, D. P., Moore, R., Richards, A. B. Comparison of DNA:DNA homology and enzymatic activity between *Pasteurella haemolytica* and related species. *Am. J. Vet. Res.* **51**, 1161–6 (1990).
13. Angen, O., Mutters, R., Caugant, D. A., Olsen, J. E., Bisgaard, M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA

sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 67–86 (1999).

14. Jaramillo A., C. J., Trigo Tavera, F. J., Suárez Güemes, F. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *Vet. México* **40**, 293–314
15. Colín R. F., Jaramillo M. L., Aguilar R. F., Trigo F. J., M. M. M. Serotipos de *Pasteurella haemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos de México. *Rev Lati-Am Microbiol* **29**, (1987).
16. Sleim, R. Review: Major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolated from animal origin. *El Cairo, Egypt Bacteriol. Dep. Anim.*(2005).
17. Squire, P. G., Smiley, D. W., Croskell, R. B. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infect. Immun.* **45**, 667–73 (1984).
18. Puchalski, A., Urban Chmiel, R., Dec, M., Wernicki, A. An electrophoretic characterization of iron-transporting proteins in *Mannheimia haemolytica* A1. *Pol. J. Vet. Sci.* **16**, 527–32 (2013).
19. McClenahan, D. *et al.* Effects of lipopolysaccharide and *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on bovine lung microvascular endothelial cells and alveolar epithelial cells. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 338–47 (2008).
20. Watts, J. L., Yancey, R. J., Salmon, S. A., Case, C. A. A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 725–31 (1994).
21. Kehrenberg, C., Schulze-Tanzil, G., Martel, J. L., Chaslus-Dancla, E., Schwarz, S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet. Res.* **32**, 323–39 (2001)
22. Tauro, P., Kapoor, K. K. ,Yadav, K. S. *An Introduction to Microbiology.* 412 (New Age International, 1986).
23. Kisiela, D. I., Czuprynski, C. J. Identification of *Mannheimia haemolytica* adhesins involved in binding to bovine bronchial epithelial cells. *Infect. Immun.* **77**, 446–55 (2009).
24. Morck, D. W. Electron microscopic description of glycocalyx and fimbriae on the surface of *Pasteurella haemolytica* A1. *Can. J. Vet. Res.* **51**, 83–8 (1987).
25. Kuehn, M. J., Kesty, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* **19**, 2645–55 (2005).
26. Srisatjaluk, R., Kotwal, G. J., Hunt, L. A., Justus, D. E. Modulation of Gamma Interferon-Induced Major Histocompatibility Complex Class II Gene Expression by *Porphyromonas gingivalis* Membrane Vesicles Modulation of Gamma Interferon-Induced Major Histocompatibility Complex Class II Gene Expression by *Porphyromona.* (2002).

27. Kulp, A., Kuehn, M. J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 163–84 (2010).
28. Manning, A. J., Kuehn, M. J. Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 131–41 (2013).
29. Rivera, J. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19002–7 (2010).
30. Gurung, M. *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS One* **6**, 11(2011).
31. González Pedrajo, B. Sistemas de Secreción de Proteínas en las Bacterias Gram Negativas: Biogénesis flagelar y translocación de Factores de virulencia. *Mensaje Bioquim.* **XXVII**, (2003).
32. Koster, M., Bitter, W., Tommassen, J. Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**, 325–31 (2000).
33. Thanassi, D. G., Hultgren, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 420–30 (2000).
34. Lee, V. T., Schneewind, O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev.* **15**, 1725–52 (2001).
35. Kulkarni, H. M., Jagannadham, M. V. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology* **160**, 2109–21 (2014).
36. Beveridge, T. J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725–33 (1999).
37. Kadurugamuwa, J., Beveridge, T. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* **177**, 3998–4008 (1995).
38. Post, D. M. B. Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Biol. Chem.* **280**, 38383–94 (2005).
39. Ferrari, G. Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* delta gna33 mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. *Proteomics* **6**, 1856–66 (2006).
40. Lee, E. Y. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics* **7**, 3143–53 (2007).
41. Galka, F. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect. Immun.* **76**, 1825–36 (2008).

42. Mullaney, E. Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics. Clin. Appl.* **3**, 785–96 (2009).
43. Pierson, T. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J. Proteome Res.* **10**, 954–67 (2011).
44. Choi, D. S. Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* **11**, 3424–9 (2011).
45. Lee, J. C. *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiol. Lett.* **331**, 17–24 (2012).
46. Maredia, R. Vesiculation from *Pseudomonas aeruginosa* under SOS. *ScientificWorldJournal.* **2012**, 402919 (2012).
47. Van de Waterbeemd, B. Quantitative proteomics reveals distinct differences in the protein content of outer membrane vesicle vaccines. *J. Proteome Res.* **12**, 1898–908 (2013).
48. Aguilera, L. Proteomic analysis of outer membrane vesicles from the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917. *Proteomics* **14**, 222–9 (2014).
49. Veith, P. D. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles exclusively contain outer membrane and periplasmic proteins and carry a cargo enriched with virulence factors. *J. Proteome Res.* **13**, 2420–32 (2014).
50. Jang, K. S., Sweredoski, M. J., Graham, R. L. J., Hess, S., Clemons, W. M. Comprehensive proteomic profiling of outer membrane vesicles from *Campylobacter jejuni*. *J. Proteomics* **98**, 90–8 (2014).
51. Altindis, E., Fu, Y., Mekalanos, J. J. Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E1548–56 (2014).
52. Gonzalez R. C., Tenorio G. V., De la Garza A. M. G., T. T. F. Evaluación y caracterización de microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* SEROTIPO A2 para su posible utilización como vacuna en ovinos. *Tesis Doctoral*. FES Cuautitlán. UNAM. (2007).
53. González R. C., Tenorio G. V., Trigo T. F., Reyes L.M., León S. N., Godínez V. D., de la G. A. M. Characterization of Microvesicles of *Mannheimia haemolytica* Serotype A1 (Reference Strain) and Serotype A2 (Field Isolate). *J. Anim. Vet. Adv.* **6**, 1172–1178 (2007).
54. Acevedo, R. Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Front. Immunol.* **5**, 121 (2014).
55. Holst, J. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **27 Suppl 2**, B3–12 (2009).

56. G. V. G, S., Campa, H., Garcia, I. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann.* **14** (1991).
57. Rosenqvist, E. Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. *Infect. Immun.* **63**, 4642–52 (1995).
58. Arnold R., Galloway, Y., McNicholas, A., O’Hallahan, J. Effectiveness of a vaccination programme for an epidemic of meningococcal B in New Zealand. *Vaccine* **29**, 7100–6 (2011).
59. Bai, X., Findlow, J., Borrow, R. Recombinant protein meningococcal serogroup B vaccine combined with outer membrane vesicles. *Expert Opin. Biol. Ther.* **11**, 969–85 (2011).
60. Pérez J. L., Callicó A., Fernández S., Reyes G., Cabrerías R., A. Preliminary characterisation of an oral multivalent vaccine candidate against *Cholera-Shigella-Salmonella*. *Vaccinator* **18**, 7 (2009).
61. Carrillo, R. Inmunidad Innata, Receptores Toll y Sepsis. *Vet. Méx* **7**, (2003).
62. Garfias, C., Gualito, J. Role of toll-like receptors in innate immunity and their implication in veterinary medicine. *Vet. Méx* **36**, (2005).
63. Fearon, D. T., Locksley, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**, 50–3 (1996).
64. Medzhitov, R., Janeway, C. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* **343**, 338–44 (2000).
65. Medzhitov, R., Janeway, C. A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 4–9 (1997).
66. Medzhitov, R., Janeway, C. a. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295–8 (1997).
67. Werling, D., Jungi, T. W. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **91**, 1–12 (2003).
68. Hashimoto, C., Hudson, K. L., Anderson, K. V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269–79 (1988).
69. Gay, N. J. , Keith, F. J. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**, 355–6 (1991).
70. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973–83 (1996).
71. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C. A. . A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **388**, 394–397 (1997).

72. Zhang, D. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**, 1522–6 (2004).
73. Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335–76 (2003).
74. Teixeira, M. M., Almeida, I. C., Gazzinelli, R. T. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect.* **4**, 883–6 (2002).
75. Blasius, A. L., Beutler, B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* **32**, 305–15 (2010).
76. Kawai, T., Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637–50 (2011).
77. Hajjar, A. M. Cutting Edge: Functional Interactions Between Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in Response to Phenol-Soluble Modulin. *J. Immunol.* **166**, 15–19 (2001).
78. Heine, H., Lien, E. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **130**, 180–92 (2003).
79. Underhill, D. M., Ozinsky, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 103–10 (2002).
80. Werling, D., Hope, J. C., Howard, C. J., Jungi, T. W. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology* **111**, 41–52 (2004).
81. Shoda, L. K. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infect. Immun.* **69**, 2162–71 (2001).
82. Kunkel, S. L., Lukacs, N., Strieter, R. M. Chemokines and their role in human disease. *Agents Actions. Suppl.* **46**, 11–22 (1995).
83. Kadurugamuwa, J. L., Beveridge, T. J. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J. Bacteriol.* **178**, 2767–74 (1996).
84. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–54 (1976).
85. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
86. Budhia, S., Haring, L. F., McConnell, I., Blacklaws, B. A. Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *J. Immunol. Methods* **309**, 160–72 (2006).

87. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–8 (2001).
88. Hoekstra, D., van der Laan, J. W., de Leij, L., Witholt, B. Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 889–99 (1976).
89. Gankema, H., Wensink, J., Guinée, P. A., Jansen, W. H., Witholt, B. Some characteristics of the outer membrane material released by growing enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **29**, 704–13 (1980).
90. Dutta, S. Release of Shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* serotype 1 strains and in vitro effects of antimicrobials on toxin production and release. *Microbiol. Immunol.* **48**, 965–9 (2004).
91. Devoe, I. W., Gilchrist, J. E. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. *J. Exp. Med.* **138**, 1156–67 (1973).
92. Dorward, D. W., Garon, C. F., Judd, R. C. Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **171**, 2499–505 (1989).
93. Grenier, D., Mayrand, D. Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun.* **55**, 111–7 (1987).
94. Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D. E., Doyle, R. J. On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 223–8 (1998).
95. Fiocca, R. Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J. Pathol.* **188**, 220–6 (1999).
96. Chatterjee, S. N., Das, J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.* **49**, 1–11 (1967).
97. Kondo, K., Takade, A., Amako, K. Release of the outer membrane vesicles from *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.* **37**, 149–52 (1993).
98. Veszy, C. J., Kitchens, R. L., Wolfbauer, G., Albers, J. J., Munford, R. S. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect. Immun.* **68**, 2410–7 (2000).
99. Wai, S. N. Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* **115**, 25–35 (2003).
100. Gamazo, C., Moriyón, I. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect. Immun.* **55**, 609–15 (1987).

101. Logan, S. M., Trust, T. J. Outer membrane characteristics of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **38**, 898–906 (1982).
102. Nowotny, A. Release of toxic microvesicles by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **37**, 151–4 (1982).
103. Shoberg, R. J., Thomas, D. D. Specific adherence of *Borrelia burgdorferi* extracellular vesicles to human endothelial cells in culture. *Infect. Immun.* **61**, 3892–900 (1993).
104. Miyake, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol.* **12**, 186–92 (2004).
105. Akagawa, K. S. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology* **11 Suppl**, S32–6 (2006).
106. Akagawa, K. S. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Int. J. Hematol.* **76**, 27–34 (2002).
107. Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., Lecreur, V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* **281**, 51–61 (2013).
108. Ellis, T. N., Leiman, S. A., Kuehn, M. J. Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. *Infect. Immun.* **78**, 3822–31 (2010).
109. Zhao, K., Deng, X., He, C., Yue, B., Wu, M. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles modulate host immune responses by targeting the Toll-like receptor 4 signaling pathway. *Infect. Immun.* **81**, 4509–18 (2013).
110. Alaniz, R. C., Deatherage, B. L., Lara, J. C., Cookson, B. T. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J. Immunol.* **179**, 7692–701 (2007).
111. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., O’Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 683–765 (2001).
112. Dabbagh, K., Dahl, M. E., Stepick-Biek, P., Lewis, D. B. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J. Immunol.* **168**, 4524–30 (2002).