



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de la influencia de la señalización celular bacteriana entre *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* sobre cambios en el epitelio nasal de cornetes de conejo y sobre la expresión de algunos factores de virulencia

Juan Sebastián López Fernández

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología
Bogotá, Colombia
2012

Evaluación de la influencia de la señalización celular bacteriana entre *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* sobre cambios en el epitelio nasal de cornetes de conejo y sobre la expresión de algunos factores de virulencia

Juan Sebastián López Fernández

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en ciencias-Microbiología

Directora:
Catalina Arévalo Ferro, Dr. Rer.Nat
Codirector:
Carlos Arturo Iregui Castro, DVM

Grupo investigación Comunicación y comunidades bacterianas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología
Bogotá, Colombia
2012

*Never to suffer would never to have been
blessed.
E.A. Poe.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia por permitirme compartir por 7 años un espacio de discusión, análisis crítico frente a todos los aspectos de la realidad Colombiana y por permitirme de la manera más amena, vivir esa realidad.

Al grupo de patobiología veterinaria, en especial a los Doctores Carlos Arturo Iregui, Paola Barato Gomez y Mayra Vargas Pinto por permitirme acercarme a su campo de conocimiento; por sus aportes a este trabajo y por sus enseñanzas en las aulas de clase.

Al grupo de Comunicación y Comunidades bacterianas por ser una maravillosa escuela en la que se construye conocimiento a partir del compromiso, el trabajo arduo y constante y la cooperación. A Angel, Sandra, Alex, Pamela, Andres, Carolina y todos los ex miembros que aportaron algo a este trabajo.

Agradezco también a mis familias: la primera, en la que tuve suerte de nacer. A papá y mamá por ser la columna vertebral de mis decisiones. A mis hermanos por su compañía, comprensión, amistad y cuidado. La segunda, en la que tuve la oportunidad de crecer durante dos años. A la profesora Catalina, a Anny y a Miguel Angel por brindarme su amistad y su incondicional apoyo en todo momento.

Agradezco al posgrado interfacultades en microbiología por promover en mí la autocrítica y la formación rigurosa en ciencias.

Agradezco a “chiqui” por ser una epifanía de amor, que espero dure por siempre...

RESUMEN

Algunos tipos de interacción en bacterias se basan en la señalización química por moléculas que son producidas y reconocidas por las células en una comunidad bacteriana, generando respuestas a nivel fisiológico. Uno de los mecanismos de señalización más ampliamente distribuido entre bacterias es el *Quorum Sensing*, el cual es importante en la regulación de la expresión de genes de virulencia. Dentro de las patologías del tracto superior respiratorio de mamíferos, la rinitis atrófica degenerativa se caracteriza por ser una de las más prevalentes. En ella *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*, dos bacilos Gram negativos; interactúan de una manera compleja. Aún no se tiene pleno conocimiento del papel que desempeña cada una en el curso de la enfermedad pero la evidencia muestra que las dos bacterias en conjunto generan lesiones en el órgano nasal, diferentes a las que se encuentran cuando está cada una por separado. Este trabajo planteó como objetivo encontrar una relación entre la aparición de cambios celulares en el epitelio del septo nasal de conejo y la comunicación celular bacteriana, evaluando el efecto que tiene el sobrenadante de medio de cultivo de *P. multocida* sobre *B. bronchiseptica* (y viceversa) en la expresión de algunos de sus factores de virulencia y en la generación de cambios celulares en explantes de cornete de conejo. A través de recuentos celulares en cornetes cultivados *in vitro* se identificaron cambios causados por el inóculo de *Pasteurella multocida* y/o *Bordetella bronchiseptica* sobre el cornete y se encontraron patrones diferenciales de cambios celulares cuando las bacterias fueron estimuladas con el sobrenadante de su contraparte. También se observó la regulación de la producción de algunos factores de virulencia, cuando las bacterias fueron estimuladas por los sobrenadantes de sus contrapartes y se encontró evidencia de la producción de *N*-acil homoserín lactonas, en cultivos de las dos bacterias. Estos resultados en conjunto sugieren una interacción entre *Pasteurella* y *Bordetella* en la cual la señalización celular, posiblemente mediada por moléculas similares a AHLs, juega un papel fundamental no solo en la adaptación de las bacterias al microambiente de la fosa nasal sino que también puede regular la expresión de algunas moléculas determinantes de virulencia.

Palabras clave: *Quorum Sensing*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, virulencia, explante, rinitis atrófica

ABSTRACT

Some types of interaction in bacteria rely on chemical signaling through molecules that are produced and recognized by cells in a bacterial community, generating physiological responses. One of the widely-spread signaling mechanisms among bacteria is *Quorum Sensing*, which is important for regulation of virulence gene-expression. Among the pathologies of the upper respiratory tract of mammals, degenerative atrophic rhinitis is characterized for being one of the most prevalent. In such disease, *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* interact in a complex fashion and the role of each microorganism during the course of the disease remains to be determined. Previous evidence showed that when together, these two Gram negative bacilli generate dramatic injuries on the epithelium, which are different from those found when the microorganisms are apart. This work's main goal was to find a link between the apparition of cell changes on rabbit's nasal septum epithelium and bacterial cell-to-cell communication by evaluating the effect of *Pasteurella multocida*'s culture supernatant on the expression of virulence factors and on the generation of cell changes in rabbit's turbinate explants by *Bordetella bronchiseptica*, and viceversa. Through cell counts on *in vitro*-cultured turbinates, cell changes caused by treating the explant *P. multocida* and/or *B. bronchiseptica* were found. Differential patterns of cell changes when the strains were stimulated with each other's supernatant were also found. The observation of the production of *N*-acyl homoserine lactones along with the other findings suggests that there is an interplay between *p. multocida* and *B. bronchiseptica* in which cell-to-cell signaling is a fundamental key in bacterial adaptation to the microenvironment and can regulate the expression of some virulence molecules.

Keywords: *Quorum Sensing*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, virulence, explant, atrophic rinitis

CONTENIDO

	Página
Resumen.....	II
Lista de Figuras.....	VII
Lista de Tablas.....	IX
Lista de Símbolos.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. Objetivo general.....	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. MARCO TEORICO.....	8
3.1. Señalización celular bacteriana: <i>Quorum Sensing</i> y el control de la Expresión genética en bacterias.....	8
3.2. Implicaciones del <i>Quorum Sensing</i> en la patogénesis bacteriana.....	12
3.3. <i>Pasteurella multocida</i>	15
3.4. <i>Bordetella bronchiseptica</i>	17
3.5. Factores de virulencia en <i>Pasteurella multocida</i> y <i>Bordetella bronchiseptica</i>	19
3.6. Generalidades del sistema respiratorio en vertebrados, la rinitis atrófica degenerativa y el modelo <i>in vitro</i> de explantes de cornete de conejo.....	23
4. METODOLOGÍA.....	33
4.1. Bacterias y condiciones de cultivo.....	33
4.2. Obtención de explantes de cornetes de Conejo.....	36
4.2.1. Criterios de determinación de cambios celulares en explantes de	

cornete de conejo.....	36
4.2.2. Inóculos bacterianos.....	37
4.2.3. Análisis Histopatológico con Hematoxilina & Eosina.....	39
4.3. Evaluación de Factores de Virulencia.....	41
4.3.1 Ensayos en caja de Petri con líquido incorporado.....	41
4.4. Evaluación de la producción de <i>N</i> -acil homoserín lactonas por medio de biosensores bacterianos.....	44
4.4.1. Extractos de medio de cultivo.....	44
4.4.2 Ensayos en caja.....	45
4.4.3. Cromatografía en capa delgada.....	46
4.5. Identificación de grupos de similaridad.....	47
5. CONSIDERACIONES ETICAS.....	48
6. RESULTADOS.....	49
6.1. Cambios histológicos detectados en los explantes durante los tratamientos <i>in vitro</i> : e influencia de los sobrenadantes en la virulencia de <i>Pasteurella multocida</i> y <i>Bordetella bronchiseptica</i>	49
6.2. Análisis de la producción de factores de virulencia.....	61
6.3. Detección de <i>N</i> -acil homoserín lactonas.....	71
6.4. Influencia de algunas AHLs en la virulencia de <i>P. multocida</i> y <i>B. bronchiseptica</i>	78
7. DISCUSIÓN.....	84
8. CONCLUSIONES.....	99
9. BIBLIOGRAFÍA.....	101
A. ANEXO: CONTEOS CELULARES DE CORNETES DE CONEJO TRATADOS CON <i>P. multocida</i> y/o <i>B. bronchiseptica</i>.....	112

B. ANEXO: ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE CONTEOS CELULARES DE CORNETES DE CONEJO TRATADOS CON <i>P. multocida</i> y/o <i>B. bronchiseptica</i>.....	135
C. ANEXO: ANOVA DE TRATAMIENTOS CON <i>P. multocida</i> y/o <i>B. bronchiseptica</i> en explantes de cornete de conejo <i>in vitro</i>.....	139
D. ANEXO: Cambios morfológicos celulares en explantes de cornete de conejo	153
E. ANEXO: cromatografía en capa delgada de algunos extractos de medio de cultivo de <i>P. multocida</i> y/o <i>B. bronchiseptica</i> obtenidos con dos solventes diferentes....	154
F. ANEXO: Premio mención de honor “mejor trabajo de investigación” en modalidad poster por la Sociedad Uruguaya de Microbiología en el XX congreso latinoamericano de microbiología.....	155
G. ANEXO: Presentación charla en el curso teórico-práctico “Quorum Sensing in-plant associated bacteria” en el Centro internacional de ingeniería genética y biotecnología, en Trieste, Italia.....	156
H. ANEXO: Presentación modalidad poster en la reunión numero 62 de la Sociedad Canadiense de Microbiólogos, en Vancouver, Canadá.....	157

Lista de Figuras

Figura 1: Sistema canónico de *Quorum Sensing* en bacterias Gram negativas

Figura 2: Sistema canónico de *Quorum Sensing* en bacterias Gram positivas

Figura 3: Sistema de *Quorum Sensing* de *Vibrio harveyi*

Figura 4: Generalidades de los cambios inducidos por cada una de las bacterias inculcradas en la rinitis atrófica degenerativa

Figura 5: Principales cambios celulares identificados en el explante de cornete de conejo *in vitro*

Figura 6: Árbol taxonómico para la identificación de aislamientos clínicos de *Pasteurella* y *Bordetella* por secuenciación del gen rDNA 16S.

Figura 7: Esquema de bioensayos en caja de Petri con biosensores bacterianos de AHLs

Figura 8: Esquema de bioensayos en caja de Petri con biosensores bacterianos de AHLs y los extractos de sobrenadante de medio de cultivo de *P. multocida*, *B. bronchiseptica* o un cocultivo

Figura 9: Detección del tipo de cambios celulares asociados a tratamientos con *P. multocida* y/o *B. bronchiseptica* *in vitro*

Figura 10: Porcentajes relativos de cambios celulares observados en explantes de cornete cultivados

Figura 11: Hallazgo de cambios celulares producidos por la inoculación con *P. multocida* y/o *B. bronchiseptica*

Figura 12: Hallazgo de cambios celulares producidos por la inoculación con *P. multocida* y/o *B. bronchiseptica*

Figura 13: Análisis de varianza y agrupamiento de tratamientos asociados a muerte celular en el explante

Figura 14: Actividad proteolítica en cultivos de *B. bronchiseptica* bajo diferentes tratamientos

Figura 15: Actividad proteolítica en cultivos de *P. multocida* bajo diferentes tratamientos

Figura 16: Ensayos de motilidad en *Bordetella bronchiseptica*

Figura 17: Actividad lipolítica en cultivos de *P. multocida* bajo diferentes tratamientos

Figura 18: Actividad lipolítica en cultivos de *B. bronchiseptica* bajo diferentes tratamientos

Figura 19: Hemólisis de eritrocitos heparinizados de oveja por *B. bronchiseptica*

Figura 20: Hemaglutinación y hemólisis de eritrocitos heparinizados de oveja por *P. multocida*

Figura 21: Ensayos en cruz con biosensores de AHLs de cadena corta y mediana

Figura 22: Ensayos con biosensores de AHLs de cadena larga

Figura 23I: Ensayos en caja de Petri con extractos en acetato de etilo, de sobrenadante de medio de cultivo de las bacterias y biosensor de AHLs de cadena larga

Figura 23II: Ensayos en caja de Petri con extractos en Diclorometano, de sobrenadante de medio de cultivo condicionado o superconcentrado y biosensor de AHLs de cadena larga

Figura 24: Ensayos en caja de Petri con 4 veces mas extracto en acetato de etilo, de sobrenadante de medio de cultivo de las bacterias y biosensor de AHLs de cadena larga

Figura 25: Cromatografía en capa delgada acoplada a biosensores bacterianos

Figura 26: Influencia de algunas AHLs sintéticas en la virulencia de *Pasteurella multocida* o *Bordetella bronchiseptica*

Figura 27: Influencia de algunas AHLs sintéticas sobre la producción de proteasas en *Bordetella bronchiseptica*

Figura 28: Influencia de algunas AHLs sintéticas sobre la producción de proteasas en *Pasteurella multocida*

Figura 29. Influencia de algunas AHLs sintéticas sobre la producción de hemolisina en *Bordetella bronchiseptica*

Figura 30. Modelo de interacción entre *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*

Lista de Tablas

Tabla 1: Principales fenotipos identificados con pruebas bioquímicas usadas para la clasificación de *Pasteurella multocida*

Tabla 2: Algunas de las características utilizadas para diferenciar especies del género *Bordetella*

Tabla 3: Tratamientos aplicados a los explantes de cornete cultivados *in vitro*

Tabla 4: Biosensores utilizados en el proyecto y moléculas que detectan

Tabla 5: Histopatología general de explantes de cornete de conejo inoculados con *Pasteurella multocida* y/o *Bordetella bronchiseptica*.

Tabla 6: Cambios morfológicos celulares indicadores de patología en explantes de cornete de conejo

Tabla 7: Producción de halos de hemólisis por *P. multocida* y/o *B. bronchiseptica*

Tabla 8: Resultados de los ensayos con algunos biosensores de *N*- acil homoserín lactonas

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Significado
AC-Hli	Adenilato Ciclasa-Hemolisina
AHL	<i>N</i> -acil homoserín lactona
AI-2	Autoinductor 2
AMP	Adenosin monofosfato
ATP	Adenosin trifosfato
Bvg	genes de virulencia de <i>Bordetella</i> (por sus siglas en inglés)
°C	Grados Celsius
CCD	Cromatografía en capa delgada
CST	Caldo soya tripticasa
C4 AHL	<i>N</i> -butanoil homoserín lactona
C6 AHL	<i>N</i> -Hexanoil homoserín lactona
C8 AHL	<i>N</i> -octanoil homoserín lactona
C14 AHL	<i>N</i> -tetradecanoil homoserín lactona
DAM	Metilación del DNA en adenina (por sus siglas en ingles)
DNA	Acido deoxiribonucleico (por sus siglas en ingles)
DNT	Toxina dermonecrótica (por sus siglas en ingles)
Fab	Fracción de unión al antígeno (por sus siglas en ingles)
GC-MS	Cromatografía de gases – Espectrometría de masas (por sus siglas en ingles)
HAI-1	<i>Harveyi</i> autoinductor 1
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (por sus siglas en ingles)
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
OC6 AHL	<i>N</i> -3-(oxo)-hexanoil homoserín lactona

OC12 AHL	<i>N</i> -3-(oxo)-dodecanoil homoserín lactona
OC14 AHL	<i>N</i> -3-(oxo)-tetradecanoil homoserín lactona
PBS	Solución salina de buffer fosfato (por sus siglas en ingles)
pH	Logaritmo [H ⁺]
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RA	Rinits atrófica degenerativa
RNA	Acido ribonucleico (por sus siglas en ingles)
SIM	Sulfuro Indol Motilidad
UFC	Unidades formadoras de colonia

1 INTRODUCCIÓN

La señalización celular es un mecanismo importante para el reconocimiento de los ambientes y la apropiación de recursos por parte de las bacterias. Existen muchas formas por medio de las cuales estas células reconocen el ambiente sin embargo el *Quorum Sensing* (abreviado como **QS**) es una de las más importantes debido a su amplia distribución y sus implicaciones en la biología. A través de esta forma de comunicación, las bacterias regulan la expresión de genes en respuesta a la concentración crítica de moléculas producidas por ellas mismas o por otros miembros de la comunidad en la que se encuentran. Este fenómeno permite el control y la coordinación de las actividades dentro de las poblaciones bacterianas, el uso efectivo de los recursos disponibles y la optimización de los procesos metabólicos, además beneficia a los hospederos eucariotas que en muchos casos aprovechan los productos de la expresión de genes mediada por este fenómeno (**Strauss, 1999**). Debido a la posibilidad de coordinación en comunidad, el QS como mecanismo de detección de la población tiene serias implicaciones en la patogénesis bacteriana. Algunos autores han postulado hipótesis sobre las principales funciones de la comunicación bacteriana en procesos infecciosos durante el curso de diferentes tipos de patologías que pueden comprometer los sistemas de órganos, dentro de las cuales se cuentan la disminución del gasto de energía durante la colonización, la modulación de la respuesta inmune del hospedero y la estabilización física de los *biofilms* bacterianos, entre otras. Las infecciones respiratorias, por ejemplo, son una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en diferentes mamíferos, incluyendo al hombre (**Waldvogel, 2004**) y en este tipo de enfermedades se ha encontrado una gran repercusión del QS en términos de la expresión del arsenal molecular que utilizan bacterias colonizadoras del tracto respiratorio. Uno de los ejemplos de infección respiratoria más conocidos en los que el QS se ha visto implicado es el de la interacción entre *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con Fibrosis Quística. En esta enfermedad se ha encontrado una importante modulación de la expresión de determinantes de virulencia de forma coordinada (**Riedel et al, 2001; Geisenberger et al, 2000**).

Existe evidencia de este tipo de interacciones en varias enfermedades reportadas. Una de ellas es la rinitis atrofica degenerativa (abreviada como **RA**). Esta enfermedad es una de

las afecciones respiratorias más graves de cerdos, conejos y otros vertebrados, siendo resultado del despliegue de interacciones de la biota normal y transitoria en la vía respiratoria superior de esos animales. Generalmente, la rinitis atrófica puede presentar dos tipos de evolución los cuales están relacionados con la presencia o ausencia de dos bacilos Gram negativos: *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*. Estas dos bacterias hacen parte de la comunidad microbiana basal del tracto respiratorio superior y constituyen parte de los agentes involucrados en lo que se ha descrito como “el complejo respiratorio”, una serie de condiciones bióticas y abióticas que llevan al desarrollo de enfermedades respiratorias degenerativas, causando desde neumonías hasta septicemias polimicrobianas en las que la señalización entre células juega un papel determinante **(Trigo, 1987; Ciprián et al, 1988)**.

Aunque muchos reportes referentes a esta patología muestran la colonización conjunta entre *P. multocida* y *B. bronchiseptica*, se sabe que en animales sanos se puede encontrar una o la otra. En los casos de enfermedad sin embargo, en presencia de *B. bronchiseptica* solamente, el animal desarrolla una rinitis atrófica no progresiva en la cual el daño al hueso es leve y tiende a auto-regenerarse de manera espontánea **(Montaraz Crespo, 1987)**. En el segundo tipo de rinitis (conocida como rinitis progresiva) se ha logrado recuperar en la mayoría de los casos a *P. multocida* junto a *B. bronchiseptica*. En un comienzo se demostró que la atrofia de los cornetes estaba asociada a la presencia de *B. bronchiseptica*, no obstante varios estudios reportaron la presencia de la bacteria tanto en animales sanos como en aquellos que presentaban signos de enfermedad **(Collings & Rutter, 1985)**. Experimentos posteriores permitieron demostrar que la inoculación de animales sanos con *B. bronchiseptica* conducía apenas a lesiones leves a moderadas. Algunos años después, se detectó la presencia de *P. multocida* en los casos mas devastadores de daño a los cornetes y algunos experimentos *in vivo* demostraron el papel de la bacteria en la degeneración de la zona ventral del cornete **(Pedersen & Elling, 1984)**. Estos hechos pusieron en duda la posibilidad de que fuera solamente *Bordetella bronchiseptica* o *Pasteurella multocida* la causa de la enfermedad y han permitido construir una hipótesis que supone la potenciación de la enfermedad únicamente en presencia de las dos bacterias. Esta hipótesis se fortaleció además con observaciones hechas posteriormente en las que se describe un cambio desfavorable en el epitelio nasal cuando la infección de *P. multocida* es precedida por *B. bronchiseptica* **(Harris & Switzer,**

1968; Dugal et al, 1992). Al parecer, no solamente hay cambios estructurales en el tejido sino que también una reorganización del microambiente como tal, lo cual resulta en el desarrollo de una enfermedad mucho más agresiva cuando las dos bacterias están juntas. Durante los primeros años de estudio de la rinitis atrófica se encontró la adherencia aumentada de *P. multocida* en anillos traqueales de cerdo pretratados con el sobrenadante de medio de cultivo de *B. bronchiseptica* filtrado y desnaturalizado. Esta observación soporta también la hipótesis mencionada siendo potencialmente productos extracelulares presentes en el medio los que favorecen la colonización. Algunos investigadores han realizado ensayos utilizando diferentes combinaciones de inóculo bacteriano y tiempos de inoculación para observar la capacidad de adherencia y colonización, encontrando un mayor número de células de *P. multocida* sujetas al tejido previamente tratado con células de *B. bronchiseptica* o incluso solamente con el sobrenadante del cultivo de esta última bacteria y se ha comprobado que la expresión de factores de virulencia como toxinas que dañan el epitelio o la presencia de apéndices bacterianos como *pili* no son los únicos responsables de la predisposición a la aparición de los signos de enfermedad como se había sugerido en previos estudios (**Dugal et al, 1992 ; Brockmeier & Register, 2007**).

La falta de argumentos para determinar que las toxinas de *B. bronchiseptica* son las únicas responsables de la predisposición a la colonización de *P. multocida* ha llevado a preguntarse también acerca del comportamiento de las bacterias junto a otros miembros de la biota basal del tracto respiratorio. Acerca de esta premisa se han realizado investigaciones principalmente con *B. bronchiseptica* y se ha encontrado que el patrón de aumento de la adhesión *in vivo*, observado en inoculaciones consecutivas con *P. multocida*, también se da en especies taxonómicamente relacionadas con esta bacteria. En *Haemophilus parasuis*, un miembro de la familia Pasteurellaceae muy cercano a *Pasteurella* se encontró un aumento en el número de células bacterianas adheridas al tejido epitelial al ser inoculado en presencia de *B. bronchiseptica* (**Brockmeier, 2004**).

El estudio de este caso de interacción no es diferente a otros casos en los que se ha determinado la influencia de la señalización celular en la virulencia bacteriana y tiene algunos elementos comunes con otras investigaciones.

Los hechos mencionados son evidencia de que existe señalización entre estas dos bacterias pero aún no se tienen datos contundentes sobre cuál es la verdadera influencia de *Bordetella bronchiseptica* o de las sustancias extracelulares producidas por la bacteria

en el medio de cultivo durante su crecimiento, sobre la virulencia de *Pasteurella multocida* (o por el contrario el efecto de *P. multocida* sobre *B. bronchiseptica*) y dado que las investigaciones sobre este tema en estos dos microorganismos es precaria, no se sabe tampoco si alguno de los productos secretados se relaciona con la comunicación bacteriana (*Quorum Sensing*). Hasta ahora, al respecto, únicamente se han realizado ensayos para determinar inducción de la bioluminiscencia en *Vibrio harveyi* por medio del sistema basado en el Autoinductor 2 (AI-2) con el sobrenadante de *P. multocida* y se han logrado encontrar secuencias homólogas al gen *LuxS* a través de herramientas de bioinformática proponiendo así la existencia de un circuito de QS dependiente de AI-2 que aún está muy pobremente caracterizado **(Malott & Lo, 2002)**.

Los estudios de QS, en otros modelos bacterianos y en la interacción con modelos eucariotas como plantas, han dado paso al desarrollo de técnicas para elucidar los pasos del proceso de señalización celular bacteriana y con esto entender con mayor nivel de resolución los elementos asociados a este tipo de comunicación. Actualmente tenemos una gran cantidad de información acerca de los componentes moleculares del QS como parte de los procesos infecciosos en laboratorio, sin embargo conocemos poco del papel del QS *in vivo* siendo pocas las metodologías que han permitido observar la influencia de este mecanismo en la restructuración de los órganos en los cuales residen las bacterias durante la infección. Es por esta razón que el modelo de explante de cornete de conejo estandarizado por el laboratorio de patobiología veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, se presenta como un elemento importante para entender la dinámica del QS en la rinitis atrofica causada por *P. multocida* sobre *B. bronchiseptica*, y sobre todo para determinar la direccionalidad y la magnitud de la influencia de la señalización celular entre bacterias. El estudio de esta enfermedad utilizando el modelo mencionado ha permitido establecer previamente la existencia de algunas lesiones propias de esta condición desde el punto de vista histopatológico **(Gallego, 2006)**. Algunos de estos cambios se usan como indicadores de patología y con ellos, es posible determinar un aumento o disminución de la frecuencia de estos cambios bajo la influencia de la señalización celular y así ver de manera práctica el fenómeno de comunicación.

Con base en esta evidencia y en las preguntas que surgen a partir de las observaciones descritas, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de la posible señalización bacteriana entre *P. multocida* y *B. bronchiseptica* sobre el desarrollo de algunos cambios

celulares en el epitelio nasal de un organocultivo de cornete de conejo y sobre la producción de algunos de los principales factores de virulencia de ambas bacterias.

Esta relación se evaluó de dos maneras: primero, caracterizando los cambios celulares en el epitelio pseudoestratificado del septo nasal de cornetes, cultivados *in vitro*, después de aplicar cultivos bacterianos de cada cepa pre-estimulados con el sobrenadante de su contraparte y segundo, evaluando el efecto de esos sobrenadantes sobre la expresión de algunos factores de virulencia como lipasas, hemolisinas, y proteasas.

Además, con el objetivo de detectar la presencia de moléculas de señalización tipo *N*-acil homoserín lactona (Abreviadas generalmente como **AHLs**) se utilizaron cepas biosensoras portadoras de genes reporteros los cuales únicamente se expresan en presencia de ciertos grupos de estas moléculas de comunicación.

Con ayuda de estas metodologías se encontró un efecto represor de la inducción de algunos cambios morfológicos celulares en el epitelio por el sobrenadante de *Pasteurella multocida* sobre *Bordetella bronchiseptica*. Estos cambios se asocian principalmente a muerte celular, picnosis, dilatación de espacios interepiteliales y pérdida de cilias. También se encontró un efecto represor de estos mismos cambios cuando se aplicó el sobrenadante de *B. bronchiseptica* sobre *P. multocida*. Asociado a esto se observó un efecto inductor de la producción de proteasas y un efecto represor de la producción de lipasas cuando *P. multocida* fue estimulada con el sobrenadante de medio de cultivo de *B. bronchiseptica*. Además se encontró un efecto represor de la expresión de proteasas cuando *B. bronchiseptica* fue estimulada con el sobrenadante de *P. multocida*. Finalmente, a través de la cepa biosensora *Agrobacterium tumefaciens* pZLR4 se detectó la producción de una AHL o una molécula similar a las AHLs de cadena larga, nunca antes reportada para estas especies bacterianas.

Teniendo en cuenta este contexto, realizamos algunos ensayos en los cuales determinamos a través del explante de cornete de conejo, la influencia de las *N*-acil homoserín lactonas en los cambios celulares en el epitelio nasal y también en la producción de algunos factores de virulencia. Encontramos que cuando *B. bronchiseptica* se encuentra en presencia de las tetradecanoil y 3-oxo-tetradecanoil homoserín lactonas (C14 y OC14 AHL) hay un aumento de la frecuencia de células con algún tipo de cambio celular indicador de patología (principalmente células picnóticas y con vacuolización

intracitoplasmática) y observamos un aumento en la producción de lipasas mientras que en presencia de las hexanoil y 3-oxo-hexanoil homoserín lactonas hay una disminución de frecuencia del número de células con este tipo de cambio y también una disminución de la producción de enzimas lipolíticas . Por otra parte, en *Bordetella* se encontró un aumento en la actividad hemolítica en presencia de la hexanoil homoserín lactona (C6 AHL) mostrando así que el sistema de señalización probablemente esté mediado por moléculas similares a AHLs y que no solamente estimula sino que en algunos casos reprime los rasgos de virulencia de la bacteria. En *P.multocida* se encontró un aumento de la frecuencia de células con cambios morfológicos en presencia de la C6 AHL y un aumento en la producción de enzimas lipolíticas. De manera contrastante se observó una disminución de la frecuencia de células muertas cuando la bacteria se estimuló con la C14 AHL. Estos experimentos permitieron mostrar la existencia de señalización celular por medio de la cual estas dos bacterias regulan la expresión de algunos factores de virulencia y así modulan los pasos de colonización de su hospedero.

También, se logró responder a la pregunta de investigación ¿existe señalización celular entre *P. multocida* y *B. bronchiseptica*? y ¿cuál es su influencia sobre la virulencia bacteriana en el epitelio de cornete y sobre la producción de factores de virulencia? Con esta pregunta resuelta, se tiene una nueva aproximación, desde el punto de vista ecológico, al estudio de la rinitis bacteriana en el campo de la salud animal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de la señalización celular bacteriana entre *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* sobre los cambios en el epitelio respiratorio del septo nasal de fetos de conejo y sobre la expresión de algunos factores de virulencia

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Detectar el tipo de cambios celulares causados por la inoculación con mono y co-cultivos de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*, en explantes de cornetes de conejo
2. Evaluar la influencia de los sobrenadantes del medio de mono y co-cultivos de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* sobre cambios celulares en los cornetes cultivados *in vitro*
3. Evaluar la influencia de los sobrenadantes del medio de mono y co-cultivos de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* en la producción de algunos de sus factores de virulencia
4. Detectar la producción de algunas *N*-acil homoserín lactonas en mono y co-cultivos de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*

3 MARCO TEORICO

3.1 Señalización celular bacteriana: *Quorum Sensing* y el control de la expresión genética en bacterias

La historia del mundo y la evolución de los seres vivos han sido impactadas por el papel de los microorganismos y particularmente de las bacterias. Muchas de las características de los seres vivos se asocian y en algunos casos dependen de las relaciones estrechas con las bacterias de su microbioma y de las relaciones de las bacterias con su ambiente y con el componente biótico de los ecosistemas. En estas relaciones, las interacciones sintróficas y de sinergia juegan un papel importante no solamente en beneficio de los comensales sino también de los hospederos. Esto ha sido demostrado por ejemplo en *Euprymna scolopes*, el cual gracias a su simbiosis mutualista con la bacteria *Vibrio fischeri*, desarrolla un órgano de luz que contiene al microbio y cuyos tejidos interiores (principalmente epitelios ciliados) son remodelados durante un complejo proceso de señalización entre la bacteria y las células eucarióticas, en el cual la arquitectura del órgano cambia y mejora el *fitness* de ambos organismos (**Milton, 2006**). En el microbioma del intestino también se han reportado interacciones que modulan el desarrollo del órgano (**Hooper, L. 2004**). Las interacciones comprenden entre otras la producción de pequeñas moléculas necesarias para la nutrición de células acompañantes y la señalización química directa entre células. La importancia de las interacciones químicas se refleja en eventos que van desde el reconocimiento del entorno, la cooperación en la nutrición celular hasta la estructuración de la comunidad y la adecuada y eficiente colonización de nuevos ambientes y la creación de nichos permanentes. Las interacciones químicas entre células son por tanto variadas y comprenden estructuras moleculares que abarcan una gran gama de posibilidades.

De la gran cantidad de formas de señalización, el *Quorum Sensing* es una de las más importantes debido a sus implicaciones a nivel ecológico en el desarrollo de las comunidades bacterianas, en procesos fisiológicos en los ciclos de vida bacterianos y en los potenciales usos en la industria farmacéutica, en la producción de combustibles y en biotecnología (**Hogan, 2006; March & Bentley, 2004**). No solamente es importante a nivel local (por ejemplo en los tejidos del hospedero o en determinados micro-habitats) sino que a una mayor escala se ve reflejado en macroprocesos como los ciclos

biogeoquímicos en los cuales la regulación de rutas bioquímicas como la fijación de nitrógeno involucra pasos mediados por este mecanismo de señalización (**Gonzalez & Marketon, 2003**). El QS se conforma como un mecanismo de señalización, reconocimiento y modulación de procesos, dependiente de la concentración crítica de la sustancia señalizadora. Este conjunto de elementos moleculares se traduce en la regulación de la expresión de genes en dependencia de la densidad poblacional y de manera fascinante permite la coordinación de actividades, distribución de funciones y modulación de fenotipos en comunidades bacterianas.

En el QS de bacterias Gram negativas una sintetasa citoplasmática (proteína tipo LuxI o tipo LuxM) cataliza, generalmente, la formación de *N*-acil homoserín lactonas (**AHLs**), moléculas derivadas de ácidos grasos que son difusibles a través de la membrana celular de la bacteria y se acumulan en el medio hasta alcanzar una concentración mínima permitiendo el reconocimiento tanto de la densidad poblacional de sus alrededores como de su composición cuando esta molécula llega a una concentración determinada y es capaz de unirse con alta afinidad a un receptor intracelular (proteína tipo LuxR) que es a su vez un factor de transcripción (**Bassler, 1999**). En la figura 1 se observa un esquema del sistema de QS en bacterias Gram negativas.

Generalmente, las AHLs se han purificado y caracterizado a través de metodologías analíticas como HPLC y GC- MS (**Schaeffer et al, 2002; Pardo-Roa, 2007, Cuadrado Silva, 2009**) y su detección se lleva a cabo por medio de la metodología descrita por Shaw y colaboradores (**Shaw et al, 1997**) en la cual se realizan extractos líquido/líquido del sobrenadante del medio de cultivo bacteriano y son separados por medio de cromatografía en capa delgada (CCD) y posteriormente con biosensores bacterianos de AHLs se revela la presencia de estas moléculas. En esta metodología, se utilizan cepas biosensoras que poseen sistemas truncados de *Quorum Sensing* en donde no hay formación de AHLs al interior de la célula, sin embargo la sobreexpresión del receptor/factor de transcripción tipo LuxR y la fusión de los promotores de genes regulados por QS a genes reporteros (pigmentos, enzimas de bioluminiscencia, proteínas fluorescentes, producción de enzimas que degradan sustratos que precipitan como complejos coloreados) permite que el sistema recombinante de QS sea capaz de detectar la molécula e inducir un fenotipo detectable.

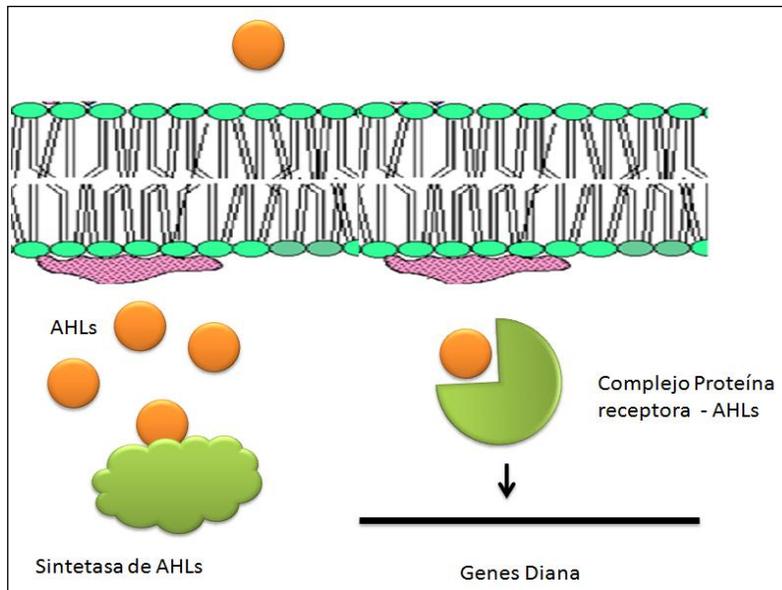


Figura 1. Sistema canónico de QS en bacterias Gram Negativas. En este esquema las *N*-acil homoserín lactonas (círculos naranja) son sintetizadas por medio de la proteína tipo LuxI (nube verde). Al llegar a una concentración umbral, las AHLs son capaces de unirse con alta afinidad al receptor intracelular tipo LuxR (círculo verde incompleto) formando un complejo estable que es capaz de iniciar la transcripción de genes diana regulados por este sistema

Aunque generalmente la señalización del QS entre bacterias Gram negativas se da a través de AHLs, algunos grupos de bacterias tienen otro tipo de moléculas de señalización derivados de quinolonas o de compuestos cetónicos y ácidos grasos (**McKnight *et al*, 2000; Tiaden *et al*, 2010**).

Las bacterias Gram positivas utilizan como autoinductores principalmente oligopeptidos modificados que actúan sobre el control de la expresión genética dentro de las redes de QS. Ya que las membranas biológicas son impermeables a los péptidos, la secreción de estas moléculas de señalización en este tipo de bacterias está medida por transportadores, los cuales utilizan ATP como fuente de energía para permitir la salida de la molécula al medio externo (**Ng & Bassler, 2009**). En la figura 2 se muestra un esquema de la arquitectura del circuito tipo de QS en una bacteria Gram positiva. El receptor de membrana hace parte de un sistema de dos componentes con sensor transmembranal, el cual transduce la información a través de una serie de fosforilaciones de proteínas al interior de la célula, luego de unirse al oligopeptido inductor.

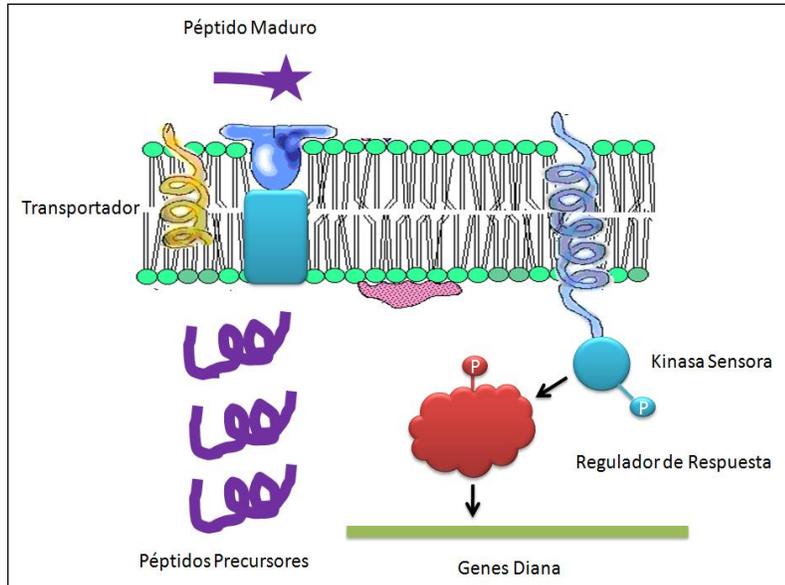


Figura 2. Sistema canónico de QS en bacterias Gram Positivas. En este esquema se muestran los péptidos autoinductores como precursores (espirales moradas) que son modificados al interior de la célula y posteriormente secretados por medio de transportadores tipo ABC (barril azul). EL peptdo maduro se una a una kinasa sensora transmembranal que sufre una serie de forforilaciones y defosforilaciones y activa a un regulador de respuesta (nube rosa) el cual iniciara la transcripción de genes diana.

Existen también otros tipos de sistemas de QS que no corresponden a los descritos anteriormente. Por ejemplo en *Vibrio harveyi*, una bacteria Gram negativa, existe un sistema híbrido entre los circuitos canónicos de Gram positivas y Gram negativas. Esta bacteria produce y detecta un autoinductor tipo AHL (denominado HAI-1) sintetizado por la enzima LuxM y una molécula adicional, llamada AI-2 que también es producida y detectada por la bacteria. AI-2 es un derivado de la 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (Abreviada generalmente como DPD) y es sintetizada por la enzima LuxS. Es claro, sin embargo, que cada una de estas moléculas señalizadoras tiene un receptor particular asociado a la membrana citoplasmática (LuxN para AI-1 y LuxPQ para AI-2) que hacen parte de dos sistemas de dos componentes, los cuales convergen en la activación de la proteína LuxO que finalmente regula la expresión de un mismo set de genes (**Strauss, 1999**). En la figura 3 se muestra un esquema de la arquitectura del sistema de QS en *V. harveyi*

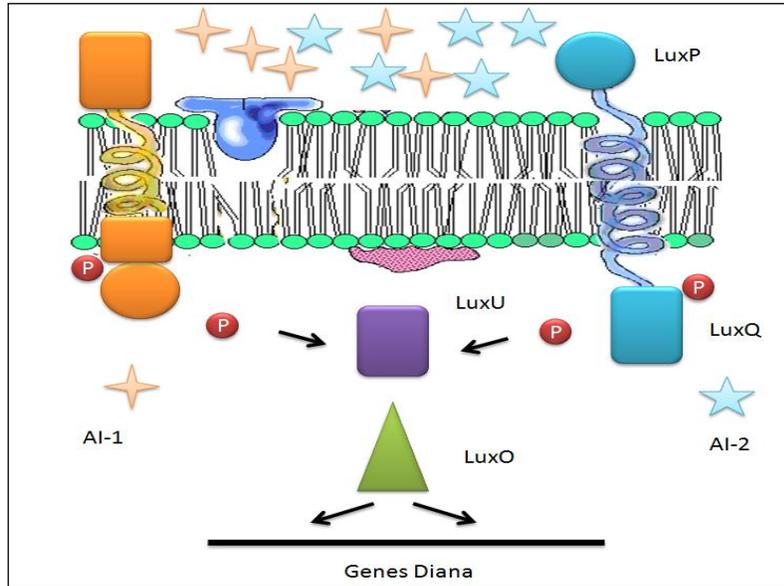


Figura 3. Sistema de QS en *Vibrio harveyi*. Las estrellas naranjas corresponden a AI-1 y las estrellas azules a AI-2. El rectángulo morado corresponde a la proteína LuxU y el triángulo verde a la proteína LuxO.

El descubrimiento del QS cambió el paradigma del “lobo solitario”, en el cual se enmarcaban las bacterias, al nuevo comportamiento social bacteriano en el cual hay una sincronización y unificación de procesos con el fin de aprovechar de una mejor manera los recursos disponibles (**Greenberg, 2003**). El QS es además un mecanismo necesario para la estructuración de las comunidades bacterianas y esto tiene implicaciones en la relación que mantienen los hospederos con su microbiota. A partir de este tipo de señalización, el hospedero se mantiene en un estado de equilibrio y esta misma señalización puede inducir la ruptura de ese equilibrio con la consecuente desestabilización de las comunidades bacterianas.

3.2 Implicaciones del *Quorum Sensing* en la patogénesis bacteriana

A través del uso de diferentes modelos experimentales se ha tratado de validar el nexo entre la presencia de circuitos de QS y el daño que produce la bacteria en su hospedero. Se ha comprobado que la virulencia es aumentada o potenciada por la comunicación entre bacterias y se puede ver reflejada tanto en las lesiones ocasionadas por acción de los factores de virulencia que produce el microorganismo como en el *fitness* o capacidad de reproducción que tiene una bacteria con determinado genotipo (**Heurlier et al, 2006**).

Actualmente, se han logrado relacionar algunos circuitos de QS con la regulación de la expresión de genes de virulencia en diferentes organismos modelo. Por ejemplo, en la fibrosis quística, una de las patologías respiratorias más importantes del siglo XXI, en la que la imposibilidad de limpieza mucociliar conlleva a la colonización de bacterias oportunistas en el epitelio respiratorio, se ha encontrado clara evidencia de la actividad sinérgica entre dos bacterias que colonizan el tracto respiratorio de individuos que padecen de esta enfermedad. En estos pacientes, *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de mantener junto con *Burkholderia cepacia* dicha actividad sinérgica a través de la producción de moléculas de señalización celular, llevando a un aumento en la expresión de factores de virulencia a través de un circuito complejo de QS. Las redes jerárquicas de QS capaces de regular la virulencia *in vivo* tienen como consecuencia el desarrollo de una enfermedad totalmente diferente a la producida por cada una de las dos bacterias por separado. **McKenney et al** en 1995 describieron una forma de comprobar tal interacción utilizando los sobrenadantes de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia* para evaluar la producción de algunas de las moléculas implicadas en la virulencia (proteasas, lipasas y sideróforos) de estas dos bacterias (**McKenney et al, 1995; Mole et al, 2007**). Estimulando los cultivos celulares con los sobrenadantes en diferentes combinaciones, se llegó a la conclusión de que la producción de estas moléculas se veía aumentada por algún tipo de sustancia extracelular que se podía obtener en el cultivo y que potenciaba la expresión de ciertos genes. Posteriormente esto se comprobó a través de estudios genéticos en los cuales se caracterizaron totalmente los circuitos de QS en estas dos bacterias (**Riedel et al, 2001**). Por medio de este trabajo se comprobó la producción de la C12-3-oxo y la C4 AHL en *P. aeruginosa* y posteriormente en *B. cepacia* se encontró la producción de la C6 y C8-AHL (**Huber et al, 2001**). En esta especie, el control de la motilidad y la expresión de algunas enzimas están regulados por este circuito de señalización.

En el género *Pseudomonas* los circuitos de QS son variables y regulan diferentes tipos de factores de virulencia. En algunas ocasiones estos genes están involucrados en la expresión de características benéficas para el hospedero (**Steindler et al, 2008**). Para mencionar algunos ejemplos, en *Pseudomonas corrugata* la regulación de la producción de péptidos catiónicos antimicrobianos se da a través de QS mediado por la C6, C6-3-oxo y C8 AHL (**Licciardello et al, 2007**). En otras especies bacterianas como *Salmonella typhimurium*, *Comamonas testosteroni* y *Vibrio* sp., se ha determinado la regulación de la

expresión de adhesinas, enzimas de degradación de hormonas animales y hemolisinas respectivamente a través de circuitos de QS (**Nesse et al, 2011; Pruneda-Paz et al, 2004; Tsou & Zhu, 2010**).

En bacterias Gram positivas, el papel del QS se ha estudiado principalmente en *Staphylococcus aureus* en donde el regulador secundario de genes *agr* (del inglés *accessory gene regulator*) controla positivamente la expresión de adhesinas y negativamente la producción de la proteína A de unión a inmunoglobulina G (**Podbielski & Kreikemeyer, 2004**).

Aunque en la mayoría de casos, el QS es el mecanismo por el cual se regula la expresión de genes de virulencia, existen también otros tipos de señalización aún desconocidos en los cuales se evidencia la influencia de la inoculación simultánea con dos o más microorganismos. Esta influencia y su respuesta no es solamente la suma de la acción de los inoculos sino una consecuencia de las interacciones entre las células. Por ejemplo, en el modelo experimental de infección cutánea de ratón, se ha mostrado un aumento en la virulencia de *Streptococcus constellatus* por adición de sobrenadantes de *Fusobacterium nucleatum* (**Kuriyama et al, 2000**). En este grupo de bacterias de la cavidad oral, aún no es claro que tipo de señalización está involucrada en la regulación de la virulencia aunque algunos experimentadores han propuesto vías mediadas por QS a través del AI-2 y señalización por medio de los subproductos del catabolismo de los carbohidratos (**Frias et al, 2001**) Entre *Peptostreptococcus micros* y *Prevotella intermedia* también se ha reportado un tipo de sinergia en la que se produce un aumento de la virulencia en términos de los tamaños de absceso generados en ratones inoculados en laboratorio. Como se ha mencionado previamente y de acuerdo con lo que se ha visto en otros modelos, este tipo de interacción no se explica únicamente por la suma de los inóculos bacterianos sino que tiene que ver con la estimulación por medio de sustancias en el medio de cultivo (**Araki et al, 2004**).

Otros modelos experimentales han permitido ver que no solamente las interacciones bilaterales entre un par de bacterias implicadas en el desarrollo de una enfermedad son importantes, sino que la interacción de toda la comunidad es fundamental para entender el fenómeno patológico (**Cardenas et al, 2012**).

3.3 *Pasteurella multocida*

La bacteria fue descrita por Louis Pasteur en 1881 quien la identificó como el agente causal del cólera aviar (**Hunt, et al, 2000**). La especie *P. multocida* se ha diferenciado según el tipo de antígenos presentes en la cápsula de la bacteria o en su lipopolisacárido. Así entonces se han descrito 5 serotipos capsulares (A, B, D, E y F) basándose en la hemaglutinación indirecta y 16 tipos somáticos (1-16) (**Heddleston et al, 1972**). También se han descrito tres subespecies dentro de la especie *Pasteurella multocida* y se han determinado sus relaciones con otros miembros del género, como *P. dagmatis* e incluso con miembros del género *Mannheimia* (**May et al, 2001; Petersen et al, 2001**).

Este bacilo Gram negativo es un aerobio facultativo capaz de utilizar diversas fuentes de carbono como la maltosa, el manitol, sorbitol y sacarosa, metabolizar el triptófano con la producción de Indol y utilizar la ornitina como fuente de energía a través de la decarboxilación enzimática (**Vera et al, 2008**). Algunos investigadores han encontrado una relación entre la posibilidad de utilizar fuentes de carbono y de nitrógeno y el estado de virulencia de la bacteria; tal es el caso de la enzima ornitina decarboxilasa que en la mayoría de casos en los que no se puede detectar su producción, se observan colonias pequeñas y cepas atenuadas (**Dworking et al, 2006**). Las pruebas bioquímicas determinativas son el agar de Christensen en el cual se comprueba la Incapacidad de producir la enzima Ureasa y la prueba SIM (Sulfuro Indol Motilidad) la cual resulta negativa para la producción de ácido sulfúrico y motilidad pero positiva a la producción de Indol (**Esquinas, 2007**). En la tabla 1 se muestran la mayor parte de los caracteres fenotípicos utilizados para identificar a *Pasteurella multocida*.

Tabla 1. Principales fenotipos identificados con pruebas bioquímicas usadas para la clasificación de *Pasteurella multocida*

Pruebas de Resultado positivo	Pruebas de Resultado Negativo
Test de porfirina	Motilidad
Reducción de nitratos	Citrato de Simmons
Fermentación de D-Fructosa	TSI
Fermentación de D-Glucosa	MR-VP
Fermentación de D-Galactosa	LIA
Fosfatasa alcalina	Gelatinasa

Acronimos: TSI: Triple sugar Iron. **MR-VP:** Methyl Red-Voges Proskauer. **LIA:** Lisine Iron Agar. (Tomado de **Avila et al, 2009**)

Los aislamientos de *P. multocida* del tracto respiratorio de rumiantes, cerdos y conejos puede formar colonias largas, de aspecto mucoso como “gotas de agua”. La bacteria expresa fimbrias y algunas adhesinas especialmente cuando es incubada en temperaturas superiores a su temperatura óptima de crecimiento (37°C). Es probable que las fimbrias jueguen un papel importante en la adhesión ya que se ha detectado la expresión de estas moléculas solo en cepas capaces de adherirse al epitelio de la mucosa (**Harper et al, 2006**). La cápsula en *P. multocida* se compone principalmente de ácido hialurónico y algunos glicopéptidos sintetizados por medio de enzimas codificadas en el locus CAP y se ha establecido que es un determinante de virulencia (**Boyce et al, 2000; Mutters et al, 1933**). *P. multocida* es capaz de producir varias enzimas y toxinas que desencadenan reacciones fuertes en el hospedero. Las enfermedades más importantes y de mayor relevancia económica incluyen a la rinitis atrófica degenerativa progresiva, la septicemia hemorrágica, el cólera aviar y los resoplidos en conejos. Las especies afectadas principalmente son *Bubalus bubalus*, *Syncerus caffer*, *Dama dama*, *Cervus nipon*, *Axis axis*, *Cervus elaphus canadiensis* y *Antilocapra americana*. En este tipo de enfermedades se ha logrado aislar y caracterizar molecularmente a *Pasteurella multocida* subespecie *multocida*.

En *P. multocida* es poco lo que se conoce sobre la señalización celular. En 2002, Rebecca Malott y colaboradores llevaron a cabo un estudio preliminar de genes de QS dentro de la familia Pasteurellaceae principalmente en la especie *Mannheimia haemolytica* que es, como otras especies de la familia, un miembro comensal en las mucosas del tracto respiratorio superior y que bajo determinadas condiciones aun no establecidas claramente, expresa genes de virulencia (**Malott et al, 2002**). En este trabajo se encontró que el sobrenadante de medio de cultivo de varios miembros de la familia, incluyendo a *P. multocida* generaron la inducción de bioluminiscencia en la cepa biosensora *V. harveyi* BB170 indicando que los miembros de esta familia producen el AI-2. Aunque este trabajo es una aproximación preliminar, sugiere que el papel de la señalización durante las infecciones respiratorias también involucra interacciones químicas interespecie en las cuales puede haber una compatibilidad entre géneros relacionados filogenéticamente. Además, dado que la señalización por AI-2 es un mecanismo de reconocimiento interespecífico y que muchas bacterias lo producen, es probable que se dé la coordinación entre varios componentes de la biota nasal durante las infecciones respiratorias. Otro punto a favor de esta hipótesis fue reportado en 2010 por

Armbruster y colaboradores. En este trabajo se mostró como la interacción entre *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae* (otro miembro de Pasteurellaceae) es determinante en el desarrollo de la otitis media. Allí, se esclareció que el efecto del AI-2 de *H. influenzae* sobre algunos rasgos de la virulencia de *M. catarrhalis* se ve reflejado principalmente en la resistencia a antibióticos y en la formación de *biofilm*.

Hasta la fecha no se ha reportado la producción de AHLs en *P. multocida* o alguna molécula similar a este tipo de señalizadores.

3.4 *Bordetella bronchiseptica*

Fue descrita en 1952 por Manuel Moreno López quien designó a la bacteria con el nombre *Bordetella bronchiseptica* en honor al médico Francés Jules Bordet (**Goodnow, 1980**). Algunos análisis del gen que codifica el RNA de la subunidad ribosomal 16S han establecido a *Achromobacter* como el género bacteriano más cercano a *Bordetella*. Dentro del género, las especies más relacionadas son *Bordetella pertussis* y *B. parapertussis* quienes conforman el denominado “cluster de *Bordetella bronchiseptica*”, siendo cada bacteria una subespecie más de *B. bronchiseptica*. (**Gerlach et al, 2001**)

Este bacilo no posee cápsula aunque se ha descrito formación irregular de peptidoglicano dando una apariencia superficial rugosa (**Richter & Kress, 1967**). Las colonias se pueden ver como rugosas o lisas y cada una de estas morfologías se ha asociado por muchos años con la expresión de factores de virulencia, sin embargo pueden ser inducidas por componentes del medio de cultivo. *B. bronchiseptica* expresa las enzimas ureasa y oxidasa de manera constitutiva siendo estas las dos pruebas bioquímicas principales para su diferenciación preliminar. La motilidad evaluada a 37°C es una característica importante de esta especie y se usa como carácter fenotípico de identificación. También se ha descrito la asimilación de algunas moléculas importantes para el crecimiento de la bacteria como D-Glucosa, D-Gluconato, L-Malato y Esculina (**VanDamme et al, 1996**). Algunas características para su diferenciación bioquímica y morfológica se encuentran descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Algunas de las características utilizadas para diferenciar especies del género *Bordetella*

Especie	%G+C	Crecimiento en MacConkey	Motilidad	Oxidasa		Ureasa	Pigmento
				K	G-H		
<i>B. pertussis</i>	66-68	-	-	+	+	-	-
<i>B. parapertussis</i>		+	-	-	ND	+	+
<i>B. bronchiseptica</i>		+	+	+	+	+	-
<i>B. holmesii</i>	61.5-62.3	+	-	-	-	-	+
<i>B. hinzii</i>	65-67	+	+	+	+	+	-
<i>B. avium</i>	62	+	+	+	-	-	-
<i>B. trematum</i>	64-65	+	+	-	-	-	-

Acronimos: **K:** Revelado de la prueba de Oxidasa con el reactivo de Kovac. **G-H:** Revelado de la prueba de oxidasa con el reactivo de Gaby – Hadley. +: Resultado positivo. -: Resultado negativo. ND: No determinado. (Tomado de **VanDamme et al, 1996**)

Los genes que codifican para los factores de virulencia del género *Bordetella* están presentes en casi todos los miembros y son inducibles bajo determinadas condiciones de temperatura, pH, concentración de sales y iones y se rigen por algunos factores determinantes como activadores o inhibidores en los promotores del gen, con lo cual se debe prestar especial cuidado a las pruebas de actividad enzimática que se realicen, pues podrían llevar a resultados incongruentes (**Hausman et al, 1996**). En perros se comprobó que *B. bronchiseptica* es la causa de una enfermedad conocida como la “tos de las perreras”, debido a que se presenta en animales confinados en contenedores para venta o en granjas que presentan actividades pastoriles. El proceso infeccioso se limita al árbol traqueobronquial y se caracteriza por la adherencia de bacterias a las células epiteliales y su posterior ubicación en los cilios y estructuras superficiales (**Woolfrey & Moody, 1991**). La infección desencadena la infiltración polimorfonuclear y mononuclear de la submucosa e hiperplasia de los tejidos linfoides adyacentes. *B. bronchiseptica* es principalmente una bacteria extracelular sin embargo varios niveles de invasión y sobrevivencia intracelular han sido demostrados *in vitro* a través de inmunomarcación (**Guzman et al, 1994**). Estos hallazgos son importantes en los estudios patológicos para establecer el tiempo de infección y la dosis mínima infectiva. Además, permiten enfocar los análisis histopatológicos a puntos específicos de los montajes de tejidos debido a que hay

también una unión preferencial por determinadas estructuras celulares para poder entrar en ella.

En *B. bronchiseptica* son pocos los estudios que han permitido esclarecer la relación de cooperación que esta bacteria mantiene con otros miembros de la biota del tracto respiratorio de vertebrados. En algunos trabajos usando el modelo suino, se ha analizado detalladamente la coinoculación con otras bacterias. Allí se ha determinado que la inoculación conjunta con *Hemophilus parasuis* lleva a un aumento en el número de animales con neumonía; sin embargo, algunos de estos hallazgos también se explican por la alta capacidad de adhesión de *H. parasuis* (Brockmeier, 2004).

Aunque no se tienen indicios de señalización entre *P. multocida* y *B. bronchiseptica* se sabe que algunas sustancias producidas por otros miembros de la biota basal del tracto respiratorio pueden inducir un aumento en la severidad de los cambios celulares que se presentan a lo largo de la rinitis atrófica. En un estudio de 2011, Pósa *et al* evalúan la interacción entre *P. multocida*, *B. bronchiseptica* y la toxina fumonisina producida por especies del hongo *Verticillium*. Allí se describe un aumento en los focos necróticos y edema alveolar e intersticial en presencia de los tres elementos (Posá *et al*, 2011). No obstante este estudio no revela nada acerca de las interacciones moleculares entre las dos bacterias. Como se puede ver, existe un gran vacío de conocimiento sobre la ecología de las relaciones entre *Pasteurella* y *Bordetella*

3.5 Factores de virulencia en *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*.

La virulencia se relaciona con la enfermedad y es medible en términos de morbilidad y mortalidad. Actualmente la visión panorámica de la virulencia ha cambiado, involucrando la ecología y la biología molecular para el estudio de las condiciones en las cuales cada bacteria expresa determinados genes, cuya función es establecerse en la comunidad y está determinada por las relaciones que esa bacteria tiene con el medio y con otros componentes bióticos de su entorno. Según el hábitat en el que se encuentre, la expresión de estos genes puede o no ser deletérea para el organismo hospedero o para la misma comunidad bacteriana.

Las bacterias poseen complejos sistemas para la regulación de la expresión de factores de virulencia en el curso de la enfermedad y en muchos casos aún no se sabe bien si son causa o consecuencia de la misma. Algunos sistemas de regulación de la expresión de genes tanto en *P. multocida* como en *B. bronchiseptica* están ligados a sistemas de reconocimiento del ambiente y en ese sentido permiten a la bacteria realizar funciones que tienen que ver con la adecuada proliferación en condiciones favorables. Se han descrito muchas moléculas que contribuyen al asentamiento y desarrollo de las poblaciones de estas bacterias y muchas de las vías que controlan su síntesis. Sin embargo, son pocos los mecanismos de patogenicidad de *P. multocida* y *B. bronchiseptica* descritos y caracterizados a profundidad. Para poder entender las relaciones que presentan estos dos microorganismos durante la rinitis atrófica degenerativa se debe poder diferenciar el efecto de los factores de virulencia de cada una y el efecto combinado de estos. Algunos ejemplos de la regulación de estos circuitos de virulencia serán descritos a continuación.

En *B. bronchiseptica* existe un amplio rango de ambientes en los cuales la bacteria puede sobrevivir y se sabe que la variabilidad de las moléculas que actúan como determinantes de virulencia provee la versatilidad de condiciones y hospederos en los que la célula puede proliferar. Muchos de los factores de virulencia que confieren esa versatilidad son regulados a través de cascadas de fosforilación. Sin embargo, existen otras moléculas de las cuales no se conoce aún su regulación. Dentro de los factores de virulencia más importantes se encuentran las enzimas proteolíticas. En *Bordetella*, estas encuentran en un complejo que posee actividad proteolítica dependiente de ATP, conocido como HslUV. Este sistema consiste en una subunidad grande con actividad ATPasa con homología a otras ATPasas de la familia Clp y una subunidad pequeña con actividad peptidasa, relacionada con la subunidad beta del proteosoma de eucariotes (**Parkhill et al, 2003**).

La hemólisis es también un mecanismo de patogenicidad utilizado por la bacteria principalmente para obtener sustratos de los componentes de los eritrocitos y para aumentar en el microambiente las concentraciones de hierro que es un elemento necesario para la nutrición. En *B. bronchiseptica* se ha descrito la proteína AC-Hli (Adenilato ciclasa-Hemolisina) en la cual los últimos 400 amino ácidos el extremo N terminal forman el sitio de actividad ciclasa de AMP, el cual exhibe también actividad

hemolítica sobre eritrocitos de oveja y humanos formando poros en la membrana celular **(Matoo et al, 2001)**.

Por su parte, *P. multocida* se caracteriza por producir varios tipos de proteasas con tamaños desde los 180 hasta los 600kDa. Principalmente se han encontrado proteasas que tienen como sustratos inmunoglobulinas implicadas en la protección humoral de las mucosas (G y A) y que son susceptibles a rompimientos enzimáticos en la secuencia bisagra de la fracción de unión a antígeno (Fab) de la proteína **(Pouedras et al, 1992)**. Aunque no se sabe cual es el papel de cada determinante de virulencia en la infección conjunta con *B. bronchiseptica* curiosamente, la producción de proteasas varía dependiendo del hospedero en el cual se encuentra la bacteria y al parecer la inducción de estas enzimas solo se da en el animal bajo condiciones aún no establecidas. En algunos casos se ha comprobado que los aislamientos provenientes de animales que han muerto por septicemia con *P. multocida* no producen una gran cantidad de proteasa, de manera que se sospecha la existencia de un factor externo regulando la producción de estas moléculas en el animal vivo **(Negrete-Abascal et al, 1999)**.

Las múltiples enzimas lipolíticas de *P. multocida* se caracterizan por ser producidas al inicio de la fase exponencial en la curva de crecimiento y tener una actividad óptima en pH ligeramente básico (pH 8.0 o mas) **(Pratt et al, 2000)**.

También se ha demostrado la producción de una proteína captadora de hemoglobina con actividad hemolítica. Esta proteína membranal posee la secuencia homóloga característica de proteínas de transporte tipo TonB y es capaz de unir eritrocitos ovinos en condiciones de escasez de hierro **(Bosch et al, 2002)**. A diferencia de la hemólisis por la AC-Hli de *B. bronchiseptica*, en *P. multocida* la precipitación de eritrocitos cambia la carga de la membrana citoplasmática y posteriormente lisa las células rojas para liberar la hemoglobina.

El sistema bvg (Bordetella virulence genes) en B. bronchiseptica

La expresión de genes de virulencia en *B. bronchiseptica*, depende de la concentración de algunos iones o de condiciones ambientales que son los activadores de cascadas de señalización durante los procesos infecciosos. Por ejemplo, los genes de virulencia no son expresados en baja temperatura o en presencia de MgSO₄ o ácido nicotínico. Este fenómeno se ha descrito como variación fenotípica. El locus responsable para esta

variación se denomina *bvg* e involucra dos genes relacionados: el gen *bvgA* y el gen *bvgS*. Estos genes codifican los elementos que constituyen un sistema de dos componentes que actúa a través de la membrana celular de la bacteria. El producto del gen *bvgA* es un activador de la transcripción y la proteína BvgS es un sensor localizado en la membrana interna del organismo. La transducción de señales en el sistema BvgA/S ocurre mediante un proceso de 4 pasos con reacciones sucesivas de transferencia de fosfato (**Locht, 1999**). En condiciones de bajo sulfato de magnesio o en ausencia de ácido nicotínico, se inicia una cascada de fosforilación hasta llegar a un punto en el que se activa la proteína BvgA que contiene otro dominio esencial para la transducción al interior de la célula e induce la expresión de genes de virulencia (**Mattoo et al, 2001**). En *B. bronchiseptica* el estado de activación del sistema virulento se conoce como Bvg+ mientras que el estado desactivado se menciona como Bvg-; este último estado involucra la expresión de otros genes que le confieren a la bacteria mecanismos de sobrevivencia en condiciones limitantes de nutrientes (**Cotter et al, 1997**). A pesar de verse claramente diferenciada la expresión de genes en *B. bronchiseptica*, en cada uno de los estados de activación del sistema, se ha encontrado un estado de expresión intermedio en el cual hay una buena adaptación al medio y la bacteria puede sobrevivir bajo determinadas condiciones de nutrientes, pH y temperatura (**Locht, 1999**).

El sistema de metilación de adenina (DAM) de Pasteurella multocida

Este mecanismo epigenético permite el control de la expresión de genes en bacterias de modo que se consuma la menor energía posible y se encuentre un hábitat favorable a través de la expresión selectiva de genes involucrados en la colonización. Se observa tanto en la sobreproducción de producto génico como en la atenuación de la transcripción (**Low et al, 2001**). En *P. multocida* se demostró la actividad funcional del gen *Dam* a través de ensayos mutacionales y experimentos *in vivo*. En estos experimentos, la cepa 11039 de *P. multocida* fue transformada con un plásmido portador del gen pero carente del promotor funcional el cual fue remplazado por el promotor del operón lac mostrando así la generación de cepas atenuadas y de mutantes espontáneos, resaltando el papel del gen en la virulencia de la bacteria (**Chen et al, 2003**).

En *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* no se ha prestado especial atención al fenómeno de comunicación intercelular ni se ha descrito ningún circuito de QS. No obstante, uno de los pocos trabajos en los cuales se ha hecho mención de posibles redes

de control de la expresión génica mediado por densidad poblacional se hizo en la familia Pasteurellaceae y en algunas especies del género *Pasteurella* en donde se encontraron sintetetasas de moléculas de señalización involucradas en vías de QS alternas a aquellas mediadas por AHL. En este caso se encontró el gen *luxS* el cual codifica la enzima catalizadora de la formación de 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona (AI-2) que activa finalmente la expresión de genes al unirse a su receptor, tal y como sucede en la señalización dependiente de AHL (**Mallott et al, 2002**). AI-2 tiene una forma compleja de reconocimiento la cual involucra una quinasa sensora en la membrana citoplasmática de la bacteria y se presenta tanto en grupos de bacterias Gram positivas como Gram negativas ampliando aún más las posibilidades de comunicación inter-especie (**Lowery et al, 2003**).

Aún no se ha reportado un vínculo entre los diferentes sistemas de regulación de la virulencia y la señalización entre estas dos bacterias. Sin embargo, en otros procariontes se ha demostrado la interacción entre sistemas de regulación de la expresión de genes (por ejemplo los sistemas dependientes de captación de hierro mediados por la proteína Fur) y la producción de AHLs en *P. aeruginosa* (**Patriquin et al, 2008**). También se sabe que en especies de *Vibrio* el sistema de dos componentes en el QS mediado por AI-2 tiene la misma estructura básica del sistema BvgA/S de *Bordetella bronchiseptica* en términos de proteínas involucradas y función aunque es desconocido si el mecanismo de activación se da por una vía homóloga.

3.6 Generalidades del sistema respiratorio en vertebrados, el modelo *in vitro* de explantes de cornete de conejo y la Rinitis Atrófica Degenerativa

Generalidades del sistema respiratorio

El sistema respiratorio de vertebrados es una compleja vía en la cual suceden muchos procesos químicos necesarios para la respiración, la nutrición y el desarrollo del animal. En mamíferos, el aire tiene que atravesar el sistema respiratorio superior así que fluye desde las fosas nasales donde se calienta y humecta y algunas de las partículas en suspensión son removidas antes de llegar a la superficie del pulmón (**Bacha & Bacha, 1990**). Para facilitar la tasa de transporte y difusión de gas, el área superficial del sistema

respiratorio debe estar cubierta de una amplia capa de epitelios de diferente tipo (**Randall, 2000**). La porción respiratoria de la cavidad nasal se cubre de un epitelio ciliado columnar pseudoestratificado. En la nasofaringe y orofaringe se encuentran células ciliadas, pseudoestratificadas columnares y un epitelio escamoso pseudoestratificado respectivamente. En la tráquea se encuentran células ciliadas en un epitelio columnar pseudoestratificado y anillos de cartílago hialino que dan soporte a la pared de la tráquea.

Para ser funcionales estos epitelios deben estar recubiertos por una comunidad microbiana característica que ofrece herramientas de protección y de control molecular, medios por los cuales las vías aéreas se mantienen activas y saludables. Por ejemplo, la resistencia a la colonización por bacterias oportunistas se da principalmente por algunas respuestas dependientes de la microbiota basal, entre ellas, la inflamación programada de las mucosas (**Stecher & Hardt, 2008**). En el caso de algunos vertebrados superiores la microbiota basal de tracto respiratorio superior está compuesta principalmente por miembros de los *phyla* Firmicutes y Actinobacteria (**Rasmüsen et al, 2000; Lemon et al, 2010**) y esto sucede también en animales como porcinos y conejos aunque en estos últimos son pocos los trabajos que se han publicado (**Yue et al, 2011**). Estas comunidades se encargan de proporcionar algunos beneficios a la célula eucariótica del hospedero: vitaminas, aminoácidos, metabolitos necesarios para el crecimiento y multiplicación celular y un constante entrenamiento de las células del sistema inmune (**Avila et al, 2009**)

Cuando el epitelio respiratorio se encuentra en equilibrio con su comunidad microbiana y no ha sido perturbado de ninguna manera, se caracteriza por mantener una armonía estructural que se refleja en sus componentes celulares. Algunas células pequeñas y redondas caracterizan la lámina basal, mientras que las capas más superficiales están cubiertas por células epiteliales ciliadas y un número variable de células caliciformes productoras de moco que se caracterizan por su morfología alargada, las cuales en presencia de algún agente estimulante aumentan de tamaño para producir y expulsar mucinas. Juntas, estas células superficiales proveen una importante línea de defensa, ya que los cilios golpean continuamente e impulsan una capa delgada de moco con material extraño atrapado a la zona superior y fuera de las vías aéreas o hacia la tráquea para su deglución. Los tipos celulares característicos del epitelio respiratorio son ciliados, columnar, indiferenciado secretor y células basales (**Crystal et al, 2008**)

No obstante, bajo condiciones determinadas las mismas comunidades generan un desbalance homeostático que propicia estados de enfermedad respiratoria.

Esta transición de estado como estímulo de una perturbación se representa inicial y principalmente en la morfología celular de los componentes epiteliales y en el mal funcionamiento del sistema de defensa del epitelio. La pérdida de la integridad de los epitelios en la vía respiratoria es uno de los signos más importantes en las infecciones de este tipo, puesto que es la primera barrera de defensa que cualquier microorganismo debe superar para lograr colonizar a su hospedero (**Coraux et al, 2008**). Como respuesta a perturbaciones químicas y mecánicas se ha demostrado la existencia de mecanismos adaptativos en el epitelio respiratorio. Entre ellos la proliferación celular durante las primeras 48 horas de la perturbación en donde por lo general se encuentra un pico de actividad mitótica y la migración celular mediada principalmente por la expresión de proteasas, la pobre diferenciación de células basales y la expresión de fibronectina y algunos receptores específicos para moléculas de la matriz extracelular (**Zahm et al, 1997**). En animales como el conejo se ha demostrado que existe una gran dependencia entre los mecanismos de respuesta del epitelio y la integridad de la lámina propia y las células basales.

Rinitis atrófica degenerativa

Las infecciones que se producen en el sistema respiratorio como consecuencia de la acción de miembros de la comunidad microbiana presente en el órgano son causantes del 7% de las muertes en animales solamente en la unión europea y se cree que del 40 al 80% de las enfermedades en bovinos involucran el sistema respiratorio y están dadas entre otras condiciones, por el hacinamiento de las poblaciones animales en los cuales las poblaciones bacterianas se ven influenciadas por cambios abruptos en las condiciones físico-químicas del microambiente (como por ejemplo en el caso de la pasteurelisis neumónica o fiebre de embarque del ganado en la cual los animales transportados largas distancias en hacinamiento desarrollan signos de enfermedad) y el cambio climático el cual modula la dinámica de las poblaciones en diferentes escalas, incluyendo las poblaciones de microorganismos (**Yates, 1982 ; Jordan et al, 2006**).

En la biota normal de los animales se encuentran muchos de los posibles agentes etiológicos de las enfermedades respiratorias de origen infeccioso (**von Graevenitz,**

1977). Algunos de estos organismos asociados a patologías pulmonares y traqueales son los virus de DNA adenovirus: Citomegalovirus, Herpes Simplex Virus y Varicela Zoster Virus y bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* y *Mycobacterium* spp entre muchos otros (**Lipscomb et al, 2010**). Estos microorganismos secretan moléculas complejas en el medio extracelular que les confieren ventajas para adquirir los nutrientes necesarios para sus procesos metabólicos.

Al iniciar la síntesis de factores de virulencia las bacterias utilizan entre otras, vías invasivas y/o toxinas para amortiguar los efectos del sistema inmune del hospedero y así dañar el epitelio. Dentro de esos factores de virulencia, se encuentran toxinas glucosilantes, deaminantes, toxinas de de-adenilación, proteasas, toxinas polimerizantes de actina y muchas más (**Gyles & Prescott, 2004**). Estas moléculas producen cambios en el epitelio que generan debilitamiento de uniones estrechas, la activación de células productoras de moco y la producción excesiva de surfactantes, el colapso de la cromatina (picnosis, cariólisis y cariórrexis) y otros cambios asociados a procesos inflamatorios y desordenes de la permeabilidad que dejan entre otras cosas, espacios entre las células del epitelio (**Casadevall & Pirofski, 2009**).

La rinitis atrófica (abreviada como **RA**) es una enfermedad contagiosa de muchos animales (incluido el ser humano) que es altamente prevalente en todo el mundo y que ha sido adjudicada a *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* (**Deeb et al, 1990**).

Del amplio rango de enfermedades respiratorias en animales de cría y producción, la rinitis atrófica degenerativa es importante debido a que afecta un gran número de individuos en términos de su tasa de crecimiento y de la eficiencia de alimentación y engorde y de esta forma interrumpe las cadenas de producción (**Stärk, 2000**). Por otra parte, aún no son claros los factores que determinan la aparición de la enfermedad ni su desarrollo. La enfermedad fue descrita hace más de 170 años por Franke y algunos de los primeros reportes tratando de encontrar la etiología de la enfermedad, involucraron caracteres hereditarios y efectos de la nutrición (**Brown et al, 1966; Franke, 1830**). Después de comprobarse la naturaleza infecciosa de la enfermedad, se propusieron varios agente etiológicos en los primeros estudios. Entre estos *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Sphaerophorus*, *Corynebacterium* o *Mycoplasma*. Sin embargo, solo ciertas cepas de *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida* toxigénica probaron ser

capaces de reproducir constantemente atrofia de los cornetes, lesión que es característica en RA. Brockmeier y colaboradores en 2007 (**Brockmeier et al, 2007**) describen varios tipos de rinitis dependiendo del agente microbiano aislado en el caso clínico siendo la rinitis producida por *B. bronchiseptica* no progresiva mientras que la producida por *P. multocida* se describe como rinitis atrófica progresiva y la co-infección resulta en casos severos de rinitis atrófica progresiva. Muchos investigadores apoyan la idea de que *P. multocida* es el único agente etiológico de la enfermedad en granjas y zonas de producción e incluso en la vida silvestre (**Montaraz-Crespo, 1987**) ; no obstante, se ha visto un incremento en la adherencia de *P. multocida* al epitelio de la tráquea de cerdos pretratado con *B. bronchiseptica*. En este aspecto, se ha descartado la toxina dermonecrótica (DNT) de *Bordetella* como el unico factor necesario para predisponer al organismo a la infección con la otra bacteria (**Brockmeier et al, 2007; Deeb et al, 1990**).

Su manifestación clínica incluye la atrofia parcial o completa de uno o ambos huesos del cornete, acortamiento de la nariz, descargas nasales mucopurulentas, estornudos, hemorragia nasal y una tasa de crecimiento retardada (**Magyar et al, 2002**). Los cambios patológicos de la rinitis atrófica se evalúan por sección transversal de la cavidad nasal al nivel del primer/segundo premolar superior en donde las conchas dorsales y ventrales están desarrolladas totalmente, en el caso de un cerdo normal. En casos moderados a severos, las turbinas de los cornetes ventrales son el área más comúnmente afectada; varían de ligeramente encogidas a totalmente atrofiadas. En los casos más severos, ocurre la atrofia de las turbinas dorsales de los cornetes ventrales. En la forma más severa, las estructuras de los cornetes están totalmente ausentes. Aunque se ha prestado gran atención a la zona oronasal, se ha reportado la inducción de patología en otros organos, por ejemplo, se han encontrado lesiones en el epitelio de la vejiga (**Hoskins et al, 1997**).

A nivel histológico, los signos que representan mejor un aumento de la virulencia de *P. multocida* y *B. bronchiseptica* durante el desarrollo de la RA han sido comprobados en varios investigaciones del grupo de Patobiología veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia (**Esquinas, 2007, Gallego, 2006**) y son consistentes con las observaciones hechas en otros trabajos de investigación a nivel mundial. Estos cambios celulares son el hinchamiento de las células epiteliales con citoplasma vacuolizado, hiperplasia y metaplasia del epitelio nasal, engrosamiento marcado del endotelio arterial en la lamina

propia y un denso infiltrado mononuclear y polimorfonuclear en la submucosa (**Rutter, 1983**). También se ha observado la pérdida y la aglutinación de cilias, la formación de espacios entre las células basales en la mucosa, las cuales presentan múltiples vacuolas intracitoplasmáticas y desintegración de las estructuras celulares en el epitelio, dilatación de los espacios interepiteliales e hiperactividad de células caliciformes (**Al-haddawi et al, 1999**).

Dentro de los cambios celulares típicos de la RA también se cuentan aquellos relacionados con procesos de muerte celular que se ven reflejados en la reorganización nuclear. La necrosis del epitelio respiratorio de recubrimiento y del epitelio glandular se ha definido en términos de variaciones morfológicas nucleares, principalmente picnosis (disminución del tamaño del núcleo), cariorexix (fragmentación del núcleo sin desplazamiento de lugar), cariólisis (fragmentación y desintegración del contenido nuclear) en el epitelio glandular y detección de detritus celulares en la luz del órgano (**Al-haddawi, 2001**).

En la figura 4 se muestran imágenes obtenidas por el grupo de patología veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia en donde se han identificado los principales cambios celulares asociados a la rinitis atrófica degenerativa producida por *P. multocida* o *B. bronchiseptica*

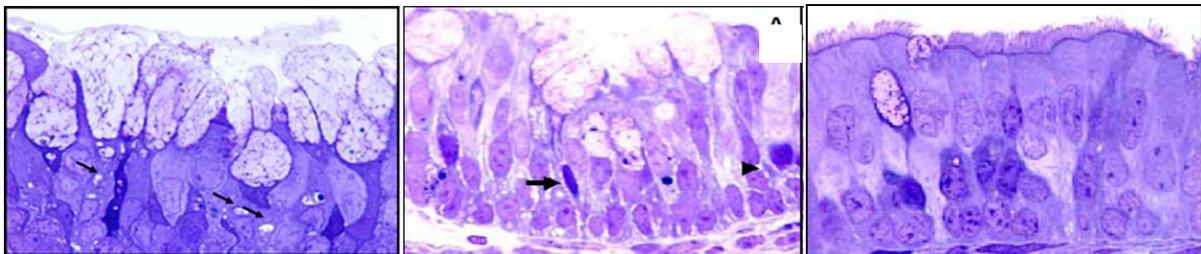


Figura 4. Generalidades de los cambios inducidos por cada una de las bacterias involucradas en la rinitis atrófica. Para la determinación de los cambios los tejidos fueron analizados en microscopía óptica de alta resolución (MOAR).

Izquierda: Reto de cornetes de conejo con *B. bronchiseptica*: se observa vacuolización del citoplasma de células epiteliales.

Centro: Reto de cornetes de conejo con *P. multocida*: se observa un aumento considerable en los espacios interepiteliales y una disminución en la integridad del epitelio. Las flechas señalan cada una de las observaciones descritas. Tomado de Esquinas, 2007 y Gallego, 2006

Derecha: Epitelio no retado (control negativo)

El modelo *in vitro* de explantes de cornete de conejo

En el estudio de la RA se ha encontrado un patrón diferencial de cambios macro y microscópicos dependiendo de la presencia o ausencia de las dos bacterias. Generalmente estos estudios se han llevado a cabo analizando tejidos extraídos de animales inoculados en vida. Estos análisis muestran solamente una parte del panorama de la relación entre *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* puesto que allí existen varias limitaciones para el estudio de la patología infecciosa debido a las múltiples posibilidades de contaminación, el efecto de la biota acompañante y el ruido de fondo que pueden generar características inherentes a los sujetos experimentales (edad, peso, alimentación, condiciones de hacinamiento, estado inmunológico del animal, etc). Después de años de estudio sobre el comportamiento de estos dos bacilos Gram negativos en la RA surgió la necesidad de encontrar una herramienta para poder observar y caracterizar este tipo de interacción *in vivo* tomando una serie de observaciones en el tiempo y controlando algunos parámetros que permiten obtener mucha más claridad de los eventos en el proceso infeccioso. Botero e Iregui en 1999 proponen una aproximación a la neumonía enzootica en conejos en la cual se determinan los cambios celulares típicos de la enfermedad y es a partir de esta propuesta que se desarrolla la práctica de evaluación de la interacción entre *P. multocida* y *B. bronchiseptica* *in vitro* (**Botero et al, 1999**). Esta idea se basa en explantes de cornetes de conejo que se pueden mantener bajo condiciones controladas y a los cuales se les pueden aplicar varios tratamientos para ser analizados en el microscopio garantizando la confiabilidad y robustez estadística necesaria para validar o rechazar cualquier hipótesis (**Esquinas & Iregui, 2007**). Este modelo permite observar desde los cambios más sutiles en las primeras horas del desarrollo de la patología hasta el resultado final de la interacción entre las dos bacterias. Los hallazgos más importantes se muestran en algunas investigaciones hechas utilizando este modelo. Por ejemplo, Gallego e Iregui en 2006 (**Gallego & Iregui, 2006**), encontraron una distribución de bacterias mayoritaria en la luz del cornete y una asociación entre la presencia de bacteria y la aparición de células en necrosis con cambios leves en la estructura general del epitelio, en estudios con *Bordetella bronchiseptica*. Por su parte Esquinas e Iregui en 2007 (**Esquinas & Iregui, 2007**), reportan localización de *Pasteurella multocida* cercana al borde ciliado del epitelio y en los detritus y moco acumulados en la luz, además de presentar signos de apoptosis de las glándulas caliciformes, cambios abruptos en los espacios intercelulares y una marcación positiva de

lipopolisacárido al interior de las células epiteliales, en el citoplasma de la mayoría de células. Debido a que el explante de cornete de conejo se presenta como una herramienta confiable y novedosa en el estudio de las enfermedades infecciosas, es un buen modelo para desarrollar investigaciones sobre la virulencia bacteriana. Los cambios celulares observados en el cornete inoculado con las bacterias por separado muestran la viabilidad de esta herramienta como elemento de medida indirecta de la virulencia bacteriana **(Figura5)**.

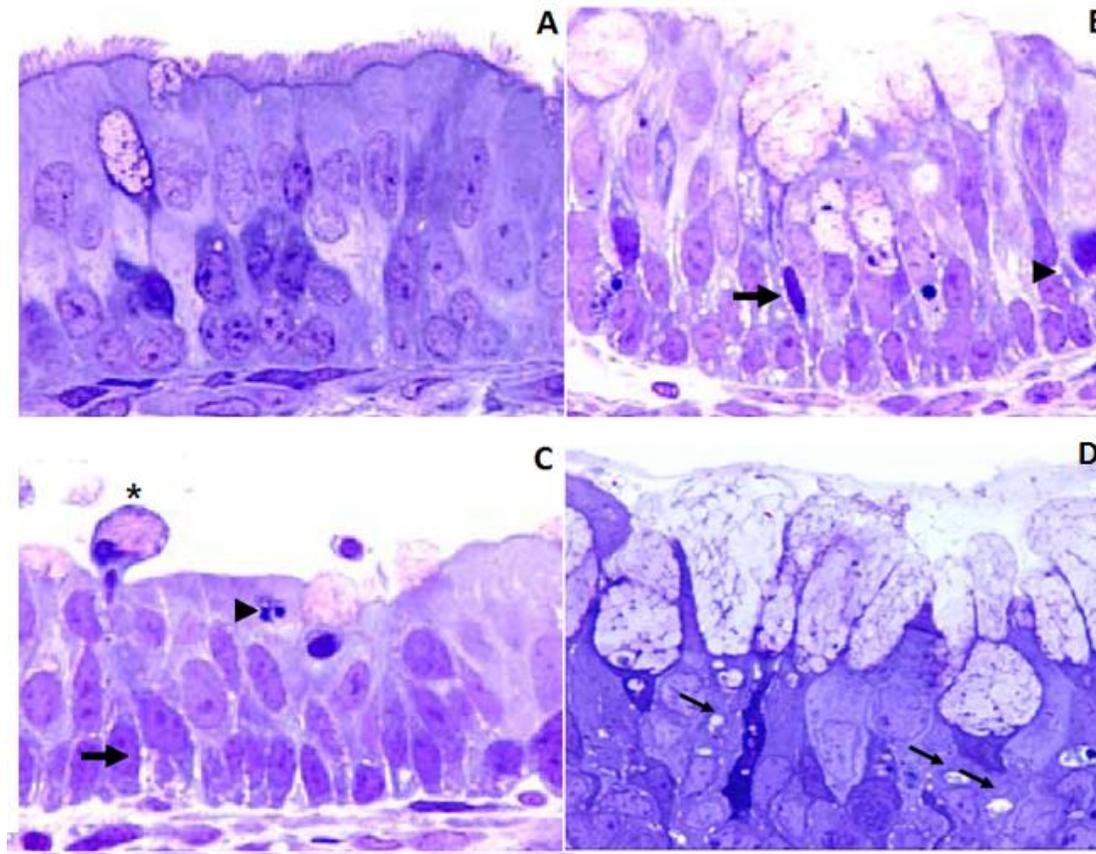


Figura 5. Principales cambios celulares identificados en el explante de cornete de conejo *in vitro*. Para la determinación de los cambios los tejidos fueron analizados en microscopía óptica de alta resolución (MOAR).

A: Epitelio nasal sin inocular

B: Epitelio inoculado con *P. multocida*. *Flecha* – muerte celular con picnosis nuclear *cabeza de flecha* – dilatación de los espacios intercelulares

C: Epitelio inoculado con *P. multocida*. *Asterisco* – descamación celular con apoptosis

D: Epitelio inoculado con *B. bronchiseptica*. *Flechas* – Vacuolización intracitoplasmática

Tomado de Esquinas, 2007 y Gallego, 2006

El modelo de explante de cornete es una metodología novedosa en el estudio de las relaciones sinérgicas entre bacterias y como tal presenta ventajas frente a otros procedimientos de análisis *in vitro*. Las ventajas más llamativas consisten en la fiel reproducción de eventos inflamatorios como la migración de heterófilos (polimorfonucleares) en la mucosa nasal, microcirculatorios o vasculares y de los cambios morfológicos y citológicos que se presentan en un animal vivo durante la infección con las dos bacterias además de presentar fenómenos de diferenciación celular tejido específica que solamente sucede en tejidos de estructura tridimensional como sucede en la tráquea y la concha nasal, en donde señales intercelulares inician la respuesta adaptativa del epitelio ante la injuria. Adicionalmente, el cultivo de explantes permite examinar las interacciones entre el epitelio y otras estructuras del sistema respiratorio ya que se ha establecido que los explantes de órganos de la vía aérea superior mantienen algunas de las características que se observan en el animal, por ejemplo la cobertura con moco, la actividad mucociliar y la estructura celular en los casos de salud y de enfermedad **(Abeynaïke et al, 2010)**. En términos prácticos, los explantes de cornete son difíciles de manejar puesto que se debe tener cierto grado de experiencia para su extracción y existe un sesgo muy marcado por efectos o artefactos del procedimiento quirúrgico.

A través del modelo de explante de cornete se pueden determinar las tres observaciones importantes que se han descrito como blancos de investigación en los procesos infecciosos: la formación de determinantes de virulencia en diferentes estados de la infección y los elementos involucrados en la coordinación de su producción, el reconocimiento de los factores del hospedero que afectan el comportamiento bacteriano y la interacción metabólica bacteria-bacteria y con su hospedero **(Smith, 2000)**.

4 METODOLOGÍA

4.1 Bacterias y condiciones de Cultivo

Las cepas de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* fueron aisladas de los cornetes de conejos con signos de rinitis atrófica (descarga nasal mucopurulenta, anorexia, cianosis entre otros) en una granja del departamento de Cundinamarca, en Colombia por la medica veterinaria Carolina Gallego del grupo de patobiología veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Estos microorganismos fueron aislados en agar BHI suplementado on 5% de sangre de cordero defibrinada y trasladadas al laboratorio de patobiología veterinaria, en donde se llevaron a cabo pruebas bioquímicas para su diferenciación, entre las cuales se cuenta catalasa, oxidasa, ureasa, motilidad y crecimiento en agar MacKonkey. Los aislamientos fueron conservados en caldo Luria Bertani (**LB**) suplementado con glicerol anhidro estéril al 10%. Se caracterizaron con algunas de las pruebas bioquímicas más relevantes (SIM, Motilidad, Ureasa, Oxidasa y Fermentación de lactosa) en el laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia y la identificación molecular de estas cepas se llevó a cabo por medio de la secuenciación de la subunidad ribosomal 16S rDNA. Para esto se amplificó el gen a partir de DNA de colonia (**Fode-Vaughan et al, 2001**) extraído con el método estandarizado por el grupo de Comunicación y Comunidades Bacterianas, del Departamento de Biología. Luego de amplificado y secuenciado, el resultado fue analizado comparando las secuencias obtenidas con las secuencias reportadas en las bases de datos por medio de la herramienta BLAST (NCBI) (**Altschul et al, 1990**). Se hicieron alineamientos múltiples con el programa ClustalX. Se calculó la matriz de distancia y se obtuvieron los porcentajes de similaridad entre secuencias. El dendrograma se construyó utilizando la distancia Kimura 2 parámetros con el algoritmo de agrupamiento *Neighbor Joining* en el Programa MEGA4 (**Kumar et al, 2008**).

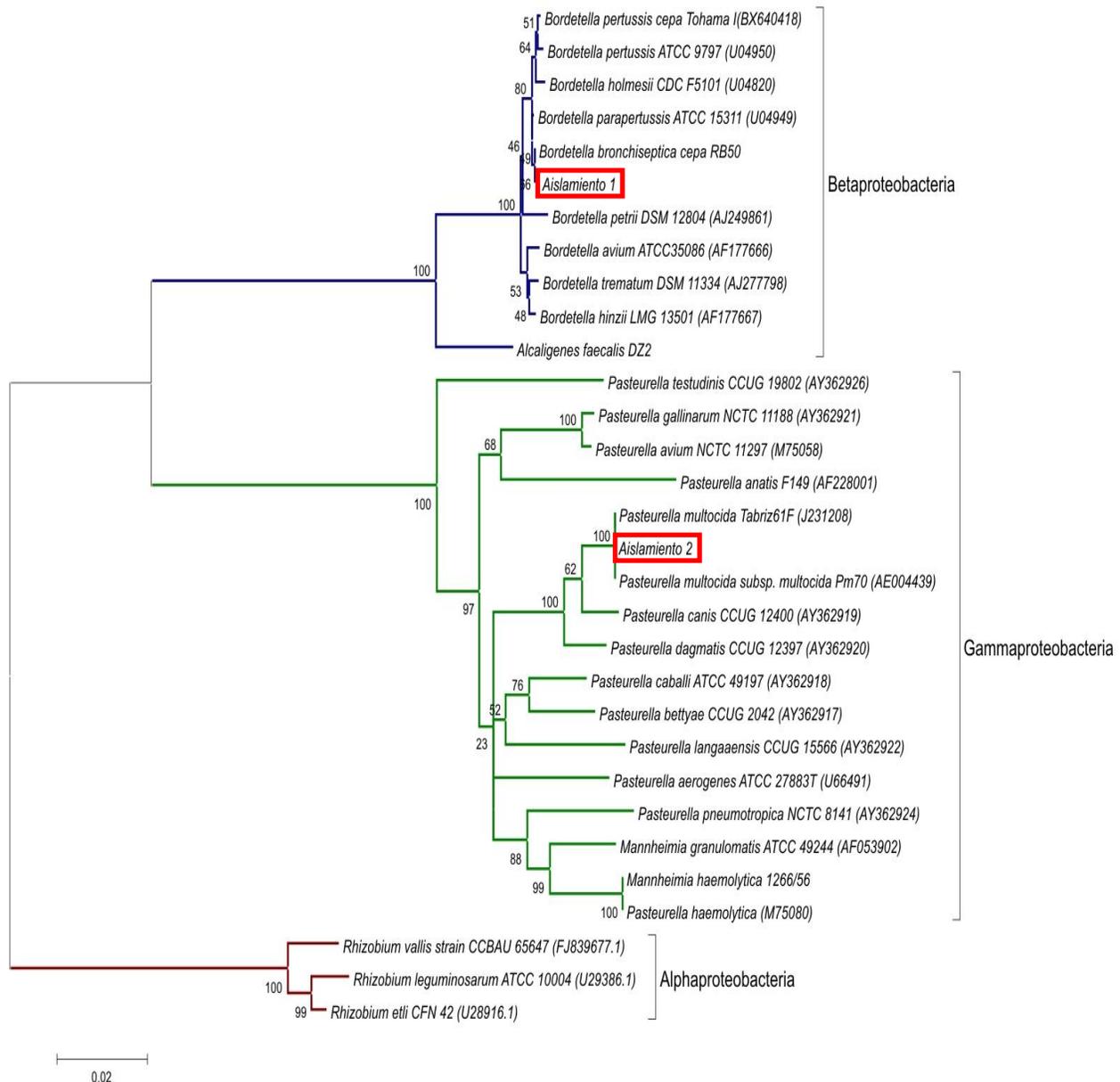


Figura 6. Arbol taxonómico para identificación de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* por secuencia del gen rDNA16S. El árbol fue construido (en este estudio) alineando las secuencias del gen 16S rDNA de los aislamientos (aislamientos 1 y 2) con secuencias de las especies más cercanas depositadas en la base de datos NCBI. La matriz de distancia fue calculada por medio de la distancia p y el árbol fue reconstruido usando el algoritmo de agrupamiento *Neighbor joining* con bootstrap = 1000. El aislamiento 1 tuvo la menor distancia p con la cepa referencia *Bordetella bronchiseptica* RB50 (0,006) lo cual se traduce en un 99,4% de similitud con la cepa referencia. El aislamiento 2 tuvo la menor distancia con la cepa referencia *Pasteurella multocida* Pm70 (0,005) lo cual se traduce en un 99,5% de similitud con la cepa referencia. Los aislamientos están señalados con un recuadro rojo.

Para determinar el tiempo de generación, la concentración de biomasa celular para inocular los explantes y la densidad óptica adecuada para aplicar los tratamientos y realizar las extracciones de *N*-acil homoserín lactonas se construyó la curva de crecimiento de ambas bacterias sembrándolas en caldo de tripticasa de soya (**CST**)

(MERCK, Alemania) y determinando los valores de densidad óptica a una longitud de onda de 600nm cada 30 minutos por 32 horas. Para todos los ensayos de inoculación de explantes *in vitro*, cultivos frescos de estas bacterias fueron preparados el día anterior al experimento, sembrando las bacterias en caldo (CST) e incubando los medios a 37°C por 30 h en agitación a 150 r.p.m.

Las cepas *Streptococcus equi* (donada por el laboratorio de Patobiología veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (donada por el laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología), *Pseudomonas putida* Iso y *P. putida* IsoF 117 (donadas por la Doctora Kathrin Riedel del centro de investigación en infecciones de la Universidad de Braunschweig en Alemania) fueron sembradas en caldo LB a 37 °C por 24h en agitación a 150 rpm.

Las cepas *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* donada por el laboratorio de fitopatología molecular de la Universidad Nacional de Colombia y *Burkholderia cepacia* perteneciente al grupo de Comunicación y Comunidades Bacterianas fueron sembradas en medio King B líquido e incubadas a 29°C por 24h en agitación a 150 r.p.m.

Los biosensores *Escherichia coli* pSB403, *E. coli* pSB401, *E. coli* pSB406, *E. coli* pSB1075, *Chromobacterium violaceum* C.V.O26 y *Pseudomonas aeruginosa* PASC8, *Pseudomonas putida* IsoF117 pKR-C12, fueron sembrados en LB con antibióticos apropiados: Tetraciclina (10µg/ml), Ampicilina (50-100µg/ml) y gentamicina (20-100 µg/ml) respectivamente. *Sinorhizobium meliloti* Rm11558 (pJNSinR) fue sembrado en medio LB con kanamicina (25 µg/ml) y suplementado con Magnesio y Calcio (2.5 mM cada uno). *Agrobacterium tumefaciens* pNTL4 fue sembrado en medio ABG suplementado con gentamicina (30 µg/ml) y *Xylella fastidiosa* 8523(pKLN55) fue sembrada en medio King B suplementado con estreptomycinina (50 µg/ml).

Los biosensores fueron amablemente donados por los doctores Vittorio Venturi del ICGEB en Trieste, Italia; Juan González de la Universidad de Texas en Dallas, Estados Unidos; Stephen Lindow de la Universidad de California en Berkeley, Estados Unidos y Kathrin Riedel del Helmholtz Center for Infectious diseases en la Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania.

4.2 Obtención de explantes de cornetes de conejo

Para detectar los cambios celulares producidos por las bacterias, se siguió la metodología propuesta por Esquinas e Iregui en 2007. En condiciones totales de asepsia, se obtuvieron conejos neonatos gnotobióticos de 25 días de gestación a partir de una hembra preñada sana. Los fetos se extrajeron por cesárea, anestesiando a las hembras preñadas con Xilazine (5mg/kg) y Ketamina (35mg/kg) y disectados por sección medular realizando cortes secuenciales de 2 mm de espesor de la fosa nasal, removiendo además las secciones más alejadas al septo nasal con el fin de reducir el efecto del corte de la cuchilla sobre los explantes. Los cornetes se lavaron dos veces con medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) para remover cualquier microorganismo transitorio presente en las fosas de los fetos y se mantuvieron en medio de cultivo DMEM durante 4 horas. Todos los tratamientos aplicados a los cornetes se llevaron a cabo en cajas de petri de 5 cm de diámetro con 10 ml de DMEM e incubados en atmósfera saturada al 95% de O₂ y 5% CO₂ a 37°C. El procedimiento de obtención de los explantes tuvo lugar en el laboratorio de patobiología veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia y estuvo de acuerdo con los lineamientos del comité de ética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

4.2.1 Criterios de determinación de cambios celulares en explantes de cornete de conejo

Los criterios de selección de cambios celulares relacionados con la rinitis atrófica degenerativa se basaron en los reportes del grupo de patobiología veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia (**Botero & Iregui, 1999, Gallego & Iregui 2006, Esquinas & Iregui 2007**). Los cambios en la morfología celular se basan en anomalías en la forma del núcleo, eventos de permeabilidad celular y algunos trastornos de la permeabilidad vascular. También se consideraron cambios en la arquitectura del tejido, localización, severidad y distribución de los cambios en el explante.

Muerte celular: se contó el número de células con cambios nucleares indicadores de muerte (núcleos hipercromáticos, picnosis, cariorrexis y cariólisis).

Vacuolización: se determinó la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas en las células epiteliales y en las células basales en la mucosa nasal como pequeñas vesículas hialinas ocupando buena parte del volumen celular.

Descamación: Se detectaron pequeños grupos de células desprendidas de la lámina basal de forma no abrupta con evidencia de núcleos hipercromáticos. Se determinaron los artefactos del procesamiento por comparación con láminas de referencia.

Pérdida de cilias: Se determinó el número de células con ausencia parcial o total del borde ciliado.

Hiperactividad de células caliciformes: Se cuantificó el número de glándulas en el epitelio con la típica forma de cáliz con aumento del volumen células, protrusión hacia la luz del órgano y presencia de mucinas.

Además se determinó la presencia de células de respuesta del sistema inmune dentro de los vasos sanguíneos, infiltrando el tejido en la submucosa, mucosa o solamente en la lamina propia: polimorfonucleares y mononucleares (macrófagos y linfocitos), eventos microcirculatorios con presencia de eritrocitos en la luz de los vasos o en el tejido, producción de moco evidenciada como una sustancia eosinofílica a hialina en la luz del órgano asociada a la actividad de células caliciformes.

4.2.2 Inóculos bacterianos

La inoculación de los explantes de cornete se realizó en condiciones totales de asepsia utilizando varios tratamientos en diferentes días de experimentación.

Obtención de suspensiones celulares: Con el fin de probar el efecto de los sobrenadantes en las células bacterianas completas de *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* o un co-cultivo y en la producción de sus factores de virulencia, se obtuvieron 10 ml de suspensiones celulares en tubos de 50 ml con CTS. Estas fueron incubadas por 30 horas a 37°C en agitación a 150 r.p.m. Los cultivos se incubaron hasta el inicio de la fase exponencial de la curva de crecimiento de cada bacteria momento en el cual se aplicaron los tratamientos descritos en la tabla 3 a los cornetes mantenidos en condiciones asépticas. Los explantes fueron inoculados con 1×10^7 UFC/ml (**Gallego & Iregui, 2006**). En el caso del co-cultivo, se estimó la cantidad de células de *P. multocida* y *B. bronchiseptica* utilizando agares selectivos para cada cepa. Se llevaron a cabo antibiogramas con las cepas, inoculandolas en agares LB suplementados con diferentes antibióticos a concentraciones finales de 20 o 80 µg/ml (kanamicina, estreptomycin, gentamicina, azitromicina, ampicilina). Se inocularon dos tubos con 10ml de caldo LB con

las cepas *P. multocida* y *B. bronchiseptica* y se incubaron hasta una OD_{600nm} : 0,5. Posteriormente estos dos inóculos fueron transferidos simultáneamente a 500 ml de caldo LB e incubados hasta la fase estacionaria, tomando algunas alícuotas en diferentes densidades ópticas. A una OD_{600nm} : 0,01 se tomaron 100 μ l del co-cultivo y se hicieron diluciones seriadas en 900 μ l de solución salina hasta alcanzar la dilución 10^7 . Las diluciones fueron sembradas en agar LB suplementado con estreptomycin (80 μ g/ml) para conteo celular de *B. bronchiseptica*, estimando 4×10^5 UFC/ml de la bacteria y en agar LB *P. multocida* estimando 13×10^4 UFC/ml de la bacteria.

A una OD_{600nm} : $0,320 \pm 10$ se tomaron alícuotas, se diluyeron y se sembraron como se describió anteriormente y se estimaron 30×10^6 UFC/ml de *P. multocida* y 30×10^7 UFC/ml de *B. bronchiseptica*. A densidades ópticas más altas, las células fueron incontables.

Obtención de sobrenadantes bacterianos: Para probar el efecto de los sobrenadantes en la virulencia de las bacterias, *P. multocida*, *B. bronchiseptica* o un co-inóculo de ambas fueron sembradas en 10 ml de CST e incubadas durante 30 horas a 37°C en agitación a 150 r.p.m hasta alcanzar una OD_{600} : 1,8. Las células bacterianas fueron removidas del medio centrifugando 3 veces sucesivas 15000 rpm por 45 minutos y filtradas a través de membranas de nitrocelulosa de 0,45 y 0,22 μ m de diámetro de poro.

Obtención de sobrenadantes inactivados: Para poder descartar la actividad enzimática extracelular remanente de las dos bacterias, los sobrenadantes de *P. multocida* *B. bronchiseptica* o de un coinóculo de ambas bacterias fueron expuestos a una temperatura de 100°C por 20 minutos. Esta temperatura está por encima de la temperatura de desnaturalización (cerca de las 60 °C) de las toxinas de cada uno de estos dos microorganismos (Pratt et al, 2000).

Suspensiones celulares estimuladas con sobrenadantes: Para verificar el efecto de los sobrenadantes sobre la virulencia de cada bacteria se estimularon cultivos celulares de la bacteria con el sobrenadante de su contraparte (ver el apartado sobrenadantes bacterianos). Para esto, se inoculó CST con *B. bronchiseptica* y al inicio de la fase exponencial de crecimiento de la bacteria se aplicó el sobrenadante obtenido de *P. multocida* en proporción 1:10 y se incubó a 37°C hasta completar 30 horas en agitación a 150 rpm. Este mismo procedimiento se llevó a cabo con el cultivo líquido de *P. multocida* el cual se estimuló con el sobrenadante de *B. bronchiseptica* de la forma descrita

anteriormente. Se aplicó al cornete la cantidad de tratamiento suficiente para cubrir toda su superficie (1 ml de inóculo por cada 5 ml de medio de cultivo de los cornetes - DMEM)

Tabla 3. Tratamientos aplicados a los explantes de cornete cultivados *in vitro*

Tratamiento	Numero de cornetes	Condiciones de incubación	Controles
Suspensión celular de <i>P. multocida</i> únicamente	6	4 h en DMEM a 37°C sin agitación y 5% [CO ₂]	(+): Lámina de lesión por cada bacteria (-): Explante en DMEM
Suspensión celular de <i>B. bronchiseptica</i> únicamente	6	4 h en DMEM a 37°C sin agitación y 5% [CO ₂]	(+): Lámina de lesión por cada bacteria (-): Explante en DMEM
Suspensión celular de <i>P. multocida</i> pre estimulada con el sobrenadante de <i>B. bronchiseptica</i>	6	4 h en DMEM a 37°C sin agitación y 5% [CO ₂]	(+): Lámina de lesión por cada bacteria (-): Explante en DMEM
Suspensión celular de <i>B. bronchiseptica</i> pre estimulada con el sobrenadante de <i>P. multocida</i>	6	4 h en DMEM a 37°C sin agitación y 5% [CO ₂]	(+): Lámina de lesión por cada bacteria (-): Explante en DMEM
Suspensión celular de <i>P. multocida</i> pre estimulada con el sobrenadante de <i>B. bronchiseptica</i> sometido a 100°C	6	4 h en DMEM a 37°C sin agitación y 5% [CO ₂]	(+): Lámina de lesión por cada bacteria (-): Explante en DMEM
Suspensión celular de <i>B. bronchiseptica</i> pre estimulada con el sobrenadante de <i>P. multocida</i> sometido a 100°C	6	4 h en DMEM a 37°C sin agitación y 5% [CO ₂]	(+): Lámina de lesión por cada bacteria (-): Explante en DMEM

4.2.3 Análisis Histopatológico con Hematoxilina y Eosina (H&E)

Para detectar los cambios asociados con la inoculación de las bacterias se realizó un análisis de histopatología en el cual se obtuvo una proporción relativa del número de células que presentaron algún cambio morfológico. Después de finalizar el tiempo de incubación de cada tratamiento, los explantes fueron fijados en una solución de formalina al 10% durante 24 horas. Cada explante fue procesado en el laboratorio interfacultades de microscopía en la Universidad Nacional de Colombia. Allí cada ejemplar fue embebido en una matriz de parafina y procesado haciendo cortes de 5 µm de espesor al micrótopo y teñido con las tinciones acidófila y basófila hematoxilina y eosina (H&E) para diferenciar

núcleos, morfología celular y la presencia de moco y detritus celulares. Luego se aplicó una solución de Xilol para eliminar los residuos de parafina en el corte. Cada corte fijado a la lámina fue deshidratado con concentraciones ascendentes de etanol (50%, 80% y 100% de etanol). Luego los cortes fueron sometidos a la tinción de hematoxilina (10 minutos) y eosina (30 segundos). Finalmente las muestras fueron lavadas con abundante agua y sometidas a soluciones de concentraciones ascendentes de etanol (70%, 95% y 100%) haciendo un último baño de Xilol antes de incluir el cubreobjetos.

Se realizó la determinación de los cambios celulares producidos durante la aplicación de los diferentes tratamientos, haciendo un análisis histológico al microscopio óptico. Se evaluaron en total 6 experimentos por triplicado en los cuales se llevó a cabo un conteo de las células en 8 campos ópticos por experimento (60 células por campo aproximadamente) y anotando datos de interés en una matriz de datos en Excel diseñada por la Microbióloga Magda Carrillo del grupo de patobiología veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia (**Carrillo et al, 2011**). Posteriormente se llevaron a cabo las comparaciones de los hallazgos con lo reportado para esta patología en **Equinas, 2007**; **Gallego, 2006**. Dentro de este análisis se llevó cabo el conteo y descripción de:

1. Porcentaje relativo de células muertas (picnosis, células descamadas, apoptosis, muerte celular),
2. Porcentaje relativo de células epiteliales vacuolizadas con reporte de cambios morfológicos
3. Porcentaje relativo de espacios entre células epiteliales y su morfología
4. Porcentaje relativo de bacterias adheridas al epitelio,
5. Porcentaje relativo de pérdida de homogeneidad
6. Descripción de polimorfonucleares y mononucleares en la submucosa,
7. Porcentaje relativo de pérdida de vellosidades y cilios
8. Liberación de productos extracelulares

4.3 Evaluación de Factores de Virulencia

Se evaluó el efecto de los sobrenadantes de medio de cultivo de cada bacteria sobre la producción de factores de virulencia (tabla 3). Para esto se utilizaron dos tipos de ensayo: semicuantitativo y en caja de petri. Los factores de virulencia a evaluar corresponden a los reportados por varios autores (**Wretlind & Wadström, 1977, Pratt et al, 2000, Bosch et al, 2002, Carvalho et al, 2009**).

4.3.1 Ensayos en caja de Petri con líquido incorporado:

Todos los ensayos en caja de Petri se realizaron siguiendo protocolos descritos previamente. Para obtener los sobrenadantes de medio de cultivo bacteriano las cepas fueron inoculadas en medio LB líquido e incubadas a 37°C a 150 r.p.m hasta el inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Posteriormente las células fueron removidas por centrifugación a 15.000 r.p.m por 45 minutos y los sobrenadantes fueron filtrados en membranas de nitrocelulosa de 0,45µm de diámetro de poro. El sobrenadante de medio de cultivo de *P. multocida*, *B. bronchiseptica* o un co-cultivo de ambas bacterias fue incluido en agar suplementado con el sustrato adecuado para llevar a cabo el ensayo por el método de incorporación en fondo. En cada caja se incluyó un control de esterilidad y se llevaron a cabo tres ensayos por tratamiento.

El ensayo de **proteólisis** se llevó a cabo en agar LB suplementado con leche descremada al 10% (**Dow et al, 1990**). El medio consistió en una primera capa de delgada de LB y luego la superposición de LB mezclado con la leche descremada. El pH del medio fue ajustado a 7.6 con HCl 1 M. Por su parte cada bacteria fue inoculada en discos de papel Whatman No 3 después de realizar un pre-inóculo en 10ml caldo LB o CST e incubada por 30h a 150 rpm y 37°C. Los discos se inocularon con 5 µl del cultivo bacteriano. Como control positivo de proteólisis se usó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Un resultado positivo se evidencia como un halo transparente alrededor del disco impregnado con bacteria o incluso un halo de precipitación blanco no uniforme. En el resultado negativo se observa el agar leche sin ningún cambio.

El ensayo de **lipólisis** se llevó a cabo en agar LB sin adicionar extracto de levadura y suplementando con CaCl₂ y ajustando el pH pH 7.6 (**Lonon et al, 1988**). Cada bacteria fue pre-inoculada en 10ml de medio LB líquido suplementado con Tween 20 o Tween 80 (10%). Al no observar actividad en Tween 20 en los ensayos preliminares, se seleccionó

Tween 80 como sustrato. Los cultivos líquidos fueron incubados por 30h a 150 rpm y 37°C. Posteriormente se inocularon discos de papel como se describió anteriormente. El resultado positivo se observa como un precipitado blanco por debajo del disco impregnado con bacteria. En algunos casos se ve este precipitado difundido a buena parte del agar.

El ensayo de **hemólisis** se hizo en cajas de agar soya y tripticasa (**AST**) suplementado con 5% de eritrocitos desfibrinados de ovejo manteniendo el pH del medio en 7.0. Las bacterias se pre-inoculaban en CST 30h antes del experimento. Se registró el diámetro del halo de degradación de eritrocitos dando calificación de inducción, inducción leve y no inducción. El resultado positivo se observa como un halo de alfa o beta hemólisis (halo café o halo transparente respectivamente)

El ensayo en caja de **motilidad**, consistió en incorporar los sobrenadantes bacterianos a probar en cajas de 5ml de agar semisólido (concentración final 0,7%) e inocular el medio con colonias bacterianas con un palillo de madera o con discos de papel inoculados con las bacterias sembradas en caldo LB 30h antes del ensayo. Se registraron los cambios en los patrones de motilidad teniendo en cuenta el aumento o disminución en la misma y se comparó con el patrón de motilidad tipo *swarming* observado en la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

4.3.2 Ensayos semicuantitativos de factores de virulencia

LIPASA (Pratt et al, 2000): La actividad de las enzimas lipolíticas de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* fue determinada turbidimétricamente utilizando tres sustratos diferentes: sorbitanos de polioxietileno (Tween 20 y 80) y Tributirina. De estos tres ensayos se encontró que el sobrenadante de medio de cultivo de *P. multocida* tuvo muy baja actividad lipolítica con Tween 20 y Tributirina y el sobrenadante de *B. bronchiseptica* no tuvo actividad sobre estos dos. Utilizando como sustrato Tween 80, ambas bacterias presentaron una buena actividad lipolítica determinada turbidimétricamente con lo cual se seleccionó esta sustancia para los experimentos posteriores en concordancia con lo reportado por Pratt et al/ en 2000. Después de aplicar los tratamientos en las combinaciones descritas en la tabla 3, las células bacterianas sembradas en CST fueron eliminadas centrifugando por 45 minutos a 15000 rpm y filtrando al vacío con membrana de nitrocelulosa de 0.45µm de diámetro de poro. 500µl

del sobrenadante fueron mezclados con 0.1ml de Tween 80 al 10% en 50mM Buffer Tris-HCl (pH 7.6), 0.1 ml de CaCl_2 1M en Buffer Tris-HCl pH 7.6 y 2,3 ml de Buffer Tris-HCl pH 7.6. La mezcla fue incubada por 2 h en un baño de agua a 37°C. En este ensayo, Tween 80 (éster del ácido laurico) es hidrolizado para producir un residuo de ácido graso y un alcohol. En presencia de Calcio, se forma la sal insoluble del ácido graso, dando un precipitado cuya turbidez puede ser medida a 410 nm en un lector de placas de microtitulación. Las mediciones se realizaron por triplicado. Una unidad de actividad lipasa será tomada como un aumento de 0.01 en la densidad óptica comparado con el control.

PROTEASA (Wretlind & Wadström, 1977): Se midió la actividad proteolítica de las enzimas de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* con una técnica turbidimétrica usando caseína desnaturalizada como sustrato. 0,2 ml de sobrenadante de cada tratamiento hecho fueron añadidos a 4 ml de una mezcla de Caseína 10% (p/v) en Buffer de proteólisis (0,05 M de fosfato de Sodio pH 7.4 suplementado con CaCl_2 1mM). Este ensayo fue incubado por 30 minutos a 37°C. La reacción fue terminada añadiendo 3 ml de ácido perclórico 1 M. Después de centrifugar a 15000 r.p.m por 30 minutos, el *pellet* fue resuspendido en buffer Tris-HCl pH 7.6 y cuantificado en un lector de placas de microtitulación a 620 nm. Una unidad de actividad fue definida como un incremento de 1.0 en la densidad óptica cada 30 minutos.

HEMOLISIS (Carvalho et al, 2009): La actividad hemolítica en cultivos de *B. bronchiseptica* y *P. multocida* se analizó utilizando los sobrenadantes de los tratamientos descritos en la tabla 3. La mezcla de reacción consistió en una suspensión de bacteria en Buffer de Hemolisina (5ml de MgCl_2 20mM en PBS 10X) y eritrocitos de oveja al 5%. Los tubos fueron incubados en baño termostático a 37°C por 90 minutos. Las bacterias y los eritrocitos lisados fueron removidos por centrifugación, y la solución remanente fue medida a 520 nm en un lector de placas de microtitulación. El porcentaje de hemólisis fue calculado dividiendo la absorbancia de cada sobrenadante tomado de cada tratamiento sobre el valor de la absorbancia del control positivo (eritrocitos lisados en agua destilada).

ADSORCIÓN DE HEMOGLOBINA A PROTEINAS DE MEMBRANA POR *P. multocida* (Bosch et al, 2002): El análisis cuantitativo de la adsorción de hemoglobina por *P. multocida* fue llevado a cabo usando una suspensión celular de la bacteria previamente tratada con las sustancias mencionadas en la tabla 3. Ya que la adsorción de

la hemoglobina por las proteínas de superficie de *P. multocida* requiere que la célula esté completa, estos cultivos no se filtraron. 10 ml de la suspensión de *P. multocida* con cada tratamiento fueron centrifugados y resuspendidos en buffer acetato 50mM (pH 6.0). Se tomaron 7.3 ml de la suspensión y se mezclaron con 2.7 ml de eritrocitos lisados en agua desionizada. La mezcla fue incubada a 37°C por 2 y 4 h y la actividad fue determinada como un descenso en la absorbancia a 410 nm.

4.4 Evaluación de la producción de *N*-acil homoserín lactonas por medio de biosensores bacterianos

Para detectar la posible presencia de *N*-acil homoserín lactonas (**AHLs**) en cultivos de las bacterias en estudio se llevó a cabo la metodología descrita por Shaw en 1997 y utilizada por Pardo Roa en 2007 en la cual se utilizan cepas biosensoras de AHLs (**Shaw et al, 1997; Pardo-Roa, 2007**). Básicamente, un biosensor de AHLs es una cepa bacteriana con la cual es posible detectar la presencia de alguna de estas moléculas de señalización de Gram negativas (**Huber et al, 2001**).

4.4.1 Extractos de medio de cultivo:

Se llevó a cabo la extracción de moléculas de señalización tipo AHL de los sobrenadantes de medio de cultivo de *P. multocida*, *B. bronchiseptica* o un co-cultivo de ambas. 250 ml de caldo LB fueron inoculados con 5ml de un pre-inóculo de *P. multocida*, *B. bronchiseptica* o un co-inóculo de ambas bacterias, también se extrajeron AHLs de cultivos de *P. putida* IsoF (cepa WT), *P. putida* IsoF117 (Mutante isogénico incapaz de producir AHLs) y de *P. aeruginosa* PAO1. Los medios líquidos fueron centrifugados a 5000 rpm por 40 minutos y filtrados al vacío en membranas nitrocelulosa de 0,65, 0,45 y 0,22 μ m de poro. Posteriormente estos sobrenadantes fueron sometidos a doble extracción con acetato de etilo acidificado con ácido fórmico al 0,5% aplicando una proporción 1:1 (medio de cultivo: acetato de etilo) o doble extracción con diclorometano (Scharlau, España) mezclando proporciones 2.5:1 (medio de cultivo: diclorometano). Se recuperó la fase orgánica y se concentró la muestra por rota evaporación durante ~2 horas a 70°C y 70 rpm. Los extractos fueron almacenados a 4°C (**Pardo-Roa, 2007**). En otros experimentos, 500ml de LB líquido inoculado con *P. multocida*, *B. bronchiseptica* o un co-cultivo de ambas bacterias, a una OD_{600nm}: 1,8, fueron extraídos con 500ml de

diclorometano en un sistema de extracción de flujo continuo, por 48 horas (extracto superconcentrado). El extracto fue recuperado por rotaevaporación a 40°C. Este mismo tipo de extracción en sistema de flujo continuo, fue hecha con medios tratados con 10µl de extracto en acetato de etilo, de sobrenadante de medio de cultivo de cada bacteria e inoculados posteriormente con *P. multocida* o *B. bronchiseptica* (cultivo condicionado)

4.4.2 Ensayos en caja:

Los biosensores se utilizaron en dos tipos de ensayo en caja de Petri. En el **primer** tipo de ensayo, cada bacteria se sembró en forma de estría perpendicular a una estría del biosensor seleccionado. Este ensayo fue complementado con una prueba similar en la que la bacteria también se enfrentó al biosensor pero esta vez sembrando de forma masiva una gran cantidad de bacteria y una estría de biosensor con el fin de detectar menores cantidades de AHLs producidas por las bacterias , como se muestra en la figura 7.



Figura 7. Esquema de bioensayos en caja de Petri con biosensores bacterianos de AHLs.

Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. La distancia de separación de las estrías es de aproximadamente 5 mm.

En el **segundo** tipo de ensayo se utilizaron los extractos de medio de cultivo de las bacterias las bacterias obtenidos con diclorometano. En este procedimiento, 2.5 ml de medio líquido apropiado fueron inoculados con cada uno de los biosensores e incubados por 24 horas a la temperatura optima de crecimiento del biosensor y a 150 r.p.m. Posteriormente este preinoculo fue adicionado a 22.5 ml medio de cultivo semisólido (0,7% de agar) homogenizando por agitación suave hasta solidificar. Luego, discos de papel Whatman de 5mm de diámetro fueron impregnados con 5, 10 y 15 µl del extracto de medio de cultivo de la cepa a probar y fueron dispuestos en la caja de Petri dejando espacio suficiente para ver la inducción del fenotipo reportero, como se muestra en la figura 8

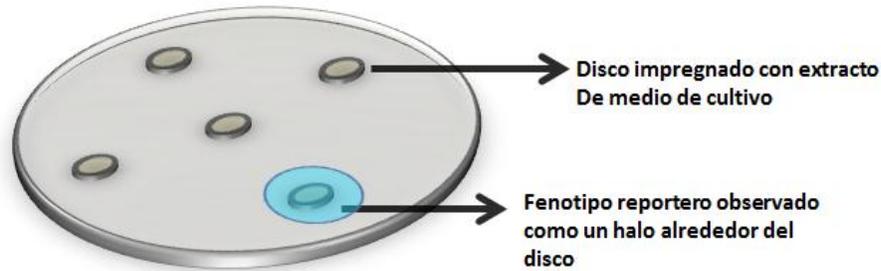


Figura 8. Esquema de bioensayo en caja de Petri con biosensores bacterianos de AHLs y los extractos de sobrenadante de medio de cultivo de *P. multocida*, *B. bronchiseptica* o un co-cultivo. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

4.4.3 Cromatografía en capa delgada:

Los extractos obtenidos de cada uno de los cultivos mencionados anteriormente fueron separados por medio de una cromatografía en capa delgada (CCD) para AHLs de diferente estructura o moléculas similares a estas. Aproximadamente 10 μ l del extracto resuspendido en acetato de etilo fueron sembrados en la base de un cromatofolio silica gel RP-18 (Merk Inc, Alemania) de 20 cm x 20 cm. La separación se llevó a cabo en una cámara de cromatografía saturada con 200 ml de una mezcla Metanol-agua en proporciones 60:40 hasta que el frente de corrido llegara a los 2 cm anteriores al tope del cromatofolio

Paralelamente, se llevó a cabo un pre inóculo en 20 ml de medio apropiado (LB o medio ABG) con cada uno de los biosensores a probar (una cepa biosensora para AHLs de diferente estructura como se muestra en la tabla 4). La densidad óptica del medio de cultivo del biosensor se ajustó a 1,2 y se transfirió a 180ml de agar semisólido estéril (0,7% concentración final). Finalmente el agar semisólido inoculado con el biosensor previamente cultivado se en el cromatofolio con los extractos de medio de cultivo, en cajas de acrílico de 40cm x 40cm de lado. El cromatofolio se cubrió con una capa delgada del agar inoculado (no más de 5mm de grosor) dejándolo caer suavemente sobre la placa, usando una pipeta estéril.

Tabla 4. Biosensores utilizados en el proyecto y moléculas que detectan

Biosensor	Fenotipo	AHL que detecta
<i>Escherichia coli</i> pSB 403 , <i>E. coli</i> pSB 401	Bioluminiscencia	C6-3-oxo-AHL C6-AHL , C8-3-oxo-AHL , C8-AHL
<i>E. coli</i> pSB 1075	Bioluminiscencia	C-12-3-oxo-AHL , C10-3-oxo-AHL , C-12-AHL
<i>Chromobacterium violaceum</i> C.V.O26	Pigmento violeta	C-6-AHL , C6-3-oxo-AHL , C8-AHL , C8-3-oxo-AHL , C4-AHL
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	β -galactosidasa	C8-3-oxo-AHL , Todas las AHL 3-oxo , C6-AHL, C8-AHL, C10-AHL, C12-AHL , C14-AHL, C6-3-hidroxi-AHL, C8-3-hidroxi-AHL, C10-3-hidroxi-AHL
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm11558(pJNSinR)	β -galactosidasa	C14-3-oxo-AHL , C16:1-3-oxo-AHL, C-16-AHL, C-16:1-AHL, C14-AHL
<i>Xylella fastidiosa</i> 8523(pKLN55)	Proteína verde Fluorescente	DSF
<i>P. putida</i> IsoF117 pAS-C18	Expresión de Proteína Fluorescente verde	C8-AHL , C10-AHL
<i>P. putida</i> IsoF117 (pKR-C12)	Expresión de Proteína Fluorescente verde	C12-3-oxo AHL , C10-3-oxo AHL

Las AHLs para las cuales el biosensor tiene mayor sensibilidad, están marcadas en negrilla (según **Steindler & Venturi, 2007**)

Finalmente los fenotipos inducidos fueron registrados en el digitalizador de imágenes ChemiDoc XT (Biorad, USA). En este bloque experimental se usaron cepas productoras de las AHLs que cada biosensor reconoce, como controles positivos.

4.5 Identificación de grupos de similaridad

Con el fin de encontrar patrones de respuesta del tejido epitelial al estímulo con las bacterias en sus diferentes combinaciones, los datos obtenidos en la experimentación con explantes de cornete de conejo se usaron para llevar a cabo un análisis de varianza en un modelo completamente al azar

Se propuso la hipótesis nula $H_0 =$ al menos un sobrenadante bacteriano tiene efecto sobre la aparición de cambios morfológicos en el epitelio nasal de cornete y la hipótesis alternativa $H_1 =$ ninguno de los tratamientos tiene efecto sobre la aparición de cambios morfológicos en el epitelio nasal de cornete

El planteó el modelo $Y_{ij} = \mu_{ij} + \tau_{ij} + \epsilon_{ij}$ en donde:

Y_{ij} : representa la observación j -ésima del i -ésimo tratamiento

μ_{ij} : representa la media de la observación j -ésima en el i -ésimo tratamiento

τ_{ij} : representa el efecto del tratamiento en la j -ésima observación del i -ésimo tratamiento

ϵ_{ij} : representa el error experimental j -ésimo observación en el i -ésimo tratamiento

Se probaron los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad con las pruebas de Levene y Shapiro-Wilks respectivamente. Todas las observaciones menos el número de células descamadas cumplieron los supuestos del modelo. Para agrupar los resultados según su similaridad se usaron las pruebas de pares de medias LSD y Tukey HD.

Se descartaron las respuestas de algunos tratamientos, por no cumplir alguno de los supuestos del modelo (homogeneidad de varianzas y normalidad) y con ellos se construyó la tabla en la cual, los grupos de similaridad aparecen representados.

5 CONSIDERACIONES ETICAS

Todos los experimentos realizados con animales están avalados por el comité de ética de la facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Los protocolos utilizados en este trabajo se ciñen a los lineamientos del comité y se enmarcan en el proyecto “*Aproximación ecológica al estudio de las infecciones respiratorias*” avalado por Colciencias.

6 RESULTADOS

6.1 CAMBIOS HISTOLÓGICOS DETECTADOS DURANTE LOS TRATAMIENTOS *in vitro* E INFLUENCIA DE LOS SOBRENADANTES EN LA VIRULENCIA DE *Pasteurella multocida* Y *Bordetella bronchiseptica*

Se realizaron 3 bloques de experimentación que consistieron en aplicar tratamientos con mono y co-cultivos de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* utilizando un organocultivo de cornete de conejo gnotobiótico. Los resultados de diagnóstico se dividieron en dos partes. Los primeros son hallazgos descriptivos en los que se observan patrones característicos de la enfermedad de forma general y aquellos cambios celulares que son indicadores de patología y cuya estimación es un procedimiento rutinario estandarizado por el Grupo de Patobiología Veterinaria, dirigido por el profesor Carlos Iregui. Estos cambios son: muerte celular, cambio hidrópico o vacuolización, descamación del epitelio, espacios intercelulares e hiperplasia de células caliciformes.

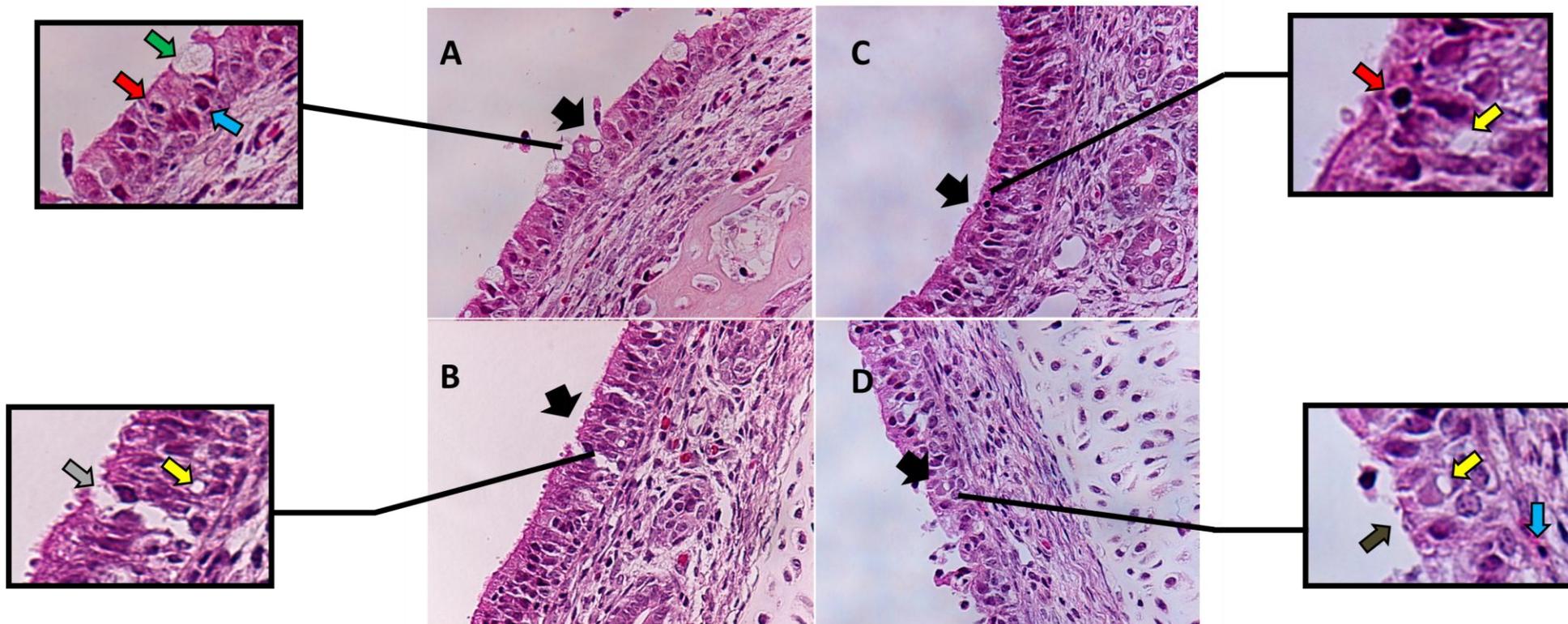


Figura 9. Detección del tipo de cambios celulares asociados a los tratamientos con *P. multocida* y/o *B. bronchiseptica*. Los campos observados se analizaron en un aumento de 1000 veces (100x) recorriendo el borde óseo del septo nasal desde la zona ventral del cornete hasta completar 8 campos . **A.** *B. bronchiseptica*. **B.** *P. multocida*. **C.** *P. multocida* con sobrenadante de *B. bronchiseptica*. **D.** *B. bronchiseptica* con sobrenadante de *P. multocida* Las flechas indican según su color: Azul – muerte celular y picnosis. Gris – Dilatación de espacios interepiteliales. Amarillos – Vacuolización intracitoplasmática. Café – Pérdida de cilias. Rojo – Infiltrado inflamatorio. Verde – célula caliciforme hiperplásica.

Entre los cambios descriptivos se cuentan la aparición de células inflamatorias y de respuesta inmune, presencia de materiales extracelulares en el ápice de algunas células, eventos microcirculatorios tales como secuestro de células en los vasos sanguíneos e infiltración, eventos celulares anormales reportados en casos de rinitis atrófica degenerativa como la formación de quistes, megalocitosis y necrosis. El análisis global de estas observaciones muestran la infiltración de células blancas, tanto polimorfonucleares (PMN) como mononucleares (MN) e incluso infiltrado mixto (PMN y MN al tiempo) en todos los tratamientos aplicados menos en el control (explante en medio de cultivo únicamente). Aunque el mecanismo de migración de las células del sistema inmune en el tejido no irrigado es aun desconocido, puede considerarse un cambio importante en los recuentos celulares. Esta parece ser una reacción característica del órgano durante la perturbación que se genera después de la extracción del explante y se puede observar con mayor severidad cuando se aplica un cultivo de *P. multocida* pre-estimulado con el sobrenadante de medio de cultivo de *B. bronchiseptica*. Existen varias hipótesis sobre la señalización entre la bacteria y el epitelio que soportan esta observación en varios modelos *in vitro* principalmente el estímulo de la migración de células blancas por moléculas producidas por la bacteria **(Kahle et al, 2012)**. Se reporta la aparición de un material café en el ápice de células caliciformes y en algunas células del epitelio cilíndrico pseudoestratificado (EPC) principalmente en el tratamiento con *Pasteurella* estimulada con el sobrenadante de *Bordetella* y también la producción de una abundante cantidad de moco después de aplicar el tratamiento que consta de un cultivo de *B. bronchiseptica* estimulado con el sobrenadante de *P. multocida*. Un fenómeno importante reportado en este trabajo es la vacuolización de las células basales que soportan el epitelio, el cual se ha visto en otro experimentos *in vitro* **(Al-haddawi, 1999)**. También se detectó megalocitosis en algunos de los experimentos en los que se inoculó el explante con células de *Bordetella*, probablemente como resultado de la actividad hemolítica *in vitro*. Algunos de los eventos vasculares más importantes encontrados fueron el secuestro de células blancas en vasos sanguíneos en el tratamiento con un co-cultivo de ambas bacterias, con lo cual se corrobora el gran efecto que tiene la inoculación simultánea de estas dos bacterias sobre la permeabilidad vascular en los vasos de la concha nasal **(Magyar & Lax, 2002)**. Se encontró además la vacuolización de células basales sobre la *lamina propria* principalmente en los tratamientos con *P. multocida*. En la tabla 5 se

muestra un resumen del tipo de cambios detectados tras la inoculación de los explantes con las bacterias solas o previamente estimuladas con sus sobrenadante

Tabla 5. Histopatología general de explantes de cornete de conejo inoculados con *Pasteurella multocida* y/o *Bordetella bronchiseptica*

Indicador de patología	Solo <i>Pasteurella</i>	Solo <i>Bordetella</i>	<i>Pasteurella</i> + [<i>Bordetella</i>]	<i>Bordetella</i> + [<i>Pasteurella</i>]	Cocultivo
Infiltrado Polimorfonuclear	-	Mucosa	-	-	-
Infiltrado mixto	Mucosa	-	Lámina propia y submucosa	Lámina propia y submucosa	Lámina propia y submucosa
Bacterias			-	-	
Materiales celulares	-	-	Material café no identificado	Abundante moco	-
Vacuolas en células basales		-	-	-	-
Cambios morfológicos celulares	-	-	-	Quistes epiteliales	-
Detritos	-	-	-	-	
Eventos micro circulatorios	-	Megalocitosis	-	-	Secuestro de células en vasos sanguíneos

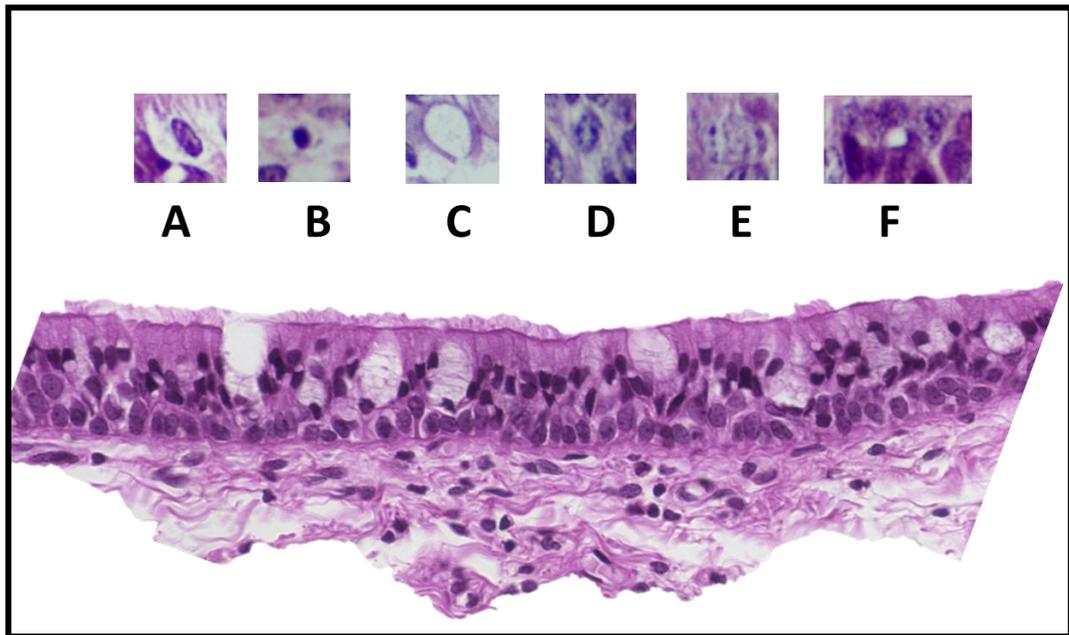
Se observaron diferentes eventos de perturbación por la inoculación con *P. multocida*, *B. bronchiseptica*, un coinóculo y los sobrenadantes aplicados a los cultivos celulares de bacterias. Se muestran en colores la presencia (colores purpura, vino tinto, naranja, verde, amarillo, azul, crema o rojo) o ausencia (color gris) de cada uno de los cambios en 3 de las repeticiones de los experimento en donde se contaron no menos de 1200 células. Al interior de los recuadros con presencia de cambio se reporta la descripción de la observación

El segundo grupo de cambios celulares fue determinado en valores del porcentaje promedio de células con algún signo morfológico indicador. Por ejemplo, la muerte celular en la tinción de hematoxilina y eosina se presenta como una serie de múltiples cambios morfológicos del núcleo y cubre gran cantidad de mecanismos que llevan a esos cambios y en muchas ocasiones es difícil discernir entre uno y otro tipo de cambio. Un caso particular es el de las células picnóticas típicas de algunos estados de necrosis en las que

se presentan núcleos pequeños confinados a espacios discretos en el citoplasma de las células eucarióticas y en el epitelio respiratorio se muestran como masas hiper Cromáticas basófilas que se reducen de tamaño debido entre otras cosas, a la pérdida de agua de la célula. Las células apoptóticas se reconocen por la fragmentación del núcleo en un sector discreto de la célula y es también un indicador de patología. En la tabla 6 se muestran los resultados de células con todos los tipos morfología celular asociada a necrosis, que sirvieron como guía para la identificación en todos los tratamientos.

Otros indicadores de patología asociados a cambios morfológicos celulares fueron detectados en los explantes cultivados *in vitro*. Las células descamadas se presentan como pequeños grupos (incluso solamente células individuales) separados de la lamina basal y que se pueden ver en la luz del órgano, asociadas a la producción de moco y algunos detritus celulares. La vacuolización intracitoplasmática o cambio hidrópico se presenta también como la aparición de pequeñas vesículas que dan un aspecto granuloso al citoplasma, el cual se torna eosinófilo.

Tabla 6. Cambios morfológicos celulares indicadores de patología en explantes de cornete de conejo



Los cambios detectados fueron determinados por Hematoxilina y Eosina. Las imágenes son el resultado de análisis histopatológico en microscopia de luz en 100x. A: Célula sana. B: Célula picnótica. C: Célula caliciforme activa. D: Cariorrexis. E. Cariolisis. F. vacuolización intracitoplasmática y dilatación de espacios interepiteliales

En el tratamiento de *B. bronchiseptica* estimulada con el sobrenadante de *P. multocida* se encontró un aumento considerable de los espacios interepiteliales y parece ser este uno de los cambios a nivel de la arquitectura del explante que contribuye mayormente al desarrollo de la patología *in vivo* de acuerdo a lo observado en el laboratorio. En el cocultivo la pérdida del borde ciliado y el número de células con picnosis comprueban la existencia de una acción sinérgica entre ambas bacterias. Por otra parte se mostró que, en congruencia con otros trabajos, la pérdida de cilias fue mucho mayor en el tratamiento de *P. multocida* estimulada con el sobrenadante de *B. bronchiseptica*. En ese sentido se corroboran las observaciones previas en las que se ha mostrado que *Pasteurella* es un pobre colonizador del tracto respiratorio (Jacques et al, 1988) pero que en presencia de *B. bronchiseptica* aumenta su capacidad de adhesión al epitelio y también la expresión de algunas moléculas de virulencia que permite destruir el borde ciliado y dar paso a la internalización en la célula eucariota (Cowart et al, 1989).

Porcentajes relativos de cambios celulares observados en explantes de cornete

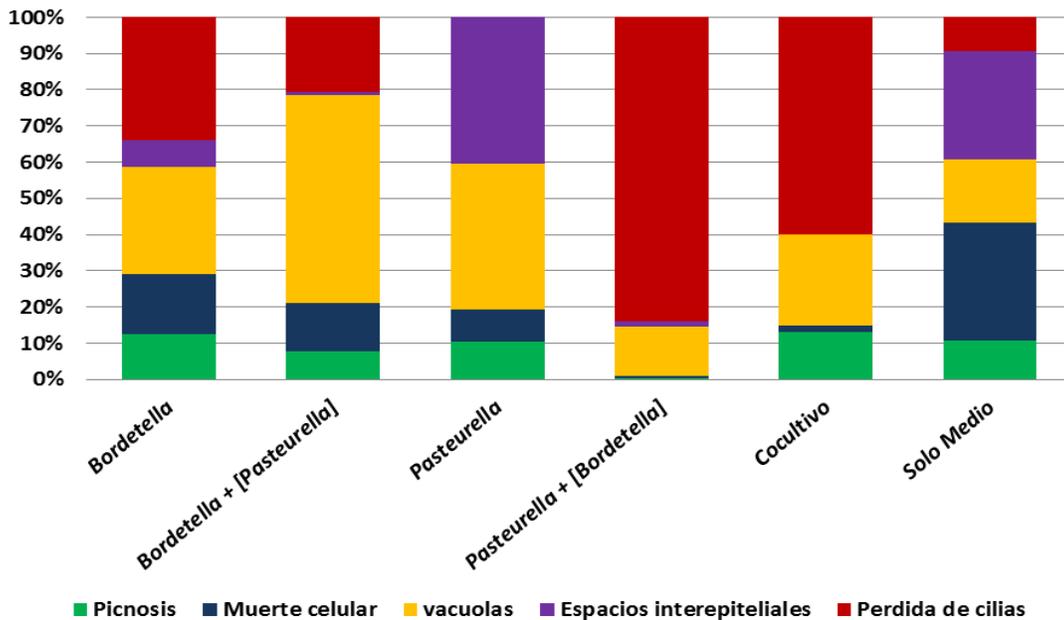


Figura 10. Porcentajes relativos de cambios celulares observados en explantes de cornete cultivados *in vitro*. Se realizaron conteos celulares de los cambios más abundantes como consecuencia de los tratamientos con las bacterias o sus sobrenadantes. Se contaron 16 campos por cada replica y aproximadamente 50 células por campo. En verde se muestra el porcentaje promedio de células picnoticas, en azul el porcentaje de células muertas, en naranja el porcentaje de células con vacuolización intracitoplasmática, en morado en porcentaje de células con espacios interepiteliales dilatados y en rojo las células que han perdido cilias.

En estos experimentos se encontró una distribución heterogénea de los cambios celulares inducidos después de la inoculación con las bacterias. Particularmente en estos experimentos, se observó que los cambios morfológicos celulares que contribuyen en mayor medida a la pérdida de la arquitectura del epitelio y a la patología en general son la pérdida de cilias (entre el 35 y el 85% del total de los cambios detectados), la vacuolización intracitoplasmática (del 10 al 60% del total de los cambios detectados) y algunos cambios nucleares asociados a muerte celular, como la picnosis. Estos indicadores se vieron mayormente representados en los tratamientos en los que las suspensiones celulares de las bacterias se estimularon con los sobrenadantes de medio de cultivo de sus contrapartes (es decir *Pasteurella multocida* estimulada con el sobrenadante de medio de cultivo de *Bordetella bronchiseptica* y viceversa). Respecto al control con únicamente la bacteria, la pérdida de cilias se vió disminuída en el tratamiento con la suspensión celular de *Bordetella* estimulada con el sobrenadante de *Pasteurella* mientras que en el caso contrario, es decir *Pasteurella* estimulada con el sobrenadante de *Bordetella* se observó un aumento considerable del número de células que perdieron el borde ciliado (**figura 10**). Los tratamientos de las suspensiones celulares con los sobrenadantes de medio de cultivo de las bacterias indujeron la reducción de espacios interepiteliales respecto a los controles de inoculación con únicamente la bacteria aunque en el tratamiento en el que *Pasteurella* se estimuló con el sobrenadante de *Bordetella* se encontró una mayor frecuencia de células con espacios interepiteliales dilatados. La muerte celular provocada por la inoculación con *B. bronchiseptica* pre-estimulada con el sobrenadante de medio de cultivo de *P. multocida* fue mayor que en el tratamiento con *Pasteurella* en presencia del sobrenadante de *Bordetella*. El porcentaje de células picnóticas también se vió reducido cuando las bacterias fueron tratadas con los sobrenadantes de sus contrapartes, mostrando un fenómeno de represión respecto a los controles en los que solo se inocularon las suspensiones celulares de cada bacteria por separado (**figura 10**).

Al analizar los tipos de cambio celular de forma individual se observaron detalles contrastantes. El número de células picnóticas inducidas por la acción de *Bordetella* (1,13%) disminuyó en presencia del sobrenadante de medio de cultivo de *Pasteurella* (0,7%) (**figura 11**). En este mismo tratamiento por el contrario, el número de células vacuolizadas en el citoplasma aumentó (5%) respecto al control (2,54%) indicando una

inducción de la expresión de mediadores de esta respuesta celular en el epitelio (**figura 12**). Además, al someter el sobrenadante de medio de cultivo de *Pasteurella* a una temperatura de 100°C por 40 minutos y aplicarlo sobre la suspensión celular de *Bordetella*, se observó un aumento en los indicadores de patología (picnosis y muerte celular) que aparentemente se reprimieron cuando este sobrenadante de medio de cultivo se aplicó intacto a células de *Bordetella* (**figura 11**).

En el tratamiento con *Pasteurella multocida* pre-estimulada con el sobrenadante de *Bordetella bronchiseptica* el porcentaje de células picnóticas y muertas decreció del 2,93% al 0,23% y del 2,5% al 0,5% respectivamente comparando con el control en el cual se inoculó el explante únicamente con *P. multocida* (**figura 11**). En el tratamiento con *Pasteurella multocida* en presencia del sobrenadante de *Bordetella* también se encontró una leve disminución en el porcentaje de células vacuolizadas en donde el porcentaje celular promedio pasó de ser 11,5% en el tratamiento con solo *P. multocida* a 10,7% cuando la bacteria fue estimulada con el sobrenadante de medio de cultivo de *B. bronchiseptica* (**figura 12**). Este hallazgo sugiere una regulación negativa de la patogenicidad de *Bordetella* por alguna de las moléculas presentes en el sobrenadante de *Pasteurella*. Tras la aplicación del sobrenadante de *B. bronchiseptica* sometido a 100°C a células de *P. multocida* se observó un aumento en la aparición de células picnóticas y muertas únicamente mientras que en los otros indicadores de patología no se encontró efecto. Mientras que en *B. bronchiseptica* se observó constantemente la disminución de la frecuencia de células con cambios morfológicos, en *P. multocida* también se observó la inducción de aparición de algunos cambios celulares en presencia del sobrenadante de su contraparte. Por ejemplo, el número de células con pérdida del borde ciliado en el explante aumentó hasta un 66.8% respecto al control en donde el borde ciliado se encontró intacto. Este resultado sugiere que los factores necesarios para la adhesividad de *Pasteurella* al epitelio nasal se ven aumentados en presencia de moléculas únicamente presentes cuando *Bordetella* se encuentra acompañando a *Pasteurella*. Después de inocular el explante con el cultivo simultáneo de las bacterias, se observó el mismo patrón de disminución de muerte celular y células picnóticas siendo esta una nueva señal de represión de algunas moléculas citotóxicas, por ejemplo algunas enzimas capaces de degradar los componentes de la membrana plasmática y la doble membrana nuclear, por ejemplo algunas lipasas y proteasas.

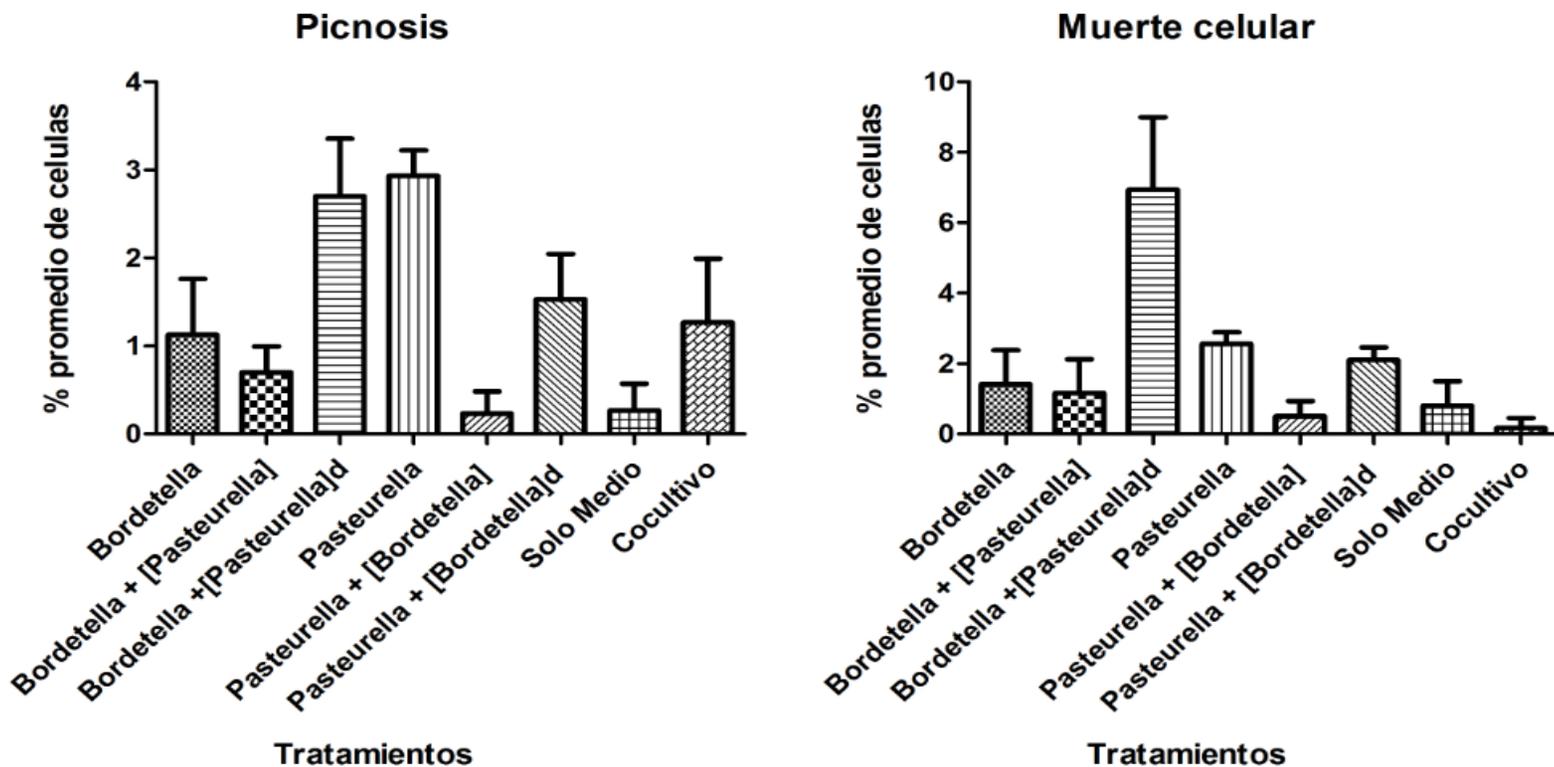


Figura 11. Hallazgo de dos tipos de cambios celulares producidos por la inoculación con *Pasteurella multocida* y/o *Bordetella bronchiseptica*. *Pasteurella*: suspensión celular de *Pasteurella multocida*. [Pasteurella]: sobrenadante de medio de cultivo de *Pasteurella multocida*. *Bordetella*: suspensión celular de *Bordetella bronchiseptica*. [Bordetella]: sobrenadante de medio de cultivo de *Bordetella bronchiseptica*. Los resultados son los porcentajes promedio de 3 experimentos diferentes en los que se valoraron 8 campos ópticos y aproximadamente 1200 células por tratamiento

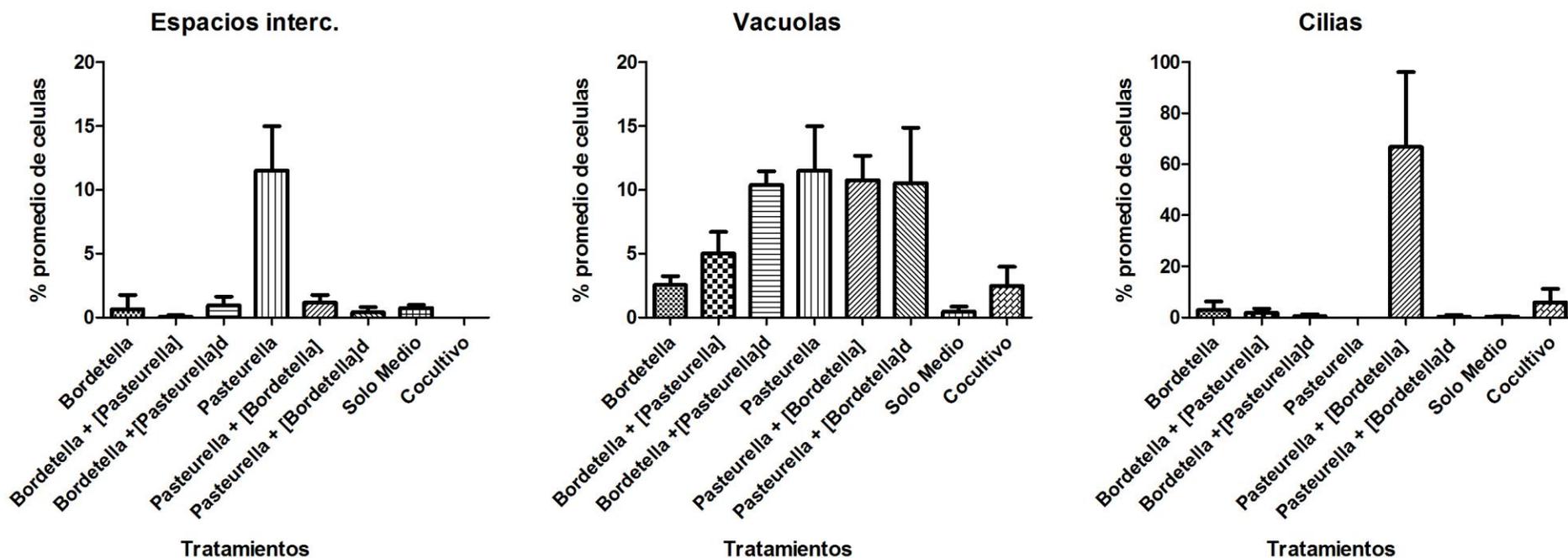


Figura 12. Hallazgos de tres tipos de cambios celulares producidos por la inoculación con *Pasteurella multocida* y/o *Bordetella bronchiseptica*. Pasteurella: suspensión celular de *Pasteurella multocida*. [Pasteurella]: sobrenadante de medio de cultivo de *Pasteurella multocida*. Bordetella: suspensión celular de *Bordetella bronchiseptica*. [Bordetella]: sobrenadante de medio de cultivo de *Bordetella bronchiseptica*. Los resultados son los porcentajes promedio de 3 experimentos diferentes en los que se valoraron 8 campos ópticos y aproximadamente 1200 células por tratamiento

Se llevó a cabo un análisis de varianza para determinar la similaridad o diferencia de la respuesta a algunos de los tratamientos aplicados a los explantes de cornete de conejo bajo un modelo completamente al azar. El análisis sugiere que los tratamientos se comportan de manera heterogénea en algunos parámetros, sin embargo algunas de las respuestas del epitelio a las perturbaciones generadas por la inoculación bacteriana son constantes en todos los grupos de tratamientos.

Al realizar ANOVA para detectar grupos de similaridad se encontró un patrón de agrupamiento de los tratamientos respecto a producción de células caliciformes. Allí, el co-cultivo y la inoculación con *Bordetella* se comportan como un grupo mientras que los tratamientos en los que se estimularon las bacterias con los sobrenadantes de sus contrapartes, se comportan como un grupo diferente con lo cual se corrobora que esta respuesta es diferente y se refleja en una represión de la aparición de glándulas caliciformes ($p=0,0126$, $\alpha =0,01$). Con respecto a otras respuestas del epitelio como la producción de espacios interepiteliales, los tratamientos se comportaron como un solo grupo. Aunque el tratamiento con *Bordetella* y con el co-cultivo tienen las medias más pequeñas, los tratamientos tienen un comportamiento homogéneo y no se evidencia una tendencia de agrupamientos ($p=0,15$, $\alpha=0,01$). Las respuestas de muerte celular se comportaron como 3 grupos diferentes en los que hay una concordancia entre las medias de los tratamientos en que las bacterias fueron sometidas a los sobrenadantes desnaturalizados de sus contrapartes y en los que las bacterias estimuladas con los sobrenadantes de las contrapartes y el co-cultivo también se comportaron de manera similar ($p= 0,0128$, $\alpha=0,01$) (**figura 13**). Esto muestra que las respuestas celulares son congruentes y probablemente el intercambio de señales químicas *in vivo* explica el aumento de la virulencia bacteriana

Los tratamientos que generaron pérdida de cilias en el epitelio nasal de cornete se comportaron como dos grupos distintos en los que la respuesta de *Pasteurella* estimulada con el sobrenadante de *Bordetella* y el co-cultivo formaron un conjunto con medias similares y los tratamientos en los que la suspensión celular de *Bordetella* fue estimulada con el sobrenadante de *Pasteurella* formaron otro conjunto ($p=0,0622$, $\alpha= 0,1$). Los tratamientos que generaron células picnoticas se comportaron como 3 grupos en los que el tratamiento de *Pasteurella* estimulada con el sobrenadante desnaturalizado de *Bordetella* se ubicó de forma independiente en un grupo mientras que el tratamiento con

únicamente *Pasteurella* formó otro grupo. Los otros tratamientos formaron un conjunto diferente en lo que las medias fueron similares. Finalmente los tratamientos que generaron vacuolización intracitoplasmática formaron dos grupos. El primer grupo consta del tratamiento en el que las bacterias fueron estimuladas con el sobrenadante desnaturalizado de su contraparte junto con el tratamiento con únicamente la suspensión celular de *Pasteurella*. El otro grupo que se formó consta de los tratamientos en que las bacterias fueron estimuladas con el sobrenadante no desnaturalizado de medio de cultivo de las contrapartes junto con el co-cultivo y el tratamiento con la suspensión celular de *Bordetella*. En el anexo C se encuentran los ANOVA de todos los tratamientos llevados a cabo en este trabajo

Respuesta	Grupo A	Grupo B	Grupo AB
Células caliciformes activas	Cocultivo <i>Solo Bordetella</i>	P + [B] <i>Solo Pasteurella</i>	B + [P]d B + [P] P + [B]d
Espacios inter-epiteliales	Todos los tratamientos	-	-
Muerte celular	B + [P]d	P + [B]d <i>Solo Pasteurella</i>	<i>Solo Bordetella</i> B + [P] Cocultivo P + [B]
Perdida de cilias	P + [B]	<i>Solo Bordetella</i> B + [P] B + [P]d P + [B]d <i>Solo Pasteurella</i>	Cocultivo
Picnósis	<i>Solo Pasteurella</i>	P + [B]	B + [P]d P + [B]d Cocultivo <i>Solo Bordetella</i> B + [P]

Figura 13. Análisis de varianza y agrupamiento de tratamientos en los cambios morfológicos celulares observados en explantes de cornete de conejo. El análisis de varianza mostró la probabilidad de agrupar al menos dos tratamientos por sus medias. A través del test de comparación de medias LSD (*least significant difference*) se encontraron 3 grupos de respuestas (Células caliciformes: $\alpha=0,01$, $P= 0,0126$.; espacios interepiteliales: $\alpha=0,01$, $P= 0,1505$; Muerte celular: $\alpha=0,01$, $P= 0,0128$; Pérdida de cilias: $\alpha=0,1$, $P= 0,0622$; Picnosis: $\alpha=0,05$, $P= 0,0075$; Vacuolización intracitoplasmática: $\alpha=0,05$, $P= 0,0053$)

6.2 ANALISIS DE LA PRODUCCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA

Se llevó a cabo el análisis producción de algunos determinantes de virulencia que se han reportado como factores involucrados en la patogenicidad de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*. En los ensayos en caja se observó una posible interacción entre las dos bacterias pues la producción de algunas enzimas (específicamente proteasa y hemolisina) se vio aumentada al sembrar un cocultivo de las bacterias en cajas de Petri con los sustratos apropiados. Además se llevaron a cabo ensayos semi-cuantitativos en los cuales se determinaron valores de absorbancia de los productos de la reacción enzimática a longitudes de onda conocidas.

Proteólisis

En primer lugar se analizó la producción de proteasa en caja de Petri. Los resultados que se muestran en la figura 14 comprenden una serie de ensayos en los cuales se incorporó al agar líquido, el sobrenadante de medio de cultivo de cada bacteria por separado y luego se inoculó este agar con la bacteria problema. Como se observa en los ensayos en caja, al sembrar *B. bronchiseptica* en agar suplementado con sobrenadante de *P. multocida*, hay una leve inducción de la producción de proteasas, sin embargo el halo de proteólisis (**figura 14B**) es menor que el de la cepa referencia *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (**figura 14D**). No obstante, en el cultivo mixto de ambas bacterias se encontró una producción mucho más alta de proteasa (**figura 14C**) que no corresponde a la suma de la actividad enzimática de productos individuales de cada célula puesto que en los ensayos con monocultivos (**figuras 14A y 15E**) la actividad enzimática individual fue casi nula, lo cual hace evidente la interacción.

En el caso contrario, es decir *Pasteurella* estimulada con el sobrenadante de medio de cultivo de *Bordetella*, hay una inducción de la producción de proteasas de *P. multocida* (**figura 15G**). La producción de proteasa en este tratamiento fue incluso comparable a la observada en el co-cultivo (**figura 15H**) y en el control positivo (**15I**). Estos resultados sugieren la potenciación de la expresión de enzimas proteolíticas de *P. multocida* al ser estimulada con alguna de las moléculas contenidas en el sobrenadante de medio de *Bordetella*. Las observaciones fueron constantes en las tres repeticiones de cada

experimento y se observó el mismo tipo de precipitado hialino rodeado por un halo blanco no uniforme el cual indica que diferentes proteasas son inducidas a través de la posible señalización celular.

Para tener una aproximación semicuantitativa de la degradación de caseína *in vitro* y poder evaluar el efecto de los sobrenadantes de *Pasteurella multocida* o *Bordetella bronchiseptica* en la expresión de algunos de sus factores de virulencia se llevó a cabo la medición de la producción relativa de proteasas en un ensayo turbidimétrico. Se tomaron los sobrenadantes de medios de cultivo de cada bacteria previamente estimulados con los sobrenadantes de medio de cultivo de las contrapartes (*B. bronchiseptica* estimulada con el sobrenadante de medio de cultivo de *P. multocida* y viceversa) y estos sobrenadantes fueron aplicados a una solución de leche descremada estéril y *Buffer* de proteólisis. Los cultivos de los cuales se obtuvieron los sobrenadantes con proteasas extracelulares fueron estimulados con sobrenadantes obtenidos de medio de cultivo de cada una de las bacterias en una OD₆₀₀:1,8 (siendo esta densidad la que estimuló mayormente la proteólisis en cada una de las bacteria) con el fin de obtener un medio de cultivo lo suficientemente saturado en células para asegurar una buena concentración de sustancias extracelulares y así poder ver claramente el efecto de los sobrenadantes bacterianos sobre la expresión de estas enzimas. Inicialmente, el ensayo se llevó a cabo midiendo la absorbancia de los productos solubles de la proteólisis enzimática a 280nm. Sin embargo repetidamente se encontraron fluctuaciones en los valores de absorbancia, probablemente debido a la naturaleza de la leche descremada comercial. Por esto, se modificó el protocolo reportado previamente (**Riedel et al, 2001**) en el cual se determinó la absorbancia de los productos insolubles de proteólisis a 620nm. En principio los ensayos en caja se realizaron en medios de cultivo a pH 7.8 siendo este el óptimo de producción de proteasa y por esto se utilizó este pH para el ensayo turbidimétrico, sin embargo al incubar las muestras, este pH indujo la precipitación temprana de la caseína y por tanto se seleccionó el pH 7.4 como el óptimo para la medición de la proteólisis.

A través del ANOVA se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre al menos un par de tratamientos que involucran a *Bordetella bronchiseptica* ($p=0,0015$, $\alpha=0,05$) y *Pasteurella multocida* ($p=0,0252$, $\alpha=0,05$).

En el ensayo turbidimétrico se observó la disminución de 50% en la actividad proteolítica cuando el cultivo de *B. bronchiseptica* fue estimulado con el sobrenadante de medio de

cultivo de *P. multocida* (**figura 14 panel inferior**) sugiriendo una regulación negativa de la producción de proteasa. Además, este tratamiento presenta una diferencia estadísticamente significativa si se compara con la actividad proteolítica del co-cultivo, observada en el ensayo turbidimétrico (**figura 14C**) que es 1,35 veces más alta que la actividad de *B. bronchiseptica* sola. En el ensayo turbidimétrico con *P. multocida*, el sobrenadante de *B. bronchiseptica* no tuvo un efecto en la producción de la enzima incluso aplicando cantidades mayores del sobrenadante de la bacteria (hasta 3 ml), sin embargo el co-cultivo presentó un aumento de cerca de 2 veces en la actividad enzimática, corroborando lo encontrado en los ensayos en caja de Petri (**figura 15G y 15H**). Aunque no se evidencia el mismo efecto de la inducción con el sobrenadante de *B. bronchiseptica*, en *P. multocida* la respuesta podría no verse claramente debido a una baja concentración del posible inductor en el sobrenadante del medio de cultivo.

Proteólisis en *Bordetella bronchiseptica*

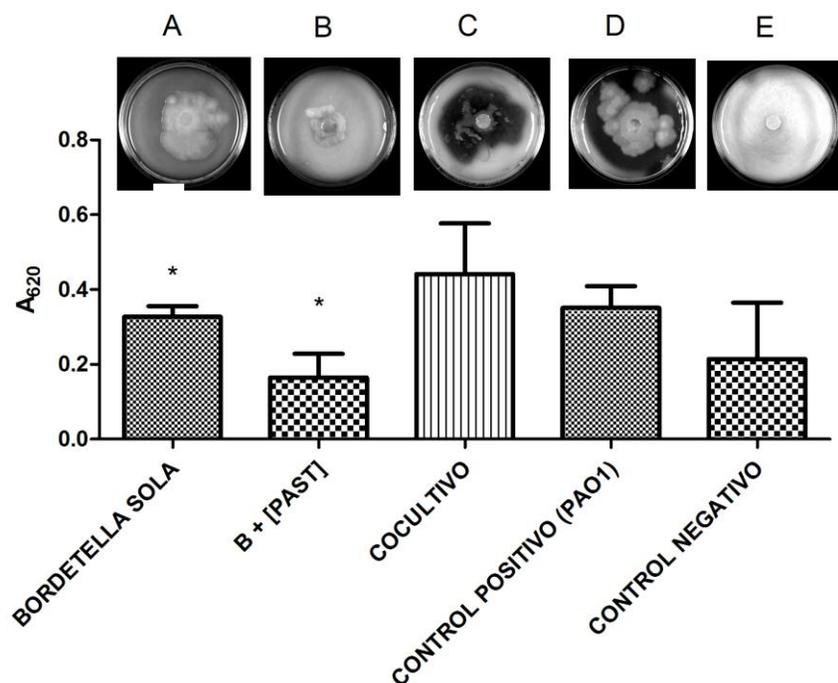


Figura 14. Actividad proteolítica en cultivos de *B. bronchiseptica* bajo diferentes tratamientos. Ensayos en caja de Petri (panel superior) y el correspondiente ensayo semicuantitativo (barras en el panel inferior). P: suspensión celular de *Pasteurella multocida*. [PAST]: sobrenadante de medio de cultivo de *Pasteurella multocida*. B: suspensión celular de *Bordetella bronchiseptica*. [BORDET]: sobrenadante de medio de cultivo de *Bordetella bronchiseptica*. PAO1: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Proteolisis in *Pasteurella multocida*

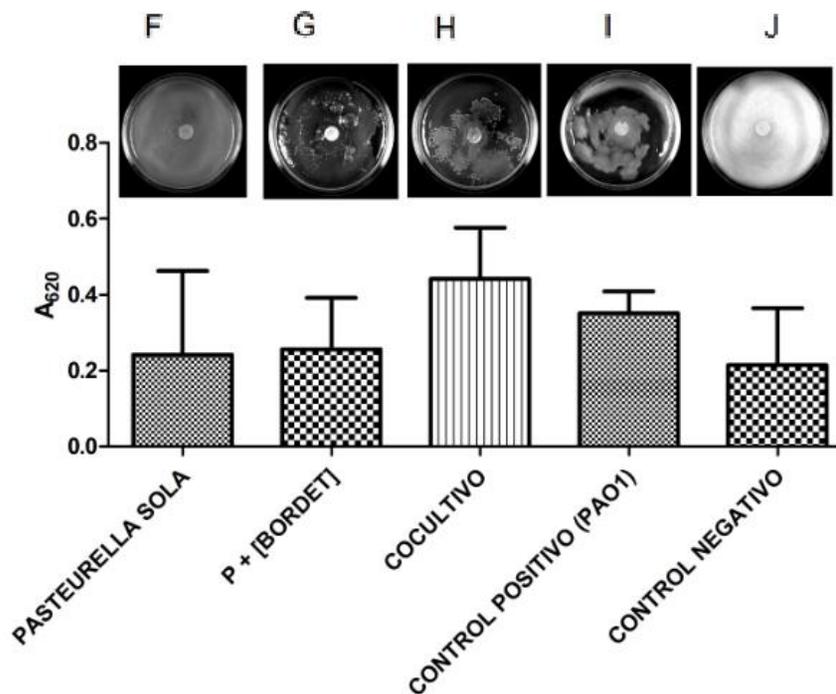


Figura 15. Actividad proteolítica en cultivos de *P. multocida* bajo diferentes tratamientos. Ensayos en caja de Petri (panel superior) y el correspondiente ensayo semicuantitativo (barras en el panel inferior). P: suspensión celular de *Pasteurella multocida*. [PAST]: sobrenadante de medio de cultivo de *Pasteurella multocida*. B: suspensión celular de *Bordetella bronchiseptica*. [BORDET]: sobrenadante de medio de cultivo de *Bordetella bronchiseptica*. PAO1: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Motilidad

Por medio de los ensayos en caja, se analizó el efecto del sobrenadante de *Pasteurella multocida* sobre la motilidad de *Bordetella bronchiseptica* y se encontró un cambio constante en la motilidad de la bacteria cuando esta se encuentra en las cercanías de *P. multocida*. En presencia del sobrenadante de *P. multocida* en el medio de cultivo se encontró un cambio en el patrón de movimiento que se evidencia en un aumento de la superficie cubierta por *Bordetella bronchiseptica* (figura 16-2). También se observó un cambio en el patrón de movimiento en co-cultivo (figura 16-3). Dado que *P. multocida* no presenta motilidad, este ensayo muestra la influencia que tiene el sobrenadante de medio de cultivo de *P. multocida* en la motilidad de *B. bronchiseptica*.

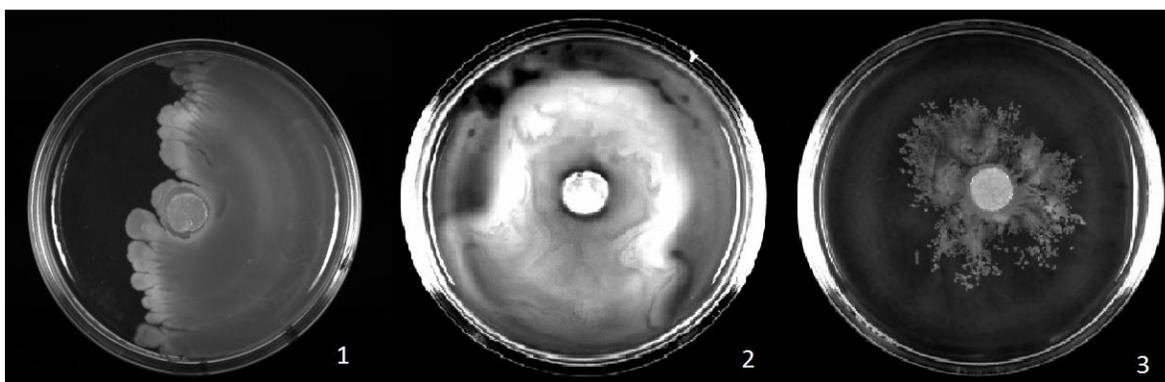


Figura 16. Ensayos de motilidad en *B. bronchiseptica* - Discos impregnados con cultivo líquido de la bacteria. 1. Solo *Bordetella bronchiseptica*. 2. Sobrenadante de medio de cultivo de *Pasteurella* incorporado en caja. 3. Co-cultivo *Bordetella bronchiseptica* – *Pasteurella multocida*.

Como se observa en las imágenes, la presencia del sobrenadante de *P. multocida* en el medio de cultivo inoculado con *B. bronchiseptica* modifica el movimiento tipo *swarming* de patrón irregular en la bacteria (figura 6.2), generando un desplazamiento que cubre mayor cantidad de área en la caja y una forma de movimiento mucho más desordenado, tipo terrazas, diferente al desplazamiento presente en el mono-cultivo bacteriano de *Bordetella bronchiseptica* (figura 6.1). En el co-cultivo se encontró una motilidad reducida en patrón vórtex, en donde se observaron microcolonias en las cercanías del disco de papel Whatman (figura 6.3) (Kearns, D. 2010). La motilidad reducida de *B. bronchiseptica* puede ser evidencia de un fenómeno de represión de la expresión de apéndices de motilidad en *B. bronchiseptica* generado por algún tipo de antagonismo con *P. multocida* en co-cultivo (Akerley et al, 1992). Como muestran las imágenes, el

sobrenadante de medio de cultivo *Pasteurella* tiene un fuerte efecto sobre este factor de virulencia

Lipolisis

Para indagar sobre el papel de los sobrenadantes de medio de cultivo en la expresión de lipasas en *Pasteurella multocida* o *Bordetella bronchiseptica* se llevaron a cabo experimentos en los que se determinó de manera semi-cuantitativa la lipólisis *in vitro*. En las graficas 17 y 18 se muestran los resultados de lipólisis por cultivos de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*. El ensayo se estandarizó probando dos sustratos para detectar la especificidad de la enzima, según lo reportado en estudios previos (**Pratt et al, 2000; Treichel et al, 2010**) induciendo la producción de lipasas con 100 µl de Tween 20 y Tween 80 y manteniendo el pH del medio de cultivo en 7.6. Se encontró que la producción de lipasas es muy baja en ambas cepas y que la especificidad por el sustrato Tween 20 es pequeña al observarse los valores de absorbancia después de la incubación con el medio de cultivo de las bacterias en presencia del sustrato. En Tween 80, se encontró una mayor producción de lipasas, hecho que fue corroborado al determinar la absorbancia de los productos de lipólisis a partir de medios de cultivo de las bacterias en presencia del sustrato. En caja, la lipólisis se evidencia como un halo de precipitado blanco de sales de calcio y ácidos grasos al transcurrir más de 30 horas de incubación y por esto se controló el tiempo de producción de lipasas en el medio de cultivo, hasta entrada la fase estacionaria de la curva de crecimiento de cada bacteria.

En *P. multocida* el ensayo turbidimétrico mostró disminución leve en la producción de las enzimas (-0,77 veces menos que la bacteria sola) en presencia del sobrenadante de su contraparte (**figura 17B**). Esto fue consistente con lo observado en los ensayos en caja en donde a diferencia del cultivo de *Pasteurella* sin tratamiento (**figura 17A**) el ensayo en presencia del sobrenadante de *Bordetella* muestra una disminución considerable del precipitado blanco alrededor de las células bacterianas

Lipólisis en *Pasteurella multocida*

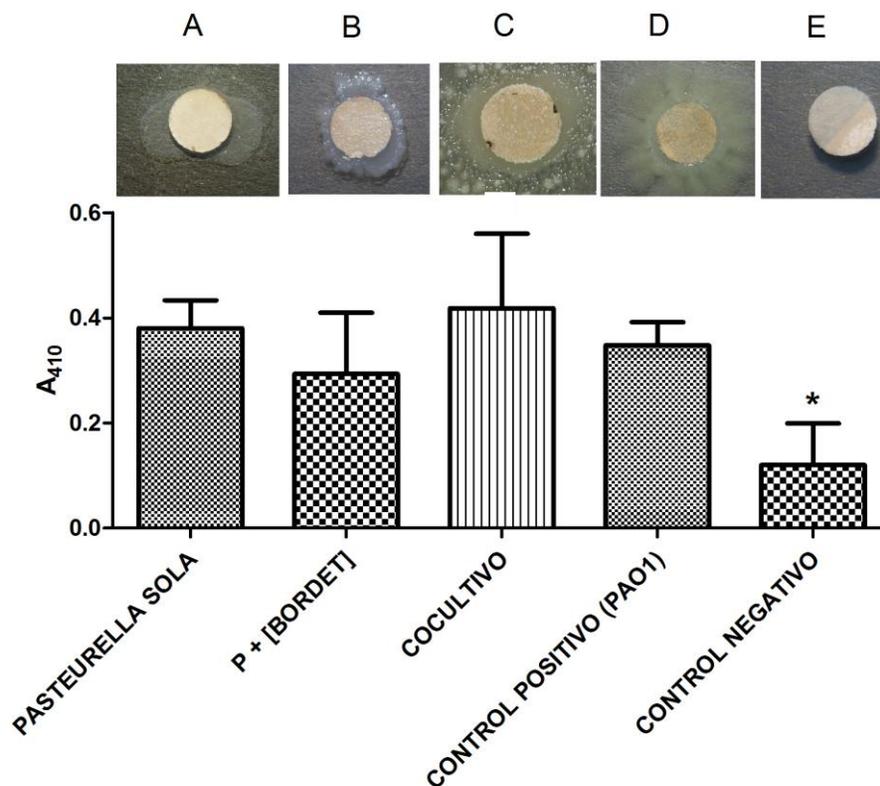


Figura 17. Actividad lipolítica en cultivos de *P. multocida* bajo diferentes tratamientos. Ensayos en caja de Petri (panel superior) y el correspondiente ensayo semicuantitativo (barras en el panel inferior). P: suspensión celular de *Pasteurella multocida*. [BORDET]: sobrenadante de medio de cultivo de *Bordetella bronchiseptica*. PAO1: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Lipólisis en *Bordetella bronchiseptica*

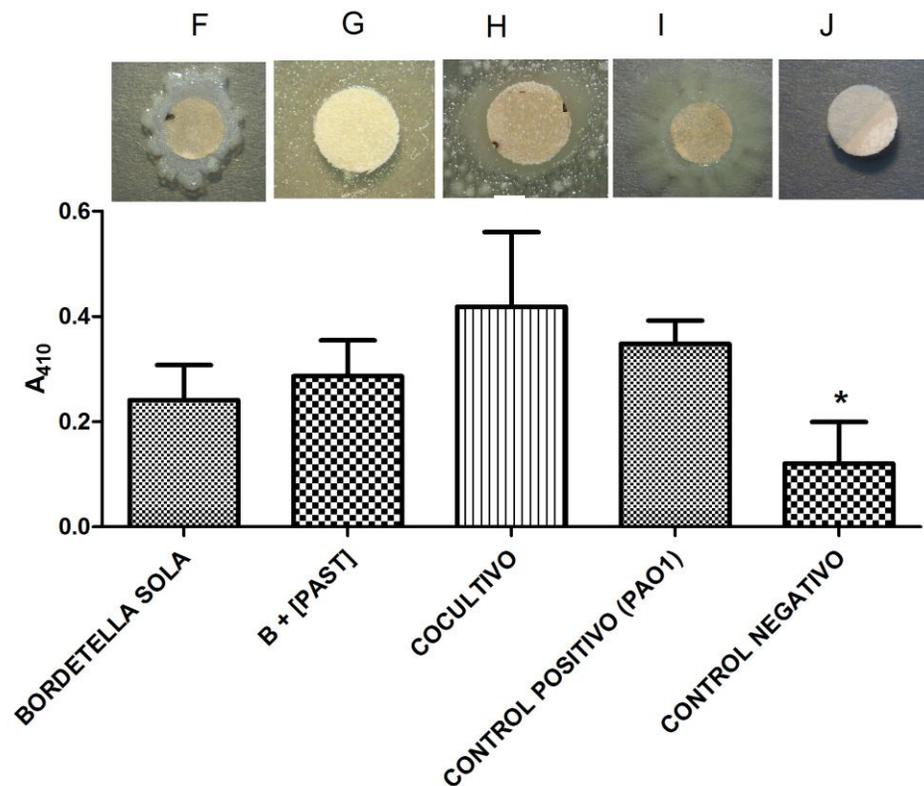


Figura 18. Actividad lipolítica en cultivos de *B. bronchiseptica* bajo diferentes tratamientos. Ensayos en caja de Petri (panel superior) y el correspondiente ensayo semicuantitativo (barras en el panel inferior). B: suspensión celular de *Bordetella bronchiseptica*. [PAST]: sobrenadante de medio de cultivo de *Pasteurella multocida*. PAO1: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

En el ensayo turbidimétrico también se encontraron diferencias entre la actividad lipolítica del cocultivo (**figura 17C y 18H**) y del control positivo *P. aeruginosa* PAO1 (**figura 17D y 18I**) en donde el cocultivo muestra una mayor actividad enzimática que la cepa referencia. Esta actividad se puede observar alrededor de disco impregnado en los ensayos en caja.

En *B. bronchiseptica*, la presencia del sobrenadante de *P. multocida* tuvo efecto positivo en la producción de lipasas que se observa en el ensayo en caja sin embargo fue difícil medir esta producción en el ensayo turbidimétrico (**figura 18G panel inferior**). Aunque en la caja inoculada únicamente con *B. bronchiseptica* se observa un gran precipitado blanco alrededor de la colonia bacteriana (**figura 18F**), en el tratamiento con el sobrenadante de *P. multocida* se puede ver una gran difusión de los productos de lipólisis alrededor del disco impregnado con células bacterianas indicando que hay una estimulación de la producción de la enzima en presencia del sobrenadante de *Pasteurella multocida*.

Hemolisis y captura de hemoglobina

La evaluación de hemolisis en caja mostró la producción de las enzimas en *P. multocida* y *B. bronchiseptica* a 37°C y pH 7.5 (**figura 19A y 20F**). Al evaluar la influencia del sobrenadante de *P. multocida* sobre el cultivo celular de *B. bronchiseptica* (**figura 19B**) se observó la represión de la producción de hemolisina respecto al control con la bacteria sola. Por el contrario, en *P. multocida* parece haber inducción de la hemólisis de eritrocitos incluso a niveles mayores que los encontrados cuando la bacteria está sola (**figura 20G**). Estos resultados sugieren una posible interacción en la cual *P. multocida* responde a señales producidas por *Bordetella* sobre-expresando las proteínas encargadas de la hemólisis de glóbulos rojos y *Bordetella* se presenta como una bacteria espectadora que contribuye a la degradación de estas células únicamente aportando los inductores de la expresión en la otra bacteria

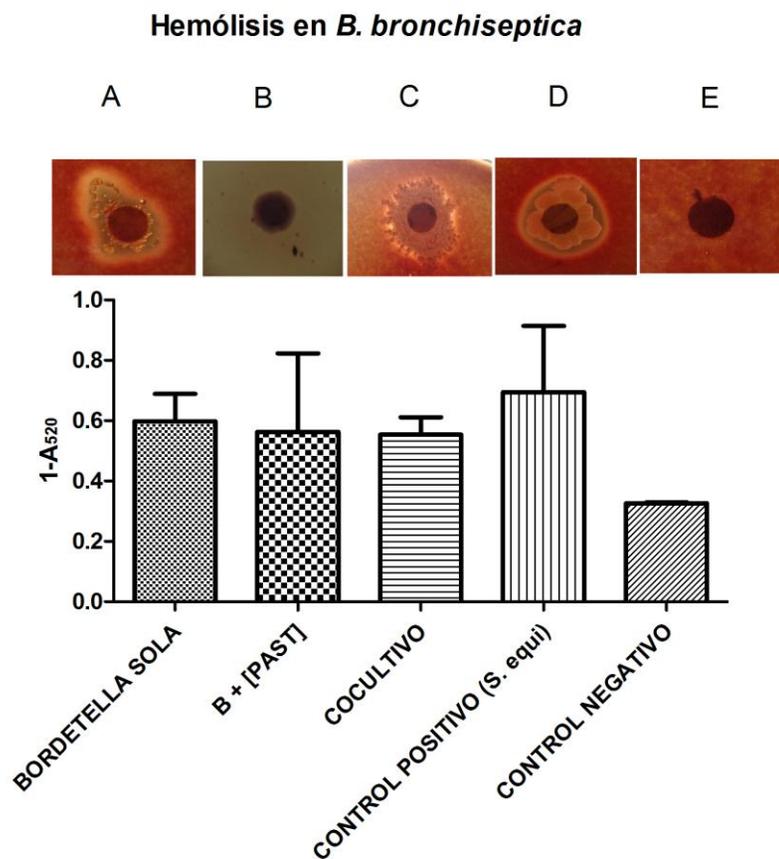


Figura 19. Hemólisis de eritrocitos heparinizados de oveja por *B. bronchiseptica*. Ensayos en caja de Petri (panel superior) y el correspondiente ensayo semicuantitativo (barras panel inferior). [PAST]: sobrenadante de medio de cultivo de *Pasteurella multocida*. B: suspensión celular de *Bordetella bronchiseptica*. Control positivo: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

Hemaglutinación y hemólisis en *Pasteurella multocida*

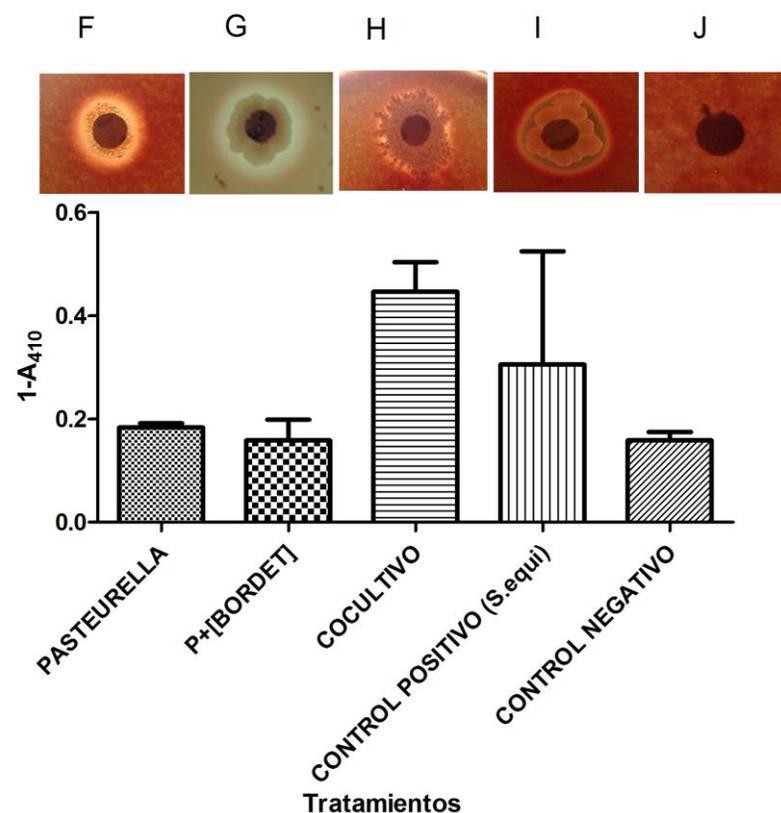


Figura 20. Hemaglutinación y hemólisis de eritrocitos heparinizados de oveja por *P. multocida*. Ensayos en caja de Petri (panel superior) y el correspondiente ensayo semicuantitativo (barras en el panel inferior). [BORDET]: sobrenadante de medio de cultivo de *Bordetella bronchiseptica*. P: suspensión celular de *Pasteurella multocida*. Control positivo: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

Con el método turbidimétrico fue difícil medir la intensidad de la hemólisis generada por *Bordetella bronchiseptica* y la adsorción de hemoglobina por *Pasteurella multocida* de tal manera que no fue posible observar las diferencias estadísticamente significativas, que si fueron evidentes en el ensayo *in vivo* ($p=0,2925$, $\alpha=0,05$), aunque se puede ver como la hemólisis producida por *B. bronchiseptica* en presencia del sobrenadante del medio de cultivo de *P. multocida* se aproxima a la producida por la cepa *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (**figura 19B panel inferior**)

En presencia del sobrenadante de *P. multocida* disminuye la hemólisis producida por la *Bordetella* en caja (**figura 19B panel superior**) y es probable que el efecto de estos tratamientos incluyendo el sobrenadante de *Pasteurella multocida* sobre el cultivo de *Bordetella bronchiseptica* no se vean claramente debido a una baja concentración de las moléculas en el medio. La adsorción de hemoglobina a las proteínas de membrana externa de *P. multocida* constituye un importante mecanismo de patogenicidad y por tanto se llevó a cabo la medición indirecta de su actividad (**Bosch et al, 2002**). La hemólisis generada como mecanismo para captar hemoglobina después de la estimulación de las células de *P. multocida* con sobrenadante de medio de cultivo de *B. bronchiseptica* se vió aumentada en los ensayos en caja (**figura 20G**) y en el ensayo turbidimétrico, el cocultivo mostró una actividad alta comparada con el control con solo *Pasteurella* e incluso con el control positivo (**figuras 20F y 20I**)

Se sabe que esta proteína tiene una vía de regulación dependiente de hierro y ha sido reportada en varios artículos, sin embargo nunca se ha abordado la regulación de su expresión desde el punto de vista del *Quorum Sensing*. La producción de la proteína HgbA en *Pasteurella multocida* depende del regulador global *fur* el cual en bajas condiciones del metal, libera el promotor de los genes codificantes para proteínas del metabolismo ferrico, entre ellas HgbA. Aun no se ha considerado el papel del *Quorum Sensing* en la expresión de este tipo de proteínas. Como se mencionó previamente, Patriquin y colaboradores en 2008 mostraron como se da una corregulación de la motilidad en *Pseudomonas aeruginosa* dependiente de la disponibilidad de hierro en el medio de cultivo. Dado que las bacterias Gram negativas colonizadoras de hospederos de sangre caliente poseen mecanismos de patogenicidad conservados, cabe la posibilidad de que este sea también un tipo de control con el cual *Pasteurella* asegura concentraciones óptimas de hierro al interior de la célula coordinando su captación con otros miembros de la población.

En la tabla 7 se presenta un resumen de la producción de halos de hemólisis en ensayos en caja de Petri.

Tabla 7. Producción de halos de hemólisis por *P. multocida* y/o *B. bronchiseptica*.

Tratamiento	Respuesta
Solo <i>P. multocida</i>	+++
Solo <i>B. bronchiseptica</i>	+++
<i>Pasteurella</i> + sobrenadante <i>Bordetella</i>	+++
<i>Bordetella</i> + sobrenadante <i>Pasteurella</i>	-
Co-cultivo	+

[+++]: Halo que sugiere fuerte inducción de hemólisis. [++]: Halo que sugiere una fuerte inducción pero en zonas discretas de la caja. [+]: Halo que sugiere una débil inducción de hemólisis. [-]: No hay inducción. NE: No evaluado.

6.3 DETECCIÓN DE *N*-ACIL HOMOSERÍN LACTONAS

Para detectar la posible producción de AHLs en *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* se utilizaron las metodologías descritas en materiales y métodos. Se utilizaron varias cepas biosensoras capaces de detectar un amplio rango de AHLs y en los ensayos en caja en los cuales se enfrentan el biosensor y la bacteria problema únicamente se observó inducción del fenotipo reportero en el control positivo. En la figura 21 se muestra el esquema de este ensayo con el control positivo *Pseudomonas putida* IsoF.

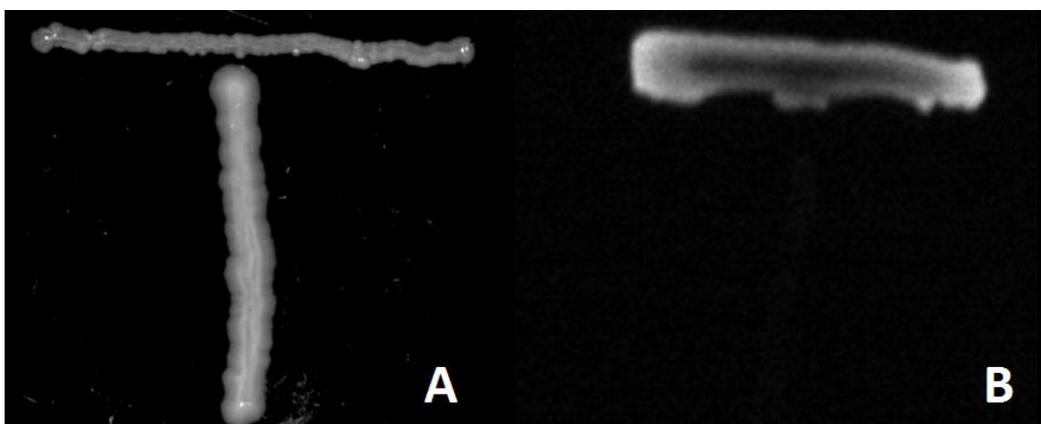


Figura 21. Ensayos en cruz con biosensores de AHLs de cadena corta y mediana: Se llevaron a cabo ensayos en cruz con los biosensores de cadena corta y mediana mencionados en la tabla 7. En estos ensayos no se observó la inducción del fenotipo reportero del biosensor cuando este se enfrentó a *P. multocida*, *B. bronchiseptica*, o un cocultivo. Los ensayos se realizaron por triplicado. A: Esquema del ensayo en luz blanca. B: Inducción del fenotipo bioluminiscente (estría superior) del biosensor *Escherichia coli* pSB403 observado en cámara oscura.

Al parecer ninguna de las AHLs de cadena corta (C4, C6 y C8 con sustituyentes hidroxilo y carbonilo) que pueden detectar estos biosensores está presente en los medios de cultivo. Además las AHLs de cadena mediana C10 y C12 tampoco fueron detectadas por los biosensores o están en una concentración baja y no inducen el fenotipo. El biosensor *X. fastidiosa* 8523(pKLN55) tampoco expresó el fenotipo reportero indicando que las bacterias no producen el factor de difusión simple (DSF) que también es un tipo de molécula señalizadora reportado para algunas bacterias Gram negativas como *Xanthomonas campestris* y *Burkholderia cepacia*. Se utilizaron además los biosensores de cadena larga *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) y *Sinorhizobium meliloti*

Rm11558 (pJNSinR). En principio se llevaron a cabo ensayos enfrentando las bacterias al biosensor como se muestra en la figura 21. Allí se encontró que *Pasteurella multocida* indujo muy levemente el fenotipo reportero (degradación de X-gal por acción de la enzima β -galactosidasa) y que *Bordetella bronchiseptica* fue incapaz de inducir este fenotipo. Esto indica que probablemente *Pasteurella multocida* es capaz de producir una molécula similar a AHL de cadena larga con o sin insaturaciones (C14, C16 o C16:1). En la tabla 8 se muestran los resultados del *screening* preliminar con los biosensores de AHLs cadena corta, media y larga. En la figura 22 se muestra el resultado del enfrentamiento entre *P. multocida* y el biosensor de AHLs de cadena larga.

Tabla 8. Resultados de los ensayos en caja con algunos biosensores de *N*-acil homoserín lactonas

Biosensor	AHL que detecta	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Control positivo
<i>Escherichia coli</i> pSB 403,	C6-3-oxo-AHL C6-AHL, , C8-3-oxo-AHL , C8-AHL	No detectada	No detectada	<i>Pseudomonas putida</i> IsoF
<i>E. coli</i> pSB401	C6-3-oxo-AHL C6-AHL, , C8-3-oxo-AHL , C8-AHL	No detectada	No detectada	<i>P. putida</i> IsoF
<i>E. coli</i> pSB1075	C-12-3-oxo-AHL , C10-3-oxo-AHL , C-12-AHL	No detectada	No detectada	<i>P. putida</i> IsoF
<i>Chromobacterium violaceum</i> C.V.026	C-6-AHL , C6-3-oxo-AHL , C8-AHL , C8-3-oxo-AHL , C4-AHL	No detectada	No detectada	<i>Chromobacterium violaceum</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	C8-3-oxo-AHL , Todas las AHL 3-oxo , C6-AHL, C8-AHL, C10-AHL, C12-AHL , C14-AHL, C6-3-hidroxi-AHL, C8-3-hidroxi-AHL, C10-3-hidroxi-AHL	Detectada	No detectada	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
<i>S. meliloti</i> Rm11558(pJNSinR)	C14-3-oxo-AHL , C16:1-3-oxo-AHL, C-16-AHL, C-16:1-AHL, C14-AHL	Detectada	No detectada	C14 AHL sintética
<i>Xyllela fastidiosa</i> 8523(pKLN55)	DSF	No detectada	No detectada	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i>
<i>P. putida</i> IsoF117 pAS-C8	C8-AHL , C10-AHL	No detectada	No detectada	<i>B. cepacia</i>
<i>P. putida</i> IsoF117pKR-C12	C12-3-oxo-AHL , C10-3-oxo-AHL	No detectada	No detectada	<i>P. aeruginosa</i> PAO1

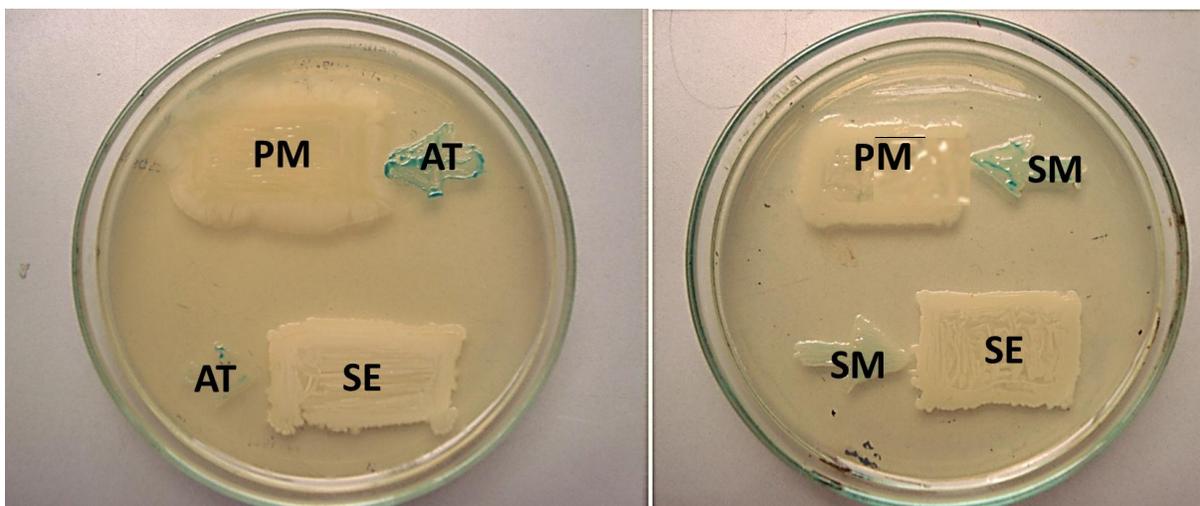


Figura 22. Ensayos con biosensores de AHLs de cadena larga PM: *Pasteurella multocida*. **SM:** *S. meliloti* Rm11558 (pJNSinR) o **AT:** *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (PZLR4). **SE:** Control negativo *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus*

Teniendo en cuenta estos resultados, se llevó a cabo la extracción líquido/líquido de AHLs del sobrenadante de medio de cultivo de *P. multocida*, *B. bronchiseptica* o su co-cultivo como se describió en la metodología. Estos extractos se utilizaron para comprobar que la inducción del fenotipo reportero en los dos biosensores de cadena larga, se debió a la producción de AHLs por las bacterias. Se llevaron a cabo ensayos en caja de Petri sembrando sobre el biosensor, discos impregnados con 10µl de los extractos de los sobrenadantes de medio de cultivo resuspendidos en diclorometano

Dado que la inducción del fenotipo reportero en *A. tumefaciens* fue muy leve y solo se observó 72 horas después de iniciado el ensayo, se llevaron a cabo nuevamente pruebas en caja de Petri con extractos de medio de cultivo, esta vez impregnando 4 discos con el mismo extracto de medio de cultivo y se pusieron en una sola caja, con el fin de garantizar una mayor cantidad de la posible molécula señalizadora tipo AHL e inducir el fenotipo reportero. En otros experimentos se observó la inducción del fenotipo reportero del biosensor la ser enfrentado con extracto de *P. multocida*, superconcentrado en diclorometano (**figura 23II-B**). Sorprendentemente, también se encontró la inducción del reportero al enfrentarse con el extracto de medio de cultivo de *P. multocida* inoculada en medio previamente condicionado con el extracto de medio de *B. bronchiseptica*

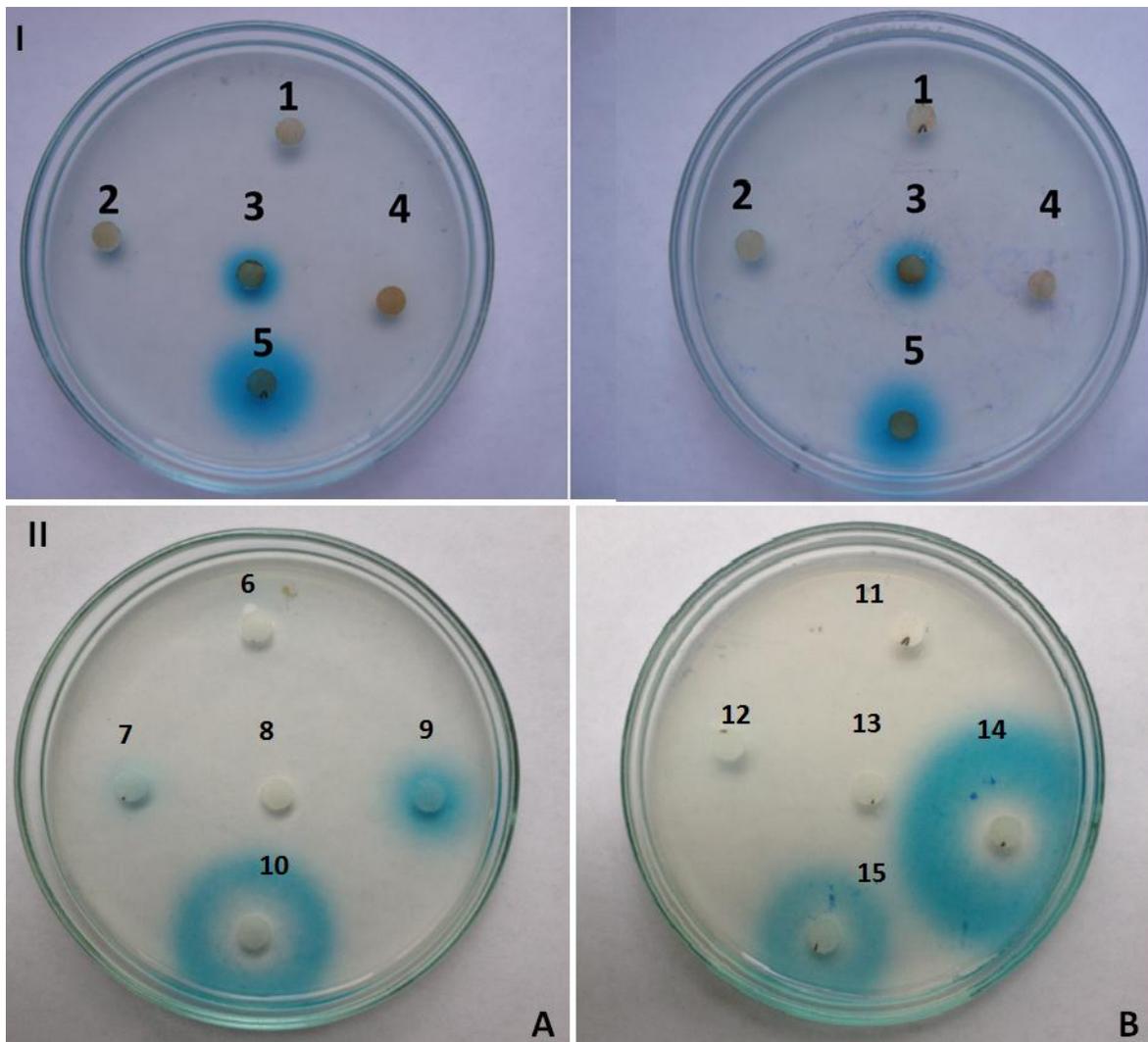


Figura 23I. Ensayos en caja de Petri con extractos en acetato de etilo, de sobrenadante de medio de cultivo de las bacterias y biosensor de AHLs de cadena larga: En estos ensayos el halo azul representa la degradación de X-gal como consecuencia de la producción de β -galactosidasa en *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4). 1: Extracto de medio de cultivo sin inocular (control negativo) 2: Extracto de *Bordetella bronchiseptica*. 3: Extracto de *Pseudomonas putida* IsoF (control positivo) 4: Extracto de *Pasteurella multocida* 5: Extracto de co-cultivo

Figura 23II. Ensayos en caja de Petri con extractos en Diclorometano, de sobrenadante de medio de cultivo condicionado o superconcentrado y biosensor de AHLs de cadena larga. Estos ensayos consisten en el enfrentamiento de extracto de medio de cultivo condicionado (A) o extracto de medio de cultivo superconcentrado (B) con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). 6: Extracto de medio de co-cultivo. 7: Extracto de medio de cultivo de *B. bronchiseptica* condicionado con extracto de *P. multocida*. 8: Extracto de medio de cultivo sin inocular (control negativo). 9: Extracto de medio de cultivo de *P. multocida* condicionado con extracto de *B. bronchiseptica*. 10: Extracto de medio de cultivo de *Pseudomonas putida* IsoF (control positivo). 11: Extracto de co-cultivo, superconcentrado. 12: Extracto de *B. bronchiseptica* superconcentrado. 13: Extracto de medio de cultivo sin inocular, superconcentrado (control negativo), superconcentrado. 14: Extracto de *P. multocida* superconcentrado. 15: Extracto de *P. putida* IsoF superconcentrado (control positivo)

El resultado de esta prueba mostró que el extracto de medio de cultivo de *P. multocida* y del co-cultivo generaron la inducción del fenotipo, comprobando que existe una interacción entre las dos bacterias que interviene en la producción de una molécula señalizadora. No se observó inducción en los ensayos con el sobrenadante de medio de cultivo de *B. bronchiseptica* ni con el extracto del control negativo, descartando así la posibilidad de un falso positivo inducido por alguna molécula componente del medio de cultivo o alguna contaminación. Además se encontró que un aumento en la cantidad de extracto en el ensayo hace que el biosensor se aglomere en microcolonias que dan el aspecto rugoso al medio de cultivo, como se observa en la figura 24.

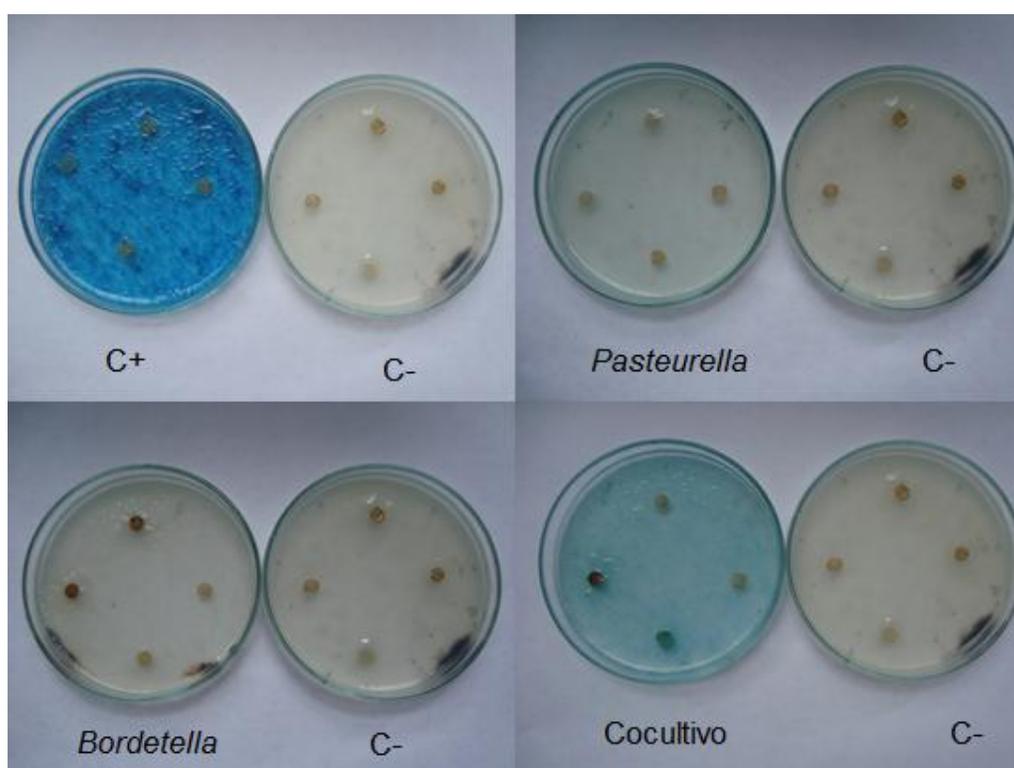


Figura 24. Ensayos en caja de Petri con 4 veces mas extracto en Acetato de etilo, de sobrenadante de medio de cultivo de las bacterias y biosensor de AHLs de cadena larga: En estos ensayos el halo azul representa la degradación de X-gal como consecuencia de la producción de betagalactosidasa en *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4). **C+:** Discos impregnados con el extracto de *Pseudomonas putida* IsoF. **C-:** Discos impregnados con el extracto de medio de cultivo estéril. **Pasteurella:** Discos impregnados con el extracto de *P. multocida*. **Bordetella:** Discos impregnados con el extracto de *B. bronchiseptica*. **Cocultivo:** Discos impregnados con el extracto del co-cultivo. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

Finalmente con el objetivo de identificar el tipo de AHL producida por *Pasteurella multocida* o por el cocultivo de las dos bacterias se llevó a cabo la separación de los

extractos en diclorometano por medio de una cromatografía en capa delgada (CCD) en fase reversa. Los extractos del co-cultivo revelan la presencia de moléculas que inducen el fenotipo reportero de *Agrobacterium tumefaciens* pNTL4, cuyas relaciones de flujo coinciden se aproximan a la C12 de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. En esta cromatografía, se detectó una muy leve inducción del fenotipo reportero en la posición correspondiente a una AHL en la base del carril 5 en la figura 25. En el **anexo E** se puede ver el resultado de la CCD correspondiente a los extractos superconcentrados en diclorometano y los extractos de los medios condicionados con extracto de cada bacteria. Allí se ve que el extracto de *P. multocida* sembrada en medio previamente tratado con extracto de *B. bronchiseptica* presenta un punto correspondiente a una AHL de baja polaridad

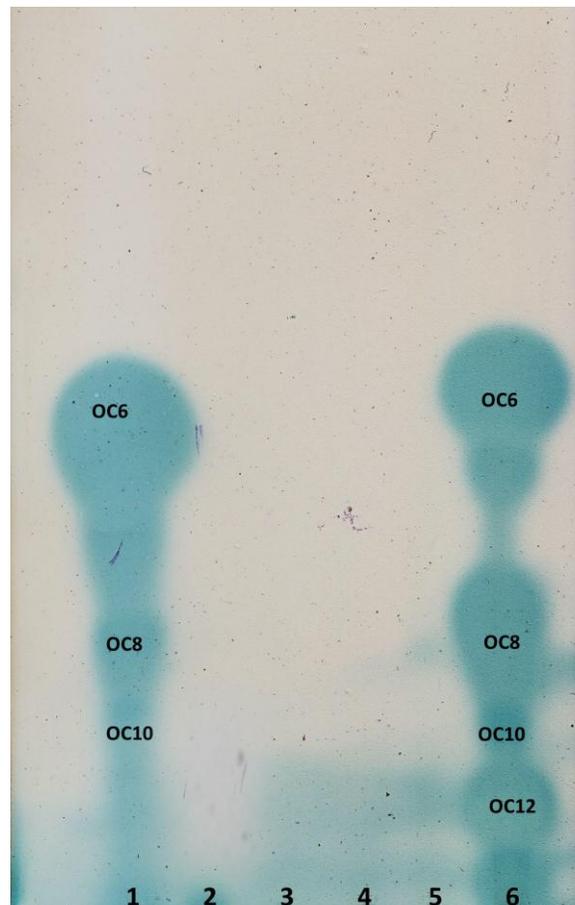


Figura 25. Cromatografía en capa delgada acoplada al biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4): En cada carril se sembraron 10µl de extracto en diclorometano de sobrenadante de medio de cultivo de las bacterias y los controles. **1.** Extracto de *Pseudomonas putida* IsoF. **2.** Extracto de medio de cultivo. **3.** Extracto de *Pasteurella multocida* **4.** Extracto de *Bordetella bronchiseptica* **5.** Extracto de Cocultivo **6:** Extracto de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

6.4 INFLUENCIA DE ALGUNAS AHLs SOBRE LA VIRULENCIA DE *P. multocida* Y *B. bronchiseptica*

A pesar de no estar planteado en los objetivos principales de este trabajo y con miras a obtener más evidencia acerca del papel de la señalización celular durante la patogénesis de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*, se llevaron a cabo algunos ensayos en los que se aplicaron AHLs sintéticas sobre suspensiones celulares de *Pasteurella* y *Bordetella* y estas fueron inoculadas en explantes de cornete de conejo. También se llevaron a cabo algunos ensayos funcionales con sustratos enzimáticos para detectar el posible papel de estas moléculas de señalización de Gram negativas, sobre la producción de los factores de virulencia evaluados en el trabajo (lipasa, proteasa y hemolisina). En estos ensayos se encontró que, en el tratamiento en el que la suspensión celular de *B. bronchiseptica* fue estimulada con la C14 y la OC14 sintéticas, se indujo la aparición de un mayor número de células picnóticas, muertas, vacuolizadas y con pérdida del borde ciliado. Por el contrario cuando la bacteria fue estimulada con las AHLs de 6 carbonos (C6 y OC6) se encontró una disminución del número de células con este mismo tipo de cambios celulares (**figura 24 A-D**) lo cual indica que esta bacteria responde a las AHLs exógenas y probablemente de esta forma regula el proceso infeccioso. Cuando la suspensión celular fue tratada con la lactonasa recombinante AiiA, la cual hidroliza el anillo lactónico de las AHLs, se encontró un aumento drástico del número de células picnóticas y vacuolizadas (**figura 24A, 24D**).

Influencia de algunas AHLs sobre la virulencia de *Pasteurella* y *Bordetella* en explantes de corne

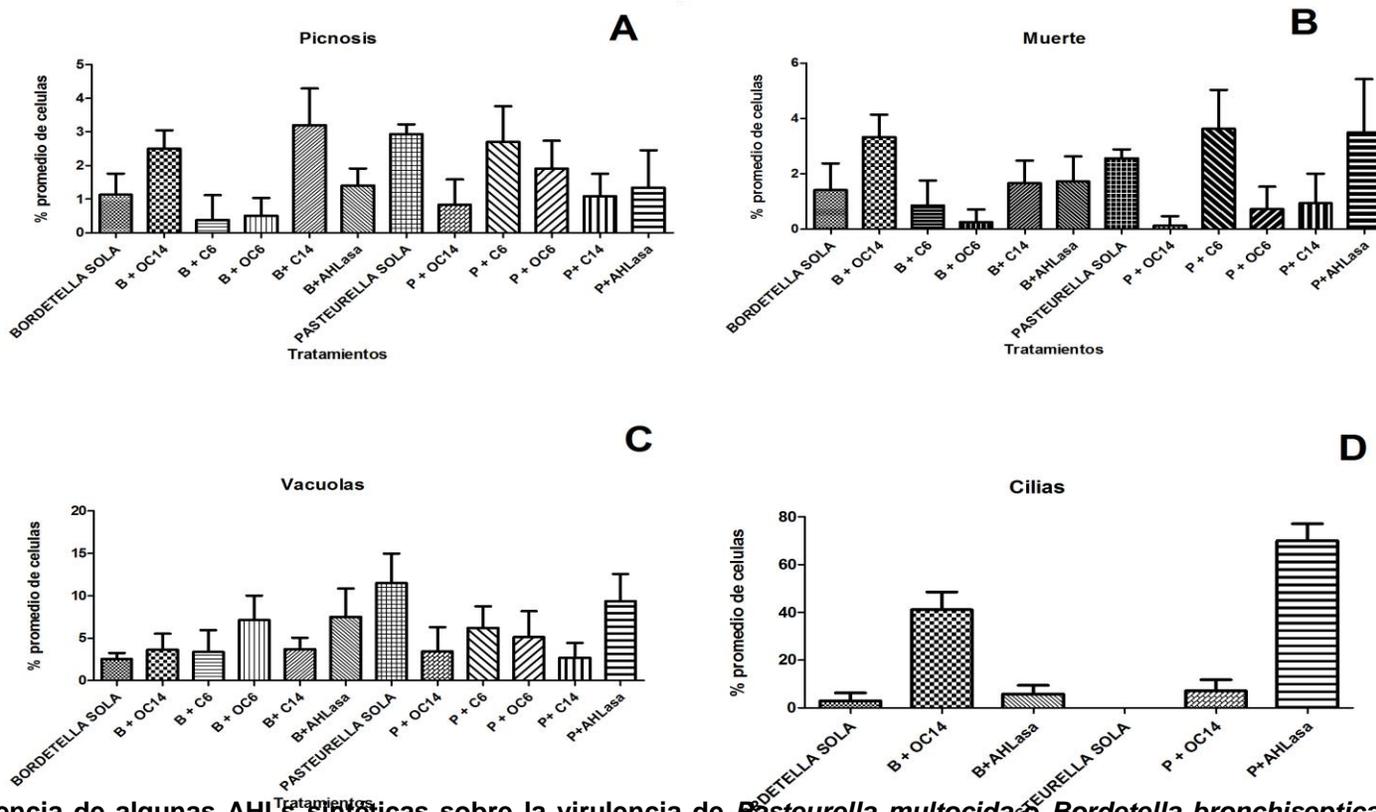


Figura 26. Influencia de algunas AHLs sintéticas sobre la virulencia de *Pasteurella multocida* o *Bordetella bronchiseptica* en explantes de corne de conejo: En la gráfica se observan los porcentajes promedio de células picnoticas (A) , muertas (B) , vacuolizadas (C) y con pérdida de cilias (D) después de aplicar tratamientos a explantes de cornetes de conejo. **Bordetella sola:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* sin tratamiento. **B/P + OC14:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* o *P. multocida* tratada con oxotetradecanoil-DL-acil homoserín lactona. **B/P + C6:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* o *P. multocida* tratada con tratada con hexanoil-DL-acil homoserín lactona. **B/P+OC6:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* o *P. multocida* tratada con tratada con β -cetocaproil-DL-acil homoserín lactona. **B/P + C14:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* o *P. multocida* tratada con tetradecanoil-DL-acil homoserín lactona. **B/P + AHLasa:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* o *P. multocida* tratada con el sobrenadante de medio de cultivo de la cepa *E. coli* pCCB6 productora de la lactonasa recombinante AiiA. Los resultados son los porcentajes promedio de 3 experimentos diferentes en los que se valoraron 8 campos ópticos y aproximadamente 1200 células por tratamiento

En *Pasteurella multocida* se encontró que, contrario a lo que sucede en *Bordetella*, la AHLs de 14 carbonos con y sin sustitución de grupo carbonilo en el carbono 3 del residuo acilo, reprimieron la aparición de células con cualquiera de los 4 cambios celulares morfológicos y de manera contrastante a lo observado en *Bordetella*, las homoserín lactonas de 6 carbonos sin sustitución de grupo carbonilo en el carbono 3 del residuo acilo indujeron un aumento de este tipo de cambios celulares en el epitelio nasal

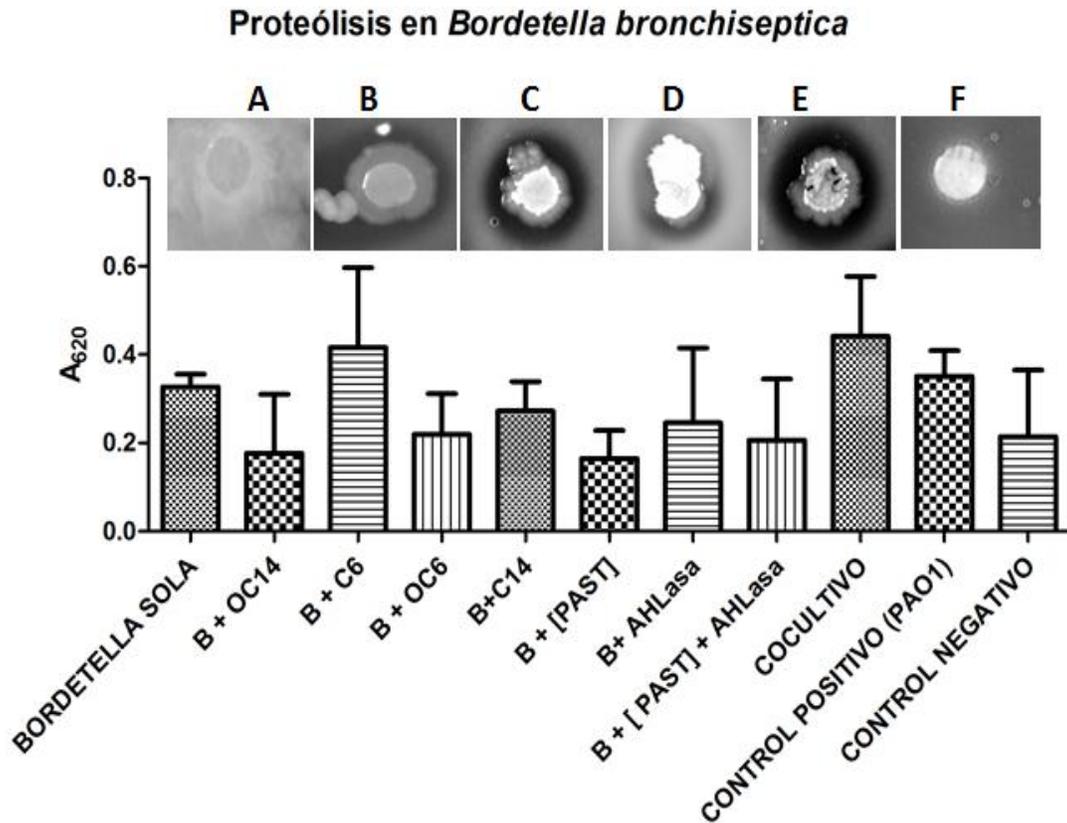


Figura 27. Influencia de algunas AHLs sintéticas sobre la producción de proteasas en *Bordetella bronchiseptica*: Panel superior: Ensayos en caja de Petri. (A) Solo *Bordetella* (B) *Bordetella* + OC14 (C) *Bordetella* + C6. (D) *Bordetella* + OC6 (E) *Bordetella* + C14 (F) *Bordetella* + lactonasa AiiA. Panel inferior: ensayos turbidimétricos. **Bordetella sola:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* sin tratamiento. **B + OC14:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con oxotetradecanoil AHL. **B + C6:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con la hexanoil AHL. **B+OC6:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con la β -cetocaproil AHL. **B + C14:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con tetradecanoilAHL. **B + AHLasa:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con el sobrenadante de medio de cultivo de la cepa *E. coli* pCCB6 productora de la lactonasa recombinante AiiA. **B + [PAST]+AHLasa:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con el sobrenadante de medio de cultivo de *P. multocida* y con el sobrenadante de medio de cultivo de la cepa *E. coli* pCCB9 productora de la lactonasa recombinante

Para observar el efecto de las AHLs sobre la producción de algunos factores de virulencia se llevaron a cabo ensayos funcionales en caja de Petri y ensayos turbidimétricos en los que se aplicaron AHLs sintéticas a las suspensiones celulares de las bacterias. En estos ensayos se encontró que en *Bordetella bronchiseptica* hay un aumento de la producción de enzimas proteolíticas en presencia de las AHLs OC14, C6 y C14 (**figura 27B, 27C y 27E**). En el ensayo en el cual la lactonasa recombinante AiiA fue incorporada en el medio de cultivo de la bacteria, esta perdió el fenotipo proteolítico (**figura 25F**). En los ensayos turbidimétricos se encontró igualmente un aumento de la producción de proteasas después de aplicar AHLs sintéticas a células de *Bordetella* sin embargo en este caso se encontró una mayor inducción con la C6 (**figura 27 panel inferior**), lo cual también fue observado en los ensayos funcionales en caja. En *Pasteurella* se encontró la inducción de la producción de proteasas en presencia de la AHL OC14 (**figura 28H**) y en presencia de la C14 (**figura 28K**). En presencia de la enzima lactonolítica se observó un aumento en la producción de proteasas (**figura 28L panel y figura 28 panel inferior**). Estas observaciones fueron consistentes en el ensayo en caja y en el ensayo turbidimétrico.

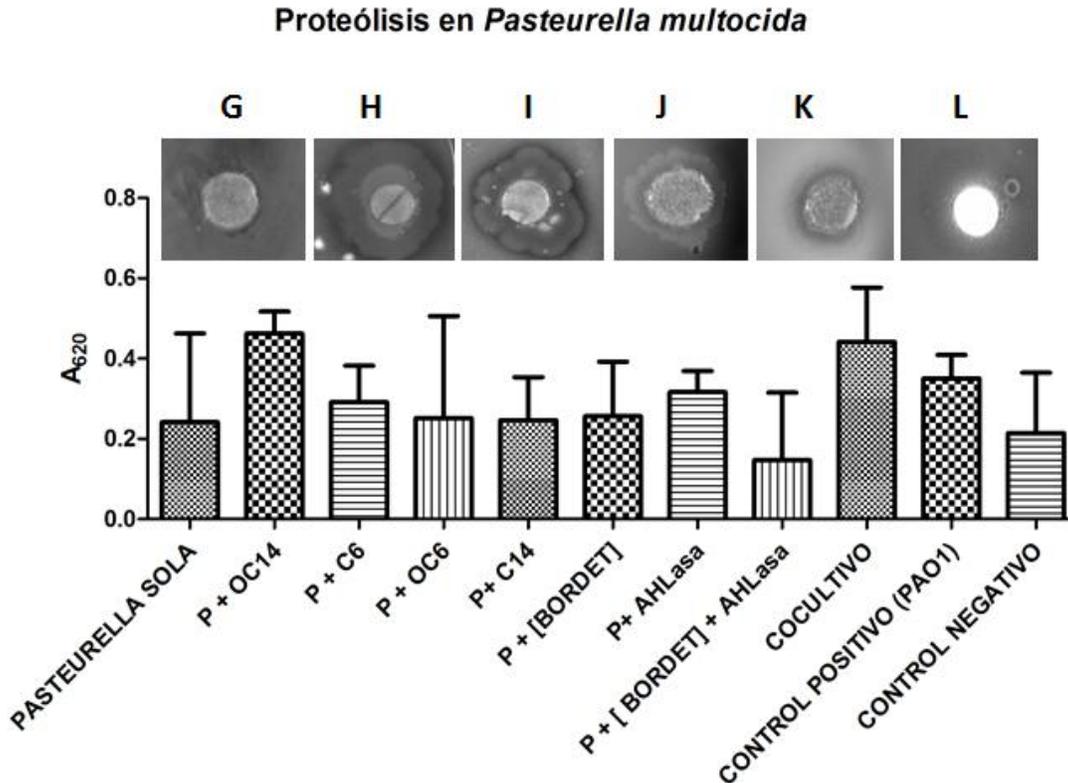


Figura 28. Influencia de algunas AHLs sintéticas sobre la expresión de proteasas en *Pasteurella multocida*: Panel superior: ensayos en caja de Petri. (A) Solo *Pasteurella* (B) *Pasteurella* + OC14 (C) *Pasteurella* + C6 (D) *Pasteurella* + OC6 (E) *Pasteurella* + C14 (F) *Pasteurella* + lactonasa AiiA Panel inferior: ensayos turbidimétricos. **Pasteurella sola:** suspensión celular de *P. multocida* sin tratamiento. **P + OC14:** suspensión celular de *P. multocida* tratada con oxotetradecanoil-DL-acil homoserín lactona. **P + C6:** suspensión celular de *P. multocida* tratada con la hexanoil-DL-acil homoserín lactona. **P + OC6:** suspensión celular de *P. multocida* tratada con la β-cetocaproil-DL-acil homoserín lactona. **P + C14:** suspensión celular de *P. multocida* tratada con tetradecanoil-DL-acil homoserín lactona. **P + AHLasa:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con el sobrenadante de medio de cultivo de la cepa *E. coli* pCCB6 productora de la lactonasa recombinante AiiA. **P + [BORDET]+AHLasa:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con el sobrenadante de medio de cultivo de *P. multocida* y con el sobrenadante de medio de cultivo de la cepa *E. coli* pCCB9 productora de la lactonasa recombinante AiiA-

Se investigó también el efecto de las AHLs sintéticas sobre la hemólisis producida por *Pasteurella* o *Bordetella*. Aunque en *P. multocida* no se encontró un efecto de las AHLs sobre degradación de células rojas en caja de Petri o en los ensayos semicuantitativos, en *Bordetella* se observó un efecto de la producción de enzimas hemolíticas en presencia de las AHLs C6 y C14 (figura 29C y 29E). A pesar de que en la caja de Petri no se observó la producción de hemólisis en presencia de la homoserín lactona OC14, en el ensayo de turbidimetría se observó un marcado aumento de la hemólisis cuando la bacteria se sometió a este mismo tratamiento. En presencia de la enzima recombinantes AiiA capaz

de degradar las AHL se encontró la represión de la producción de hemólisis aunque en un nivel muy bajo

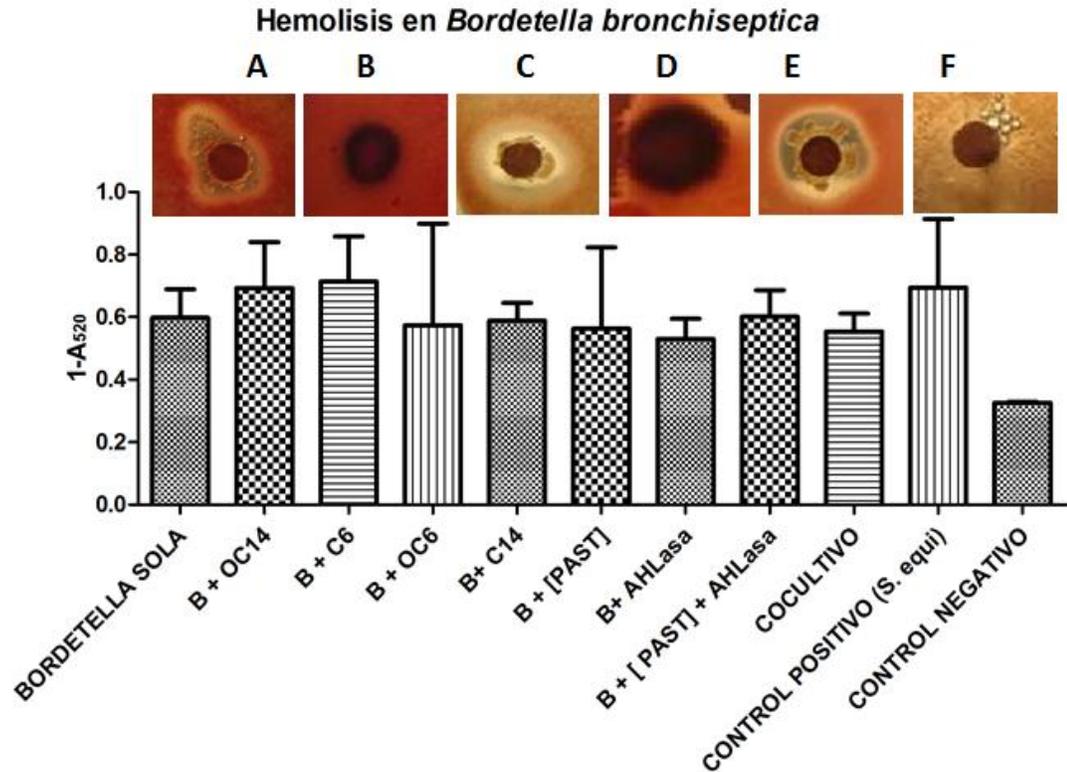


Figura 29. Influencia de algunas AHLs sintéticas sobre la producción de hemolisina en *Bordetella bronchiseptica*: En la gráfica se muestran las absorbancias promedio del producto de hemólisis. **Panel superior:** ensayos en caja de Petri. **(A)** Solo *Bordetella* **(B)** *Bordetella* + OC14 **(C)** *Bordetella* + C6 **(D)** *Bordetella* + OC6 **(E)** *Bordetella* + C14 **(F)** *Bordetella* + lactonasa AiiA **Panel inferior:** ensayos turbidimétricos. **Bordetella sola:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* sin tratamiento. **B + OC14:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con Oxotetradecanoil-DL-acil homoserín lactona. **B + C6:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con la hexanoil-DL-acil homoserín lactona. **B+OC6:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con la β-cetocaproil-DL-acil homoserín lactona. **B + C14:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con tetradecanoil-DL-acil homoserín lactona. **B + AHLasa:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con el sobrenadante de medio de cultivo de la cepa *E. coli* pCCB6 productora de la lactonasa recombinante AiiA. **B + [PAST]+AHLasa:** suspensión celular de *B. bronchiseptica* tratada con el sobrenadante de medio de cultivo de *P. multocida* y con el sobrenadante de medio de cultivo de la cepa *E. coli* pCCB9 productora de la lactonasa recombinante AiiA. Las absorbancias son el promedio de 3 experimento independientes

7 DISCUSIÓN

La señalización entre células bacterianas es uno de los paradigmas más importantes de la microbiología del siglo 21 puesto que revela una gran gama de interacciones que son reguladas y coordinadas a nivel molecular. En muchos ámbitos de la biología bacteriana, pero principalmente en la interacción bacteria-hospedero, el intercambio de señales químicas entre células determina la capacidad de colonización de la bacteria y la perpetuación de rasgos genotípicos importantes para su adaptación en los microambientes. Por más de un siglo, durante el estudio de las infecciones respiratorias, se consideró a las células procariontas como importantes actores del desarrollo de las enfermedades, sin embargo, pocas veces se pensó en ellas como organismos que durante su reproducción en los tejidos del hospedero, cooperan e interactúan con otros componentes bióticos haciendo de la infección un proceso dinámico. Actualmente, debido al descubrimiento del *Quorum Sensing* y a las aproximaciones metodológicas para su estudio, entendemos mejor el papel de las células bacterianas en el desarrollo de patologías como la Fibrosis Quística, las neumonías bacterianas y otras importantes enfermedades del tracto respiratorio. Un ejemplo de estas enfermedades inexploradas es la Rinitis Atrófica Degenerativa, patología que ha llamado la atención de muchos investigadores a nivel mundial, debido a la regulación de la virulencia que parece existir entre *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*. Además, la enfermedad es interesante ya que se cuenta con poca información sobre las condiciones bajo las que las dos bacterias desatan el arsenal de moléculas nocivas para el animal, generando la aparición de signos clínicos. La RA ha sido estudiada como enfermedad modelo por varios años y ya se tienen establecidos los principales indicadores de anomalía funcional y deterioro del órgano nasal. Se conocen los indicadores específicos presentes cuando cada bacteria está actuando por separado (**Ackerman et al, 1997; Gallego, 2006; Esquinas, 2007**) o cuando las dos bacterias convergen en un mismo nicho y hábitat para aprovechar los recursos presentes en los tejidos del tracto respiratorio del animal (**Rhodes et al, 1987; Deeb et al, 1990**). Por esta razón, el modelo de la RA en cornetes de conejo se presenta como una herramienta adecuada para el estudio de las interacciones entre bacterias de la biota normal y entre estas y su hospedero. Se sabe que *P. multocida* coloniza el epitelio respiratorio de una forma lenta y progresiva dependiendo entre otras cosas, de la composición capsular de su superficie, de modo que ha sido calificada como una debil

colonizadora (**Dugal et al, 1992; Al-hawaddi et al, 2000**). Se ha demostrado que *Bordetella bronchiseptica* induce de la adhesión de *Pasteurella multocida* serotipo D al tracto respiratorio de cerdos, independie de la producción de la toxina dermonecrótica de *B. bronchiseptica* (**Brockmeier & Register, 2007, Dugal et al, 1992**). A pesar de que se ha reportado esta inminente relación entre las bacterias y de que esta reñación indica algún tipo de señalización entre ellas en el tracto respiratorio, aún no se ha propuesto un posible mecanismo de comunicación célula a célula.

En este trabajo se presenta el estudio de la interacción entre *P. multocida* y *B. bronchiseptica* bajo una novedosa aproximación metodológica que involucra la interacción bacteriana en el tejido en el que se produce la RA. Los aspectos considerados en este trabajo permiten sugerir que la dinámica entre las dos bacterias durante su colonización al epitelio, se rige por un sinergismo que probablemente ocurre *in vivo* y a una modulación de la virulencia en presencia de moléculas en el medio de cultivo de cada una de las bacterias. Esta interacción parece no ser unidireccional, presentando más bien una bidireccionalidad (cada bacteria genera una respuesta a su contraparte) dada por la producción de sustancias extracelulares sintetizadas por cada una de estas dos especies. En esta dinámica se evidencia una considerable respuesta de virulencia al estímulo con dichos factores.

Influencia de la señalización celular en los cambios histopatológicos

Los análisis histopatológicos con H&E mostraron que hay una diferencia entre los cambios celulares presentes cuando las bacterias se inoculan por separado, cuando están juntas y cuando cada especie se estimula con el sobrenadante de medio de cultivo de su contraparte (*Pasteurella* estimulada con el sobrenadante de *Bordetella* y viceversa) (**figura 9, figura 10 y tablas 5 y 6**).

Los cambios celulares observados en los tratamientos de inoculación con monocultivos de estas dos especies bacterianas coincidieron con los reportes previos de RA inducida *in vitro* e *in vivo* por *P. multocida* (**Al-hawaddi et al, 1999; Al-hawaddi et al, 2000**) y *B. bronchiseptica* (**Collings & Rutter, 1985; Ackerman et al, 1997**) aunque en un menor nivel de severidad (**figura 9Ay 9B**). De acuerdo con lo reportado por Iregui y Gallego en 2006 y por Iregui y Esquinas en 2007, la inoculación con *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida* por separado, genera un gran número de cambios morfológicos

celulares entre los cuales se encuentran la necrosis del tejido y otros indicadores como la actividad de células caliciformes y la vacuolización intracitoplasmática (**figura 4**). A pesar de haber usado en este trabajo únicamente microscopía convencional herramienta de magnificación, existe correspondencia con lo reportado por la inoculación *in vitro*, hecha en otros trabajos.

Como se ha mostrado en otras investigaciones, *Bordetella bronchiseptica* interactúa con el epitelio, generando un rearrreglo deletéreo para el órgano nasal que probablemente promueve la susceptibilidad en este y permite que una mayor cantidad de recursos necesarios para el crecimiento de *Pasteurella* estén disponibles (**Collings & Rutter, 1985; Gallego, 2006**). Los cambios celulares observados indican que los mecanismos de colonización de *B. bronchiseptica* en el explante probablemente son más minuciosos en la cavidad nasal y corresponden a interacciones muy precisas entre los receptores en el hospedero y los ligandos bacterianos, tal como se ha demostrado previamente inoculando el animal vivo (**Irie & Yuk, 2007**).

Una vez inoculado el tejido con las suspensiones celulares de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*, previamente estimuladas con los sobrenadantes de sus contrapartes, se observó un marcado cambio en la frecuencia de las alteraciones morfológicas celulares y en su distribución (**figura 10**). Como evidencia de la señalización celular bacteriana, algunos de los cambios en el cornete fueron diferenciales cuando el tejido fue inoculado con suspensiones celulares de las bacterias estimuladas con los sobrenadantes de medio de cultivo de sus contrapartes. Principalmente se encontraron cambios en los indicadores de interacción de *P. multocida* con el epitelio, como la pérdida de cilias y los espacios interepiteliales dilatados. También en los tratamientos con *Bordetella bronchiseptica* estimulada, se encontraron respuestas variable en los patrones de muerte celular y vacuolización intracitoplasmática (**figura 12**). Algunos de estos hallazgos han sido reportados en cerdos con atrofia de cornetes inducida *in vitro*, inoculando las dos bacterias al tiempo. En estos animales, los tejidos analizados al microscopio revelan justamente el mismo patrón de cambio observado en los experimentos llevados a cabo en este trabajo (**Jordan & Roe, 2004; Brockmeier & Register, 2007**).

Por otra parte, tras la aplicación de los tratamientos en los que las suspensiones celulares de las bacterias se estimularon con los sobrenadantes de medio de cultivo de sus

contrapartes, se observó la pérdida de la homogeneidad del tejido siendo este hallazgo un importante marcador que sugiere que el efecto de los sobrenadantes sobre el epitelio va más allá de la acción de factores como la endotoxina del LPS o la desnutrición del explante. Probablemente, la producción de otras moléculas que contribuyen a la patogénesis está incrementada.

Una observación importante en este trabajo, que resultó ser gran evidencia de señalización celular, es el aumento de la interacción entre *P. multocida* y el borde ciliado del epitelio cuando la bacteria fue estimulada con el sobrenadante de *B. bronchiseptica*. Este resultado apoya lo reportado por otros autores (**Dugal et al, 1992**) y sugiere, como se ha mencionado previamente, que la adhesión de *P. multocida* al epitelio del cornete aumenta por efecto de algún factor producido por *B. bronchiseptica*.

En la anatomopatología del explante (**figuras 11 y 12**) se muestran los cambios celulares generados por *P. multocida* y *B. bronchiseptica* estimuladas con sobrenadantes de las contrapartes, estos, sometidos a temperaturas de desnaturalización de las exoenzimas más importantes de ambas bacterias. Este experimento muestra que la acción del sobrenadante de cada bacteria sobre la suspensión celular de la bacteria contraria, no se limita a la simple suma de las acciones enzimáticas individuales, sino que consta de una inducción, producto de la acción de alguna molécula en el sobrenadante de medio de cultivo. Como se muestra en los experimentos con explantes, hay un cambio evidente en el patrón de aparición de lesiones epiteliales en presencia del sobrenadante desnaturalizado de cada cepa.

En algunos casos, como en la aparición de células muertas, descamadas y vacuolizadas, la regulación parece provenir de ambas partes, pues tanto en *P. multocida* como en *B. bronchiseptica*, la presencia del sobrenadante desnaturalizado restablece el patrón de cambios que se observa cuando cada bacteria no está estimulada por este sobrenadante. La pérdida de cilias es también un tipo de cambio celular que mostró respuestas contrastantes en los experimentos. En *B. bronchiseptica*, el sobrenadante de *P. multocida* no ejerce ningún efecto en la aparición del cambio celular, y el sobrenadante desnaturalizado tampoco parece tener ninguna influencia. Este patrón contrasta con el que se observa cuando *P. multocida* es estimulada con el sobrenadante de *B. bronchiseptica*. Allí, los conteos celulares son altos indicando claramente el efecto positivo de expresión de determinantes de virulencia en el tejido *in vitro*. Estos conteos celulares

vuelven a ser bajos, cuando se adiciona el sobrenadante desnaturalizado de la bacteria, indicando que el factor que regula estos rasgos está en el sobrenadante y es probablemente susceptible a cambios en la temperatura. Este patrón de reaparición de cambios celulares después de tratamiento con sobrenadante desnaturalizado también se reflejó en la hiperactividad de células caliciformes. Sin embargo la determinación de este tipo de perturbación en el epitelio está sesgada por el efecto del medio de cultivo que estimula también la producción de mucinas en estas glándulas, debido a la alta sensibilidad de los receptores celulares en esta línea celular. Aplicando el sobrenadante de las bacterias sometido al calor, sobre las células completas, no se observa ningún cambio en el patrón de aparición de células inflamatorias como heterófilos.

Estas observaciones permitieron establecer que los sobrenadantes de medio de cultivo de una bacteria tienen dos tipos de efecto sobre la otra: un efecto inductor cuya consecuencia es la posible activación de mecanismos que aumentan la aparición de cambios celulares relacionados con la enfermedad y un efecto represor por el cual se produce la disminución de la frecuencia de cambios celulares observados, en comparación con los cambios que se presentan al inocular explantes con los monocultivos de las bacterias. Los tres indicadores que bajo alguno de los dos efectos mencionados estuvieron representados en tratamientos que involucran la estimulación con los sobrenadantes de las bacterias son: la vacuolización, la aparición de espacios interepiteliales y la muerte celular. Estos indicadores parecen relacionarse mejor con la patogénesis bacteriana y surgen durante la co-infección entre *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*. Las respuestas diferenciales de estos cambios representan los posibles mecanismos de múltiple regulación de la expresión de determinantes de virulencia, que modulan el asentamiento de las bacterias sobre el epitelio, siendo entonces la adhesión de las células al epitelio y la modificación estructural del tejido las primeras vías de colonización al inicio de la enfermedad. Además, el aumento de algunos indicadores de patología que solo se detectan en el co-cultivo y que probablemente se expresan de manera constante y en mayor medida *in vivo*, pone en evidencia la señalización celular entre las dos bacterias.

Pasteurella multocida y *Bordetella bronchiseptica* han estado en la mira de los investigadores de las enfermedades respiratorias en animales debido a las relaciones poco entendidas que presentan *in vivo*. Estas bacterias poseen un gran arsenal molecular

con el cual logran perpetuar su estirpe y colonizar sus hospederos y tienen una alta especificidad por los tejidos que colonizan, los hospederos con que se relacionan y las células con las cuales interactúan. Los indicadores que se relacionan con la integridad del epitelio (dilatación de espacios interepiteliales, pérdida de cilias y vacuolización) en algunos casos se vieron inducidos por las suspensiones celulares estimuladas con los sobrenadante de medio de cultivo. Los cambios notorios como el aumento de células vacuolizadas y con pérdida de cilias sugieren que alguna molécula presente en el sobrenadante de medio de cultivo, influencia el comportamiento de las bacterias haciendo que estas coordinen actividades con el fin de conseguir la colonización exitosa del microambiente. Claramente, existe una marcada influencia de los sobrenadantes de medio de cultivo bacteriano en la aparición de indicadores celulares de patología, principalmente aquellos que pueden ser determinados durante el tiempo de incubación del explante y que en la práctica se considerarían cambios celulares leves que se asocian a las primeras horas de inoculación del tejido. A pesar del tiempo corto de incubación también se encontraron unos importantes cambios (moderados a severos) después de inocular los explantes con *Pasteurella multocida* previamente estimulada con el sobrenadante de *Bordetella bronchiseptica*. Estos cambios celulares aunque de poca extensión son multifocales y aportan fuertemente al desarrollo de la patología y se relacionan con una alta actividad de células caliciformes, vacuolización intracitoplasmática y generación de espacios interepiteliales. Como modelo de infección, el organocultivo de cornete de conejo permitió identificar los principales cambios celulares en el epitelio respiratorio dependiendo del tipo de tratamiento aplicado y constituyó una buena herramienta para el hallazgo de indicios de comunicación entre las dos bacterias.

Estos experimentos son evidencia de cómo la presencia de los productos de las bacterias, se acumulan en el medio de cultivo y son los responsables de la regulación de la virulencia, representada en la producción de cambios celulares en el explante. De esta manera, se soporta la teoría de que la comunicación celular influencia de diferentes formas, el comportamiento de las bacterias en el tejido. Los patrones morfológicos asociados a los tratamientos con células estimuladas por los sobrenadantes, muestran que el proceso infeccioso es coordinado y no es únicamente la suma de la acción de cada bacteria. En esta enfermedad, aún se desconocen los mecanismos por los cuales la interacción regula el proceso infeccioso. Sin embargo, teniendo en cuenta algunos factores determinantes de señalización, estos resultados se pueden aproximar a una idea

de comunicación célula a célula. Como ya lo han reportado algunos autores, *P. multocida* es capaz de producir el autoinductor 2 (AI-2) al igual que muchas especies cercanas a ella y aunque estos estudios solo han demostrado la producción de la molécula autoinductora, en otras especies bacterianas el AI-2 es un importante mediador de expresión de genes de virulencia (**Armbruster et al, 2009; Malott & Lo, 2002**). Por otra parte, se sabe que algunos sistemas de dos componentes responden a moléculas de señalización y regulan la expresión de genes de virulencia. En *V. harveyi* el AI-2 es reconocido a través de una quinasa sensora en la membrana externa de la célula y al igual que en esta bacteria, *B. bronchiseptica* posee un sistema de dos componentes (*bvgS/A*) que controla la expresión de rasgos de virulencia y que podría ser susceptible a la estimulación con alguna molécula de señalización. Es probable que la producción del AI-2 en *P. multocida* afecte la expresión de estos genes en *B. bronchiseptica* y que el sistema de dos componentes de esta bacteria sea capaz de reconocer esta molécula en una forma inespecífica. Esto aún tiene que ser probado con experimentos rigurosos diseñados para indicar si estos sistemas son conservados en estas dos especies o en algunas especies relacionadas.

Papel del Quorum Sensing en la virulencia bacteriana

Además de mostrar evidencia de señalización, este trabajo muestra el papel de las AHLs en el desarrollo de la patogénesis *in vitro* (**figura 26**). En estos experimentos se usaron AHLs de cadena mediana y de cadena larga con el fin de comparar la respuesta de las bacterias ante estas dos moléculas de estructura divergente. A través de estos ensayos se observó una marcada influencia de las AHLs de cadena larga en la virulencia de ambas bacterias. Estos señalizadores mostraron la capacidad de aumentar y de disminuir la ocurrencia de cambios celulares en el explante. Como se mostró previamente, la suspensión celular de *Bordetella bronchiseptica* estimulada con las homoserín lactonas de cadena larga (C14 y OC14) indujo un aumento del número de células picnóticas en el explante. Este fenotipo, que se veía reprimido en los ensayos con sobrenadantes de medio de cultivo, aumentó considerablemente en los experimentos con las 2 AHLs largas, respecto al control. Por el contrario, las suspensiones celulares de *Pasteurella multocida* estimuladas con estas mismas AHLs indujeron en el epitelio la reducción del número de células picnóticas y muertas, sugiriendo entonces que la inducción de este marcador de patología podría estar supeditada a la producción de una molécula señalizadora en *Bordetella bronchiseptica*, que modula la virulencia de *Pasteurella multocida* o una

molécula señalizadora producida por *P. multocida*, que por el contrario aumenta la virulencia de *B. bronchiseptica*. Además, se encontró que las AHLs de cadena corta (C6 y OC6) también tienen un efecto modulador sobre las bacterias y que este efecto contrasta con los resultados obtenidos en los explantes inoculados con las suspensiones celulares estimuladas con los sobrenadantes de medio de cultivo de las bacterias (**figuras 9,10 y 26**). Esta es la primera aproximación al estudio de la RA desde el punto de vista del QS en el cual se evidencia un cambio importante en los patrones cambios morfológicos celulares cuando las bacterias se estimulan con AHLs.

Otros experimentos, en los cuales se usó la lactonasa AiiA producida por la cepa *E. coli* pCCB9, mostraron un efecto de la degradación de homoserín lactonas en los experimentos. La presencia de la enzima lactonolítica mostró un efecto en el cual, la degradación de AHLs en los explantes inoculados con *P. multocida*, permitió que la bacteria generara en el tejido, la pérdida considerable de cilias (**Anexo D, Figura B**). Estas observaciones muestran que, en presencia de AHLs es probable que la bacteria reprima los mecanismos necesarios para una eficiente interacción con el epitelio.

Regulación de la producción de factores de virulencia en *P. multocida* y *B. bronchiseptica*

Al comparar los hallazgos de la expresión de algunos factores de virulencia y la anatomopatología del explante, se encontró concordancia en algunos hechos. El primero fue la influencia del sobrenadante de *B. bronchiseptica* en la expresión de proteasa de *P. multocida* en el ensayo en caja de Petri. Esta expresión está de acuerdo con el aumento pérdida de cilias y muerte celular y es un buen indicador de la potenciación de la expresión de estas enzimas durante la infección *in vitro*, puesto que en varios reportes, se ha estimado la baja capacidad de colonización del epitelio cuando *P. multocida* se encuentra sola. Esta baja capacidad se relaciona con la imposibilidad de generar cambios en el borde ciliado del tejido y en la pobre translocación de la bacteria lejos de la luz del órgano. Como se ha reportado una vez adherida al epitelio y dependiendo de la cepa, *P. multocida* genera una estrecha relación con el borde ciliado del tejido epitelial y al parecer el primer paso de la colonización es la adhesión a la capa más externa en la mucosa nasal generando un rearreglo en la F actina con lo cual es interiorizada en vesículas dirigidas por ella misma (**Rabier et al, 1997**). En *B. bronchiseptica* no se observó la potenciación de la expresión de proteasa en caja e incluso se observó una leve

disminución de la proteólisis determinada por turbidimetría (**figura 14**). La disminución de la actividad proteolítica en *B. bronchiseptica* tratada con el sobrenadante de *P. multocida* está en concordancia con lo observado en el explante en donde se encontró un efecto inhibitorio de la aparición de número de células muertas y con pérdida de cilios. Estos resultados soportan la hipótesis de comunicación intercelular entre las dos bacterias, pues el efecto encontrado se repite incluso en los experimentos en caja, fuera del explante. En bacterias como *Pantoea stewartii* se han identificado reguladores negativos de la expresión de factores de virulencia como el exopolisacárido el cual no se expresa en presencia de la proteína EsaR (homóloga de LuxR en *Vibrio fischeri*). Sin embargo, en presencia de concentraciones micromolares de acil homoserín lactonas, el promotor del gen es liberado, llevando a la expresión controlada del EPS (**Beck von Bodman et al, 1998**). La evidencia muestra la posibilidad de este tipo de comunicación y regulación siendo *Pasteurella multocida* la emisora de la señal que reprime los factores de virulencia de *Bordetella bronchiseptica* que inducen la aparición de cambios celulares relacionados con la muerte celular y la perturbación del epitelio a nivel estructural (pérdida de la arquitectura). La relación entre las dos bacterias se presenta un poco más complicada debido a que no en todos los factores de virulencia expresados hay únicamente un sentido y dirección de la regulación en presencia de los sobrenadantes. Por ejemplo, *B. bronchiseptica* es capaz de generar la represión de la producción de lipasa y la potenciación de la expresión de proteasas en *P. multocida* mientras esta última bacteria potencia la expresión de lipasa y la represión de proteasa, mostrando una posible coordinación de los papeles de cada bacteria durante la infección. Como se ha mostrado en otras investigaciones, existe dependencia de *P. multocida* en *B. bronchiseptica* durante la colonización del epitelio. Los ensayos en los cuales se aplicó la enzima lactonolítica a cultivos de *P. multocida* y *B. bronchiseptica* mostraron que algunos fenotipos de virulencia (como la proteólisis) desaparecen cuando las AHLs han sido degradadas, sugiriendo que la producción de factores de virulencia, como en otras bacterias Gram negativas, está regulada por **QS**. Estos datos confirman la veracidad de lo observado en el explante y además sugieren que los uno de los factores de virulencia utilizados en los cambios relacionados con la pérdida de la arquitectura del epitelio se basa en la proteólisis de los componentes celulares y las uniones entre las células del mamífero. Con estos resultados se confirma que el sobrenadante de medio de cultivo de cada bacteria, repercute en la producción de determinantes de virulencia, en su contraparte.

Moléculas de señalización producidas por *P. multocida* y *B. bronchiseptica*

En la búsqueda de una *N*-acil homoserín lactona o una molécula similar, mediadora de la regulación de la patogenicidad bacteriana en este modelo de infección, se llevaron a cabo ensayos con biosensores capaces de detectar estas moléculas de señalización. Los primeros intentos de detección en caja de Petri, sembrando el biosensor cerca de la bacteria a evaluar no mostraron ningún resultado positivo. Con base en estas observaciones se realizaron ensayos en lo que se consideró la posibilidad de que las bacterias produjeran una baja cantidad de la molécula y se hicieron enfrentamientos de los biosensores a siembras masivas de las bacterias. En estos ensayos se encontró una leve inducción de los fenotipos reporteros en los biosensores de AHLs de cadena larga *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) y *S. meliloti* Rm11558 (pJNSinR) (**figura 22**). La siembra masiva de las bacterias permitió mostrar que la producción de la molécula señalizadora tipo AHL, se da en bajas concentraciones. Por esto, posteriormente se concentraron muestras de sobrenadante de medio de cultivo que posiblemente contienen estas moléculas llevando a cabo extractos de los sobrenadantes con diclorometano y acetato de etilo, según protocolos reportados previamente (**Shae et al, 1997; McLean et al, 1997**). Estos extractos fueron impregnados en discos de papel y enfrentados el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) esperando que la leve inducción observada en los ensayos con las células bacteriana completas fuera mucho mayor (**figura 23**). Sorprendentemente no se encontró la inducción del fenotipo reportero con el extracto de *Bordetella bronchiseptica*. Sin embargo, al enfrentar el biosensor al extracto del sobrenadante de *Pasteurella multocida* o del cultivo mixto, se encontró la inducción del fenotipo reportero (**figura 23 y figura 24 panel superior**). Posteriormente, se demostró que efectivamente el extracto de medio de cultivo de la inoculación mixta con *Pasteurella* y *Bordetella* induce la expresión del gen reportero en el biosensor y que además, de una manera incipiente, el extracto del sobrenadante de *Pasteurella* también induce la expresión del gen *LacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa y con esto, la consecuente degradación del sustrato X-gal. Para poder obtener una mayor cantidad de la molécula de señalización, se levó a cabo la extracción de AHLs con diclorometano, en un sistema de flujo continuo que permite al medio de cultivo estar en mayor contacto con el solvente orgánico. Esta metodología permitió recuperar una mayor cantidad del extracto, con lo cual se observó una mayor inducción del fenotipo reportero de la cepa *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) al ser enfrentado con este extracto (**figura 23IIB**). En la búsqueda de una posible

explicación para la producción de AHLs en estas dos bacterias, se llevó a cabo un experimento en el cual, cada bacteria fue inoculada en medio de cultivo condicionado con el sobrenadante de su contraparte, extraído con diclorometano y concentrado por rota-evaporación. Como se vé en la figura **23II-A**, al parecer la producción de AHLs en cada una de estas cepas podría tener un mecanismo intrínseco de regulación en el cual, la producción de AHLs en una de las cepas permite la expresión de los genes encargados de la biosíntesis de la molécula señalizadora, en la cepa contraria. Esto se ha demostrado en los circuitos jerárquicos de *Pseudomonas aeruginosa* y en su interacción con *Burkholderia cepacia* pero nunca se había explorado en la rinitis atrófica degenerativa

Finalmente los extractos de medio de cultivo fueron eluidos en una matriz de silica RP-18 y revelados con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), con el fin de separar las posibles moléculas tipo AHL producidas por las bacterias. En estos ensayos aunque en el cromatofolio no se encontraron puntos relacionables con las AHLs de los patrones, si se pudo observar la leve inducción del fenotipo reportero en la base del mismo indicando que la molécula que induce la expresión de la β -galactosidasa tiene una cadena larga apolar que es retenida por la matriz durante la elución con la fase móvil. Este es el primer reporte de la existencia de un molécula tipo AHL en *Pasteurella multocida*.

Este trabajo es una nueva aproximación al estudio de las enfermedades respiratorias de origen infeccioso (particularmente en la RA), en la que la etiología de la enfermedad no se considera como un evento determinado por la presencia o ausencia de un agente únicamente, sino por la ocurrencia de las interacciones entre algunos miembros de la comunidad bacteriana presente en el órgano nasal. En esta investigación se encontró un tipo de interacción en el que las bacterias responden de manera gradual al estímulo con moléculas producidas por otras células a su alrededor y esto regula la expresión de determinantes que generan también una respuesta en el hospedero. En el modelo que se muestra en la **figura 30**, se proponen las vías de regulación probables observadas en el explante *in vitro*. En este modelo se sugiere la represión de algunos factores de virulencia por el sobrenadante de medio de cultivo bacteriano con la consecuente disminución de algunos indicadores de patología a nivel celular en el explante, mientras que se observa la sobreproducción de otros factores que permiten el aumento de algunos cambios celulares en el explante de cornete. Se muestra también, como las AHLs tuvieron una influencia en la aparición de estos cambios en el explante y como en *Pasteurella* y *Bordetella* la

inducción de la síntesis de estas AHLs es diferencial y parece estar regulada, así mismo, por la interacción entre las dos bacterias.

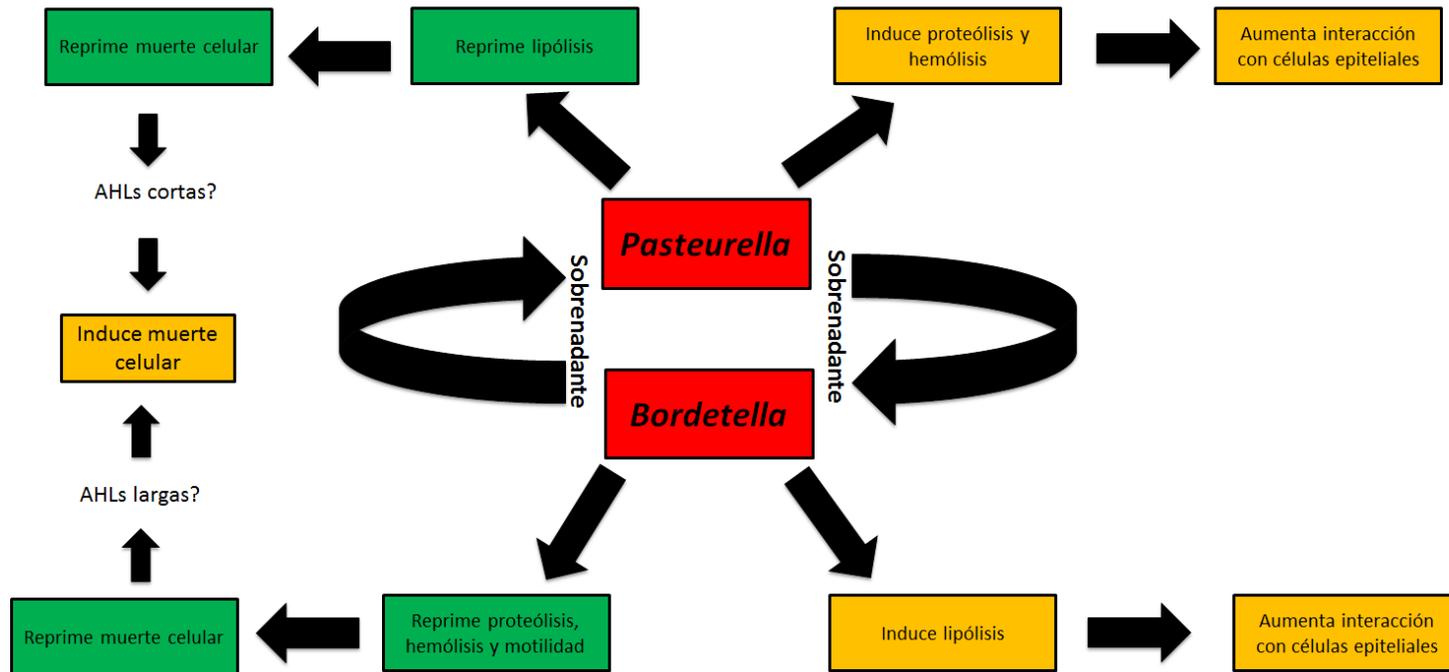


Figura 30. Modelo de interacción propuesto según los hallazgos en explantes cultivado *in vitro*: En la gráfica se muestra el modelo de interacción entre *P. multocida* y *B. bronchiseptica* propuesto en este trabajo como una posibilidad de interacción. En verde se señalan el efecto represor del sobrenadante bacteriano y en amarillo se muestra el efecto inductor del mismo.

Rinitis atrófica degenerativa y señalización celular entre bacterias

Los resultados expuestos en este documento muestran como el explante de cornete de conejo propuesto por el laboratorio de patobiología veterinaria es un elemento clave en el estudio de las interacciones ecológicas en el curso de las enfermedades y se convierte con esta investigación en una herramienta para la evaluación de la virulencia bacteriana en ensayos de laboratorio. Más aún, el modelo de explante permitirá en el futuro llevar a cabo estudios de señalización no solamente entre células bacterianas sino que permitirá también entender un poco la interrelación entre la microbiota y su hospedero. Se encontraron varios determinantes de señalización célula a célula entre bacterias que fueron evidentes en las inoculaciones *in vitro* y que soportan y brindan nueva evidencia a las observaciones hechas previamente por expertos en esta enfermedad respiratoria. En el explante, se evidenciaron algunos cambios que únicamente han sido reportados en los casos de rinitis atrófica degenerativa progresiva *in vivo*, con lo cual se sugiere que en la naturaleza la progresión de la enfermedad depende de este tipo de interacción, sumando también otros elementos inherentes al animal como las condiciones ambientales particulares y las características genóticas de las cepas de *Pasteurella* y *Bordetella*. Finalmente en esta investigación se propone la presencia de una molécula con estructura tipo *N*-acil homoserín lactona por medio de la cual estas dos bacterias modulan su virulencia en el epitelio respiratorio y permiten que algunos factores de virulencia se sobreproduzcan mientras que otros se repriman, en una dinámica que tiene el fin de colonizar efectivamente los tejidos del hospedero. A través del uso de biosensores bacterianos de AHLs, de la estimulación de suspensiones celulares con AHLs sintéticas y del uso de la lactonasa AiiA se obtuvo evidencia del papel de la señalización celular a través del *Quorum Sensing* por medio del cual las bacterias regulan la expresión de genes y coordinan actividades durante la infección.

Para entender la influencia de la señalización bacteriana en el desarrollo de patologías como la rinitis atrófica se debe tener en cuenta la evidencia proporcionada por este estudio y proponer futuros proyectos que involucren la señalización entre ellas con otros miembros de la biota nasal e incluso el reconocimiento de moléculas en el hospedero que induzcan la expresión de genes de virulencia. Esta mirada global nos permitirá entender el impacto que tienen estas interacciones celulares en el estado de salud de los animales y

plantear interrogantes acerca de la especificidad, el reconocimiento molecular y el desarrollo de diferentes patologías.

8 CONCLUSIONES

Este estudio preliminar de las interacciones entre las células bacterianas provee información de gran valor para estudios posteriores en la búsqueda de elementos de señalización desde el punto de vista molecular. Con esta evidencia, se concluye que las dos bacterias señalizan a través de moléculas que aún son desconocidas pero que tienen un gran efecto sobre la virulencia y afectan su comportamiento cuando colonizan un mismo tejido.

Bordetella bronchiseptica y *Pasteurella multocida* inducen cambios morfológicos celulares diferentes, dependiendo de si han sido estimuladas o no, con los sobrenadantes de sus contrapartes. Gracias a estas observaciones se plantea que existe influencia de la señalización celular bacteriana en la regulación de la virulencia observada en el explante.

También se encontró que, debido a la señalización, hay efectos de represión o sobreproducción de algunos factores de virulencia. Esto sugiere que *Pasteurella multocida* tiene una influencia sobre la virulencia de *Bordetella bronchiseptica*, lo cual es consistente con lo observado en el explante.

Se detectó además una molécula similar a una AHL, usando el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pLZR4). Esta molécula podría corresponder a una estructura química de cadena larga que induce levemente la expresión del fenotipo reportero y que a medida que aumenta su concentración induce de manera más fuerte ese fenotipo.

Las AHLs de cadena C14 y OC14 y las de cadena corta C6 y OC6 generaron cambios celulares diferenciales en el explante, mostrando así el papel del *Quorum Sensing* en la regulación de la virulencia bacteriana. Esto fue constatado también en los ensayos de producción de factores de virulencia en donde el efecto de las AHLs también generó una respuesta diferencial. Además, la presencia de la lactonasa recombinante AiiA eliminó algunos de los fenotipos observados y en otros casos estimuló su aumento, sugiriendo entonces que definitivamente, las AHLs son el tipo de molécula señal en esta interacción.

Hasta ahora desconocemos la dirección en la cual se produce la señalización o cuáles son los factores celulares que determinan si la regulación es positiva o negativa, no obstante sabemos por los datos presentados en este trabajo que la cooperación entre

Pasteurella y *Bordetella* no es la mera suma de su potencial de virulencia individual sino que es una acción conjunta, sincrónica y regulada durante el curso de la enfermedad respiratoria

9 BIBLIOGRAFIA

Abeynaike, L. Meeusen, E. NT. Bischof, R.J. An ovine explant culture model for allergic airway inflammation. *Journal of Inflammation*. 2010; 7(46): p 1 - 9

Ackerman, M.R. Register, K.B. Gentry-Weeks, C. Gwaltney, S.M. Magyar, T. A porcine model for the evaluation of virulence of *Bordetella bronchiseptica*. *Journal of Comparative Pathology*. 1997; 116(1): p 55 - 61

Akerley, B.J. Monack, M.M. Falkow, S. Miller, J.F. The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *Journal of Bacteriology*. 1993; 174(3): p 980 – 990

Al-haddawi, M.H. Jasni, S. Zamri-Saad, M. Mutalib, A.R. Sheikh-Omar, A.R. Ultrastructural pathology of the upper respiratory tract of rabbits experimentally infected with *Pasteurella multocida* A:3. *Research in Veterinary Science*. 1999; 67(2): p 163-170

Al-haddawi, M.H. Jasni, S. Zamri-Saad, M. Mutalib, A.R. Zulkifli, I. Son, R. Sheikh-Omar, A.R. *In vitro* study of *Pasteurella multocida* adhesion to trachea, lung and aorta of Rabbits. *The Veterinary Journal*. 2000. 159(3): p 274 - 281

Al-haddawi, M.H. Jasni, S. Israf, D.A. Zamri-Saad, M. Mutalib, A.R. Sheikh-Omar, A.R. Ultrastructural pathology of the upper respiratory tract of rabbits experimentally infected with *Pasteurella multocida* D: 1. *Research in Veterinary Science*. 2001; 70(3): p 191-197

Altschul, S.F. Gish, W. Miller, W. Myers, E.W. Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990; 215(3): p 403 – 410.

Araki, H. Kuriyama, T. Nakagawa, K. Karasawa, T. The microbial synergy of *Peptostreptococcus micros* and *Prevotella intermedia* in a murine abscess model. *Oral Microbiology and Immunology*. 2004; 19(3): p 177-181

Armbruster, C.E. Hong, W. Pang, B. Weimer, K.E.D. Juneau, R.A. Turner, J. Swords, W.E. Indirect pathogenicity of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in polymicrobial otitis media occurs via interspecies quorum signaling. *mBio*. 2010; 6(1): pii e00102 – e00110

Atkin, C.L. Neilands, J.B. Phaff, H.J. Rhodotorulic acid from species *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* and *Sporobolomyces* and a new alanine containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. *Journal of Bacteriology*. 1970; 103(3): p 722 – 733

Avila, M. Ojcius, D.M. Yilmaz, Ö. The oral microbiota: Living with permanente guest. *DNA Cell and Biology*. 2009; 8(28): p 1 – 7

Bacha, W.J. Bacha L.M. Veterinarian Histology. Second Edition. Lippincot Williams & Wilkins. 1990

Bassler, B. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by *Quorum Sensing*. Current Opinion in Microbiology. 1999; 2(6): p 582-587

Brow, W.R. Krook, L. Pond W. G. Atrophic rhinitis in swine. Etiology, pathogenesis and prophylaxis. The Cornell Veterinarian. 1966; 56(Suppl. 1): p1–108

Boyce, J.D. Adler, B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B: 2). Infection and immunity. 2000; 68(6): p 3463 – 3468

Bosch, M. Garrido, M.E. Llagoster, M. Perez de Rosas, A.M. Badiola, I. Barbé, J. Characterization of *Pasteurella multocida hgbA* gene encoding Hemoglobin-binding protein. Infection and Immunity. 2002; 70(11): p 5955 – 5964

Brockmeier, S. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. Veterinary Microbiology. 2004, 99(1): p 75-78

Brockmeier, S. L. Register, K.B. Expression of dermonecrotic toxin by *Bordetella bronchiseptica* is not necessary for predisposing to infection with toxigenic *Pasteurella multocida*. Veterinary Microbiology. 2007; 125(3-4): p 284 – 289

Cardenas, A. Rodriguez-R, L.M. Pizarro, V. Cadavid, L.F. Arévalo-Ferro, C. Shifts in bacterial communities of two caribbean reef-building coral species affected by white plague disease. The ISME Journal. 2012; 6(3): p 502 - 512

Carvalho, E. Barbosa, A.S. Gómez, R.M. Cianciarullo, A.M. Hauk, P. Abreu, P.A. Fiorini, L.C. Oliveira, M.L.S. Romero, E.C. Concales, A.P. *et al.* Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. FEBS Letters. 2009; 583: p 1381 – 1385

Casadevall, A. Pirofski, L.A. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. Journal of Water and Health. 2009; 7(1): S2-S18

Chen, I. Pauslen, D.B. Scruggs, D.W. Banes, M. M. Reeks, B.Y. Lawrence, M.L. Alteration of adenine methylase (Dam) activity in *Pasteurella multocida* causes increased spontaneous mutation frequency and attenuation in mice. Microbiology. 2003; 149(Pt 8): p 2283 – 2290

Ciprián, A. Pijoan, C. Cruz, T. Camacho, J. Tórtora, J. Colmenares, G. López-Revilla, R. de la Garza, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. Canadian Journal of Veterinary Research. 1988; 52(4): p 434 - 438

Coraux, C. Roux, J. Jolly, T. Birembaut, P. Epithelial cell-extracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regenerations. Proceedings of the American Thoracic Society. 2008; 5(6): p 689-694

Collings, L.A. Rutter, J.M. Virulence of *Bordetella bronchiseptica* in the porcine respiratory tract. Journal of Medical Microbiology. 1985; 19(2): p 247 - 255

Cotter, P.A. Miller, J. F. A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* *bvgS* gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. Molecular Microbiology 1997; 24(4): p 671 – 685

Coudert, P. Rideaud, F. Kpodékon, M. Pasteurelloses du lapin: une revue. Revue de Médecine Vétérinaire. 1999; 150(3): p 221 – 232

Cowart, R.P. Bäckström, L. Brim, T.A. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in Atrophic Rhinitis and Pneumonia in Swine. Canadian Journal of Veterinary Research, 1989; 53(3): p 295 - 300

Crystal, R.G. Randell, S.H. Engelhardt, J.F. Voynow, J. Sunday, M.E. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. Proceedings of the American thoracic society. 2008; 5(7): p 772-777

Cuadrado-Silva, T. Aislamiento de *N*-acil homoserin lactonas de algunas bacterias procedentes del mar Caribe colombiano, como evidencia de la existencia de circuitos de *Quorum Sensing*. Tesis de Maestría en ciencias – Química. 2009. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química.

Deeb, B. DiGiacomo, R.F. Bernard, B.L. Silbernagel, S.M. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. Journal of Clinical Microbiology. 1990; 28(1): p 70-75

Donabedian, H. *Quorum Sensing* and its relevance to infectious diseases. Journal of Infection. 2003; 46(4): p 207 – 214

Dow, J.M. Clarke, B.R. Milligan, D.E. Tang, J. Daniels, M.J. Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, the black rot Pathogen. Applied and Environmental Microbiology. 1990; 56(10): p 2994 - 2998

Dugal, F. Bélanger, M. Jacques, M. Enhanced adherence of *Pasteurella multocida* to porcine tracheal Rings preinfected with *Bordetella bronchiseptica*. Canadian Journal of Veterinary Research. 1992; 56(3): p 260 – 264

Dworking, M. Falkow, S. Rosenberg, E. Schleifer, K-H. Stackebrandt, E. The prokaryotes: A Handbook on the biology of Bacteria. 3a edición. Vol 6. 2006. Springer

Escaich, S. Antivirulence as a new antibacterial approach for chemotherapy. Current Opinion in Chemical Biology. 2008; 12(4): p 400 – 408

Esquinas - Castillo, P. Interacción *in vitro* entre la *Pasteurella multocida* y/o su lipopolisacárido con epitelio de septo nasal de conejo. Tesis de Maestría en Anatomopatología veterinaria. 2007. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Fernández-Niño, M.A. Creación de un módulo sintético de comunicación bacteriana mediante redes artificiales de *Quorum Sensing*. Tesis de Maestría en Ciencias – Bioquímica. 2012. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Química.

Frias, J. Olle, E. Alsina, M. Periodontal pathogens produce *Quorum Sensing* signal molecules. *Infection and Immunity*. 2001; 69(5): p 3431 – 3434

Franque, L. W. Was ist die Schnüffelkrankheit der Schweine? *Dtsch. Z. Gesamte Tierheilkd.* 1830; 1:p 75 – 77

Fode-Vaughan, K.A. Wimpee, C.F. Remsen, C.C. Perill Collins, M.L. Detection of bacteria in environmental samples by direct PCR without DNA extraction. *BioTechniques*. 2001; 31(3): p 598 – 607

Gallego, C. Interacción *in vitro* entre la *Bordetella bronchiseptica* y/o su lipopolisacárido con epitelio de septo nasal de conejo. Tesis de Maestría en anatomopatología veterinaria. 2006. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Geisenberger, O. Givskov, M. Riedel, K. Hoiby, N. Tümmler, B. Eberl, L. Production of *N*-acyl homoserine lactones by *P. aeruginosa* isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *FEMS Microbiology Letters*. 2000; 184(2): p 273 - 278

Gerlach, G. von Wintzingerode, F. Middendorf, F.B. Gross, R. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes and Infection*. 2001; 3(1): p 61–72

Gonzalez, J. E. Marketon, M.M. *Quorum Sensing* in nitrogen fixing bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003; 67(4): p 574 - 592

Goodnow, R. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiological Reviews*. 1980; 44(4): p 722 – 738

Greenberg, E.P. Bacterial communication and group behavior. *The Journal of Clinical Investigations*. 2003; 112(9): p 1288 - 1290

Guzman, C.A. Rohde, M. Bock, M. Timmis, K.N. Invasion and intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in mouse dendritic cells. *Infection and Immunity*. 1994; 62(12): p 5528 – 5537

Gyles, C.L. Prescott, J.F. En: Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3a edición. Blackwell publishing. 2004.

Harper, M. Boyce, J.D. Adler, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS. 2006; 265(1): p 1 – 10

Harris, D.L. Switzer, W.P. Turbinate atrophy in young pigs exposed to *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and combined inoculum. American Journal of Veterinary Research. 1968; 29(4): p 777 - 785

Hausman, S. Cherry, J.D. Heininger, U. Wirsing von König, C.H. Burns, D.L. Analysis of proteins encoded by the *ptx* and *ptl* Genes of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. Infection and immunity. 1996; 64(10); p 4020 – 4026

Heurlier, K. Denervaud, V. Haas, D. Impact of *Quorum Sensing* on fitness in *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Medical Microbiology. 2006; 296(2-3): p 93-102

Heddleston, K.L. Gallagher, J.E. Rebers, P.A. Fowl cholera: gel diffusion precipitation test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Diseases. 1972; 16: p 925–936

Hogan, D. *Quorum Sensing*: Alcohols in a social situation. Cell. 2006; 16(12): R457-R458

Hoskins, I. C. Thomas L. H. Lax A. J. Nasal infection with *Pasteurella multocida* causes proliferation of bladder epithelium in gnotobiotic pigs. Veterinary Research. 1997;140: p 22

Hooper, L.V. Bacterial contributions to mammalian gut development. TRENDS in Microbiology. 2004; 12(3): p 130-134

Hubert, B. Riedel, K. Hentzer, M. Heydorn, A. Gotschlich, A. Givskov, M. *et al.* The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 control biofilm formation and swarming motility. Microbiology. 2001; 147(Pt 9): p 2517 - 2528

Hunt, M.L Adler, B. Townsend, K.M. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. Veterinary Microbiology. 2000; 72: p 3 – 25

Iregui, C. Botero, L. Caracterización por inmunohistoquímica de la interrelación entre la *Pasteurella multocida* y la *Bordetella bronchiseptica* con células epiteliales de la cavidad nasal y nasofarínge durante el curso de la neumonía enzootica en conejos. Revista Medicina Veterinaria y Zootencia. 1999; 46: p 21 - 39

Irie, Y. Yuk, M.H. *In vivo* colonization profile study of *Bordetella bronchiseptica* in the nasal cavity. FEMS Microbiology Letters. 2007; 275(2): p 191 – 198

Jacques, M. Parent, N. Foiry, B. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* to Porcine Nasal and Tracheal Epithelial Cells. Canadian Journal of Veterinary Research. 1988; 52(2): p 283 - 285

Jordan, R. Verlander, N. Olowokure, B. Hawker, J. Age, material deprivation and respiratory mortality. *Respiratory Medicine*. 2006; 100: p 1282 – 1285

Jordan, R.W. Roe, J.M. An experimental mouse model of progressive atrophic rhinitis of swine. *Veterinary Microbiology*. 2004; 103(3-4): p 201-207

Kahle, N.A. Brenner-Weiss, G. Overhage, J. Obst, U. Hänsch, G.M. Bacterial quorum sensing molecule induces chemotaxis of human neutrophils via induction of p38 and leukocyte specific protein 1 (LSP1). *Immunobiology*. 2012. En prensa.

Katzuhiro, T. Ishii, Y. Horikawa, M. Matsumoto, T. Miyairi, S. Pechere, J.C. Standiford, T.J. Ishiguro, M. Yamaguchi, K. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer *N*-3-oxodecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infection and immunity*. 2003; 71(10): p 5785 – 5793

Kearns, D.B. A field guide to bacterial swarming motility. *NATURE*. 2010; 8: p 634 - 644

Kumar, S. Nei, M. Dudley, J. Tamura, K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*. 2008; 9(4): p 299 – 306.

Kuriyama, T. Nakagawa, K. Kawashiri, S. Yamamoto, E. Nakamura, S. Karasawa, T. The virulence of mixed infection with *Streptococcus constellatus* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine orofacial infection model. *Microbes and infection*. Institut Pasteur. 2000; 2(12): p 1425 - 1430

Malott, R. J. Lo, R.Y.C. Studies on the production of *Quorum Sensing* signal molecules in *Mannheimia haemolytica* A1 and other Pasteurellaceae species. *FEMS Microbiology Letters*. 2002; 206: p 25-30

Latifi, A. Foglino, M. Tanaka, K. Williams, P. Lazdunski, A. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. 1996. *Molecular microbiology*. 21; p 1137–1146.

Licciardello, G. Bertani, I. Steindler, L. Bella, P. Venturi, V. Catara, V. *Pseudomonas corrugata* contains a conserved *N*-acyl homoserine lactone *Quorum Sensing* system; it's role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response. *FEMS Microbial Ecology*. 2007; 61(2): p 222 - 234

Lipscomb, M.F. Hutt, J. Lovchik, J. Wu, T. Lyons, C.R. The pathogenesis of acute pulmonary viral and bacterial infections: investigations in animal models. *Annual review in Pathology: Mechanisms of Disease*. 2010; 5: p 223 – 252

Locht, C. Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. *International Microbiology*. 1999; 2: p 137 – 144

Lonon, M.K. Woods, D.E. Straus, D.C. Production of Lipases by Clinical Isolates of *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988; 26(5): p 979 - 984

Low, D.A. Weyand, N.J. Mahan, M.J. Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infection and immunity*. 2001; 69(12): p 7197 – 7204

Lowery, C.A. Dickerson, T.J. Janda, K.D Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial *Quorum Sensing*. *Chemical Society reviews*. 2008; 37: p 1337 – 1346

Magyar, T. Lax, A.J Atrophic rinitis En: Brogden, K.M. Guthmiller, J.M. Polymicrobial diseases. ASM Press. 2002

Malott. R.J. Lo R.Y.C. Studies on the production of quorum-sensing signal molecules in *Mannheimia haemolytica* A1 and other Pasteurellaceae species. *FEMS letters in microbiology*. 2002; 206: p 25 - 30

March, J.C. Bentley, W.L. *Quorum Sensing* and bacterial cross-talk in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2004; 15: p 495 – 502

Mattoo, S. Foreman-Wykert, A.K. Cotter, P.A. Miller, J.J. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Frontiers in Bioscience*. 2001; 6: e168 – e186

May, B.J. Zhang, Q. Li, L.L. Paustian, M.L. Whittman, T. S. Kapur, V. Complete genome sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *PNAS*. 2001; 98(6): p 3460 – 3465

Milton, D.L. *Quorum Sensing* in *Vibrios*: complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology*. 2006. 296(2-3): p 61 - 71

Montaraz-Crespo, J.A. *Bordetella bronchiseptica*: su relación con la rinitis atrófica porcina. *Ciencia Veterinaria*. 1987; 4; p 203 – 217

Mole, B.M. Baltrus, D.A. Dangl, J.L. Grant, S.R. Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *TRENDS in Microbiology*. 2007; 15(8): p 363 – 371

McKenney, D. Brown, K.E. Allison, D.G. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: Evidence of interspecies communication. *Journal of Bacteriology*. 1995; 23(177): p 6989-6992

McKnight, S.L. Iglewski, B.H. Pesci. E.C. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl *Quorum Sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2000; 182(10): p 2702-2708

Mutters, R.M. Mouahid, E. Engelhard, E. Mannheim, W. Characterization of the family Pasteurellaceae on the basis of cellular lipids and carbohydrates. *Zentralblatt für bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology*. 1993; 279: p 104–113

- Negrete-Abascal**, E. Tenorio, V.R. de la Garza, M. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Current Microbiology*. 1999; 38(1): p 64-67
- Nesse**, L.L. Berg, K. Vestby, L.K. Olsaker, I. Djonne, B. *Salmonella* Typhimurium invasion of HEp-2 epithelial cell *in vitro* is increased by *N*-acyl homoserine lactone *Quorum Sensing* signals. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2011; 53(44): p 1 - 5
- Ng**, W.L. Bassler, B. Bacterial *Quorum Sensing* Network Architectures. *Annual review of Genetics*. 2009; 43: p 197 – 222
- Pardo-Roa**, M.A. Extracción y purificación de 3-oxo-C8HSL y 3-oxo-C10HSL de *Pseudomonas putida* IsoF. Tesis de Pregrado. 2007. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Departamento de Química
- Parkhill**, J. Sebahia, M. Preston, A. Murphy, L.D. Thomson, N. Harris, D.E. *et al.* Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis* , *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature genetics*. 2003; 35(1): p 36 - 40
- Patriquin**, G.M. Banin, E. Gilmour, C. Tuchman, R. Greenberg, E. P. Poole, K. Influence of *Quorum Sensing* and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2008; 190(2): p 662 - 671
- Podblieski**, A. Kreikemeyer, B. Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *International journal of infectious diseases*. 2004; 8(2): p 81 - 95
- Posá**, R. Donkó, T. Bogner, P. Kovács, M. Repa, I. Magyar, T. Interaction of *Bordetella bronchiseptica* , *Pasteurella multocida* and fumonisin B1 in the porcine respiratory tract as studied by computed tomography. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2011;
- Pouedras** , P. Andre, P.M. Donnio, P.Y. Avril, J.L. Cleavage of immunoglobulin A1, A2 and G by proteases from clinical isolates of *Pasteurella multocida*. *Journal of Medical Microbiology*. 1992; 37(2): p 128-132
- Pratt**, J. Cooley, J.D. Purdy, Ch. W. Straus, D.C. Lipase activity from strains of *Pasteurella multocida*. *Current Microbiology*. 2000; 40: p 306 – 309
- Pedersen**, K.B. Elling, F. The pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs induced by toxigenic *Pasteurella multocida*. *Journal of Comparative Pathology*. 1984; 94(2): p 203 - 214
- Petersen**, K. D. Christensen, H. Bisgaard, M. Olsen, J. E. Genetic diversity of *Pasteurella multocida* isolated from fowl cholera as demonstrated by ribotyping, 16S rRNA and partial *atpD* sequence comparisons. *Microbiology*. 2001; 147: p 2739–2748

Pruneda-Paz, J.L. Linares, M. Cabrera, J.E. Genti-Raimondi, S. TeiR, a LuxR-type transcription factor required for testosterone degradation in *Comamonas testosterone*. Journal of Bacteriology. 2004; 186(5): p 1430 - 1437

Rabier, M.J. Tyler, N.K. Walker, N.J. Hansen, L.M. Hirsh, D.C. Tablin, F. *Pasteurella multocida* enters polarized epithelial cells by interacting with host F-actin. Veterinary Microbiology. 1997; 54(3-4): p 343-355

Randall, D. Burggren, W. French, K. Animal Physiology. Mechanisms and adaptations. 2000. W.H. Freeman and Company. New York, U.S.A

Rasmüssen, T.T. Kirkeby, L.P. Poulsen, K. Reinholdt, J. Kilian. Resident microbiota of the adult human nasal cavity. APMIS. 2000;

Rhodes, M.B. New, C.W. Jr. Baker, P.K. Hogg, A. Underdall, N.R. *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic type D *Pasteurella multocida* as agents of severe atrophic rhinitis of swine. Veterinary Microbiology. 1987; 13(2): p 179 - 187

Richter, G.W. Kress, Y. Electron microscopy of a strain of *Bordetella bronchiseptica*. Journal of Bacteriology. 1967; 94(4): p 1216 – 12124

Riedel, K. Hentzer, H. Geisenberger, O Hubert, B. Steidle, A. Wu, H. *et al.* *N*-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. Microbiology. 2001; 147(Pt 12): 3249-3262

Rutter, J. M. Virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica*. Research in Veterinary Science. 1983;34:287

Shaw, P.D. Ping, G. Daly, S.L. Cha, Ch. Cronan, J.E. Rinehearth, K.L. *et al.* Detecting and characterizing *N*-acyl homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. PNAS. 1997; 94(12): p 6036-6041

Schaeffer, A.L. Taylor, T.A. Beatty, J.T. Greenberg, E.P. Long-chain Acyl-homoserine Lactone Quorum-Sensing Regulation of *Rhodobacter capsulatus* Gene Transfer Agent Production. Journal of Bacteriology. 2002; 184(23): p 6515 - 6521

Sekerret, S.J. Liggitt, H.D. Hajjar, A.M. Ernst, R.K. Miller, S.I. Wilson, C.B. Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin. American journal of physiology. Lung cellular and Molecular Physiology. 2004; 287(1): L143-152

Stecher, B. Hardt, W-D. The roles of microbiota in infectious disease. TRENDS in Microbiology. 2008; 16(3): p 107-114

Steindler, L. Bertani, I. De Sordi, L. Bigirimana, J. Venturi, V. The presence, type and role of *N*-acyl homoserine lactone quorum sensing in fluorescent *Pseudomonas* originally isolated from rice rhizospheres are unpredictable. FEMS Microbiology Letters. 2008; 288: p 102 - 111

Strauss, E. A symphony of bacterial voices. *Science*. 1999; 284(5418): p 11302-11304

Tiaden, A. Spirig, T. Hilbi, H. Bacterial gene regulation by alfa hydroxyketone signaling. *Cell*. 2010; 18(7): p 288-297

Treichel, H. de Oliveira, D. Mazutti, M. A. Luccio, M. Oliveira, J.D. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technology*. 2010; 3: p 182-196

Trigo, F.J. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Ciencia Veterinaria*. 1987; 4: p 1 - 30

Tsou, A.M. Zhu, J. *Quorum Sensing* negatively regulates hemolysin transcriptionally and postranscriptionally in *Vibrio cholera*. *Infection and Immunity*. 2010; 78(19): p 461 - 467

VanDamme, P. Heyndickx, M. Vancanneyt, M. Hoste, B. De Vos, P. Falsen, E. Kersters, K. Hinz, K-H. *Bordetella trematum* sp. nov., Isolated from wounds and Ear infections in Humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1996; 46(4): p 849 – 858

Vecht, U. Wisselink, H.J. Stockhofe-Zurwieden, N. Smith, H.E. Characterization of virulence of the *Streptococcus suis* serotype 2 reference strain Henrichsen S 735 in newborn gnotobiotic pigs. *Veterinary Microbiology*. 1996; 51(1-2): p 125 - 136

Vera Lizarazo, Y.A. Rodriguez Ferri, E.F. Gutiérrez Martín, C.B. Evaluation of different API systems for identification of porcine *Pasteurella multocida* isolates. *Research in Veterinary Science*. 2008; 85: p 453 – 456

Venturi, V. Steindler, L. Detection of *Quorum Sensing* *N*-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiology Letters*. 2007; 266: p 1 - 9

Von Graevenitz, A. The role of opportunistic bacteria in human diseases. *Annual Reviews Microbiology*. 1977; 31: p 447 – 471

Waldvogel, F. Infectious diseases in the 21st century: old challenges and new opportunities. *International Journal of Infectious Diseases*. 2004; 8: p 5 – 12

Wretlind, B. Wadström, T. Purification and properties of a Protease with Elastase Activity from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology*. 1977: 103: p 319 - 327

Winzner, K. Williams, P. *Quorum Sensing* and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*. 2001; 291: p 131 – 143

Woolfrey, B.F. Moody, J.A. Human infections Associated with *Bordetella bronchiseptica*. Clinical Microbiology Reviews. 1991; 4(3): p 243 – 255

Yates, W.D.G. A review of infectious rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. Canadian Journal of Comparative Medicine. 1982; 46(3): p 225-263

Yue, M. Bei, W. Chen, H. Nasal bacterial microbiome: probing a healthy porcine family. Nature preceedings. 2011; **EN PRENSA.**

Zahm, J.M. Kaplan, H. Hérard, A-L. Doriot, F. Pierrot, D. Somelette, P. Puchelle, E. Cell migration and proliferation during the *in vitro* wound repair of the respiratory epithelium. Cell Motility and the Cytoskeleton. 1997; 37(1): p 33-43

ANEXOS

ANEXO A: CONTEOS CELULARES DE CORNETES DE CONEJO TRATADOS CON *P. multocida* y/o *B. bronchiseptica*

Tratamiento solo *B. bronchiseptica*

	Número de campo	# celulas contadas	Picnosis	Muerte cel	Cel. descamadas	Vacuolas	Espacios intercel	CC activas	Perd. Cilias
Exp 1	1	49	1	0	0	3	0	8	2
	2	50	0	0	0	0	0	9	2
	3	37	1	0	0	4	0	12	2
	4	50	1	0	0	0	0	14	1
	5	46	wq0	0	0	1	0	9	1
	6	42	0	1	0	2	0	9	
	7	36	0	0	0	0	0		
	8	49	0	0	0	0	0		
Total		359	3	1	0	10	0	61	8
Porcentaje			0,8	0,3	0,0	2,8	0,0	17,0	2,2

Exp 2	1	48	2	0		0	0	11	2
	2	51	0	0	0	0	0	12	5
	3	42	0	0	0	0	0	12	2
	4	51	0	0	0	0	0	10	2
	5	57	0	0	0	0	0		6
	6	55	0	0	0	2	0		1
	7	48	0	0	0	1	0	10	4
	8	47	0	0	0	4	0	12	4
Total		399	2	0	0	7	0	67	26
Porcentaje			0,50	0,00	0,00	1,75	0,00	16,79	6,52
Exp 3	1	42	0	0	0	9	1	9	0
	2	48	2	1	0	7	2	5	0
	3	33	1	0	0	7	1	10	0
	4	31	0	2	0	8	0	7	0
	5	35	0	1	0	7	1	5	0
	6	37	0	2	0		0	7	0
	7	40	1	0	0		0		0
	8	42	2	0	0	8	1		0

Total		308	6	6	0	46	6	43	0
Porcentaje			1,95	1,95	0,00	14,94	1,95	13,96	0,00
Exp 4	1	56	3		6	5	0	0	0
	2	67	3	3	9		0	0	0
	3	66	0	3	3	4	0	0	0
	4	69	0		4	1	0	0	0
	5	69	0	3	2	5	0	0	0
	6	79	0			2	0	0	0
	7	78	0	2		0	0	0	0
	8	69	1			0	0	0	0
Total		553	7	11	24	17	0	0	0
Porcentaje			1,27	1,99	4,34	3,07	0,00	0,00	0,00

Tratamiento *B. bronchiseptica* + sobrenadante *P. multocida*

	Número de campo	# celulas contadas	Picnosis	Muerte cel	Cel. descamadas	Vacuolas	Espacios intercel	CC activas	Perd. Ciliias
Exp 1	1	51	0	0	0	3	0	13	5
	2	51	0	0	0	4	0	15	0
	3	53	1	1	0	3	0	17	1
	4	56	0	0	0	5	0	16	0
	5	49	0	0	0	7	0	10	2
	6	46	0	0	0		0	13	5
	7	44	0	0	0		0		
	8	50	0	0	0		0		
Total		400	1	1	0	22	0	84	13
Porcentaje			0,3	0,3	0,0	5,5	0,0	21,0	3,3
Exp 2	1	51	0	0	0	3	0	10	4
	2	56	0	0	0	2	0	10	5

	3	49	0	0	0	2	0	12	
	4	47	0	0	0	2	0	13	
	5	55	2	0	0	1	0	16	
	6	55	1	0	0		0		
	7	59	0	0	0		0		
	8	53	0	0	0		0		
Total		425	3	0	0	10	0	61	9
Porcentaje			0,7	0,0	0,0	2,4	0,0	14,4	2,1
Exp 3	1	35	0	0	0		0	10	0
	2	37	1	2	0	4	0	13	0
	3	38	0	0	0	7	0	10	0
	4	41	0	0	0		0		0
	5	34	2	1	0		0		0
	6	36	0	0	0		0		0
	7	40	0	0	0		0		0
	8	36	0	0	0	8	0	8	0
Total		297	3	3	0	19	0	41	0

Porcent aje			1,0	1,0	0,0	6,4	0,0	13,8	0,0
Exp 4	1	64	0	1	4	1	0	10	0
	2	52	0	1	0	2	1	7	0
	3	59	0	2	0	5	0	7	0
	4	66	2	2	0	3	0	6	0
	5	59	0	0	0	4	0	7	0
	6	62	0	0	0		0	7	0
	7	66	2	3	0		0	8	0
	8	61	0	2	12		0		0
Total		489	4	11	16	15	1	52	0
Porcent aje			0,8	2,2	3,3	3,1	0,2	10,6	0,0

Tratamiento *B. bronchiseptica* + sobrenadante *P. multocida* desnaturalizado

Exp 2	1	53	0	6	3		2		0
	2	49	1	3	1	10	0	9	0
	3	54	0	2		14	0	8	1
	4	56	1	2		16	0	7	1
	5	43	1	2			0	9	1
	6	49	1	6			0	10	2
	7	42	1				1		0
	8	35	3				1		0
Total		381	8	21	4	40	4	43	5
Porcentaje			2,1	5,5	1,0	10,5	1,0	11,3	1,3
Exp 3	1	52		8				2	0
	2	49	3	6	3	10	2	10	0
	3	53	2	9	0		1	4	0
	4	51	4	3	1	9	0		0
	5	38	2	4	1	8	0		0
	6	47	0		1	9	0		0

	7	50	0				1		0
	8	46	2	6		8	2	10	0
Total		386	13	36	6	44	6	26	0
Porcentaje			3,4	9,3	1,6	11,4	1,6	6,7	0,0
Exp 4	1	64	0	2		6	0	10	0
	2	69	0	4	5	6	1	8	0
	3	70	2	4	3	8	0	7	0
	4	61	2	4		2	0	7	0
	5	54	2	4		4	0	6	0
	6	63	3	5		6	0	9	0
	7	55	3	5		6	0		0
	8	66	1	2		8	0		0
Total		502	13	30	8	46	1	47	0
Porcentaje			2,6	6,0	1,6	9,2	0,2	9,4	0,0

Tratamiento solo *P. multocida*

	Número de campo	# células contadas	Picnosis	Muerte cel	Cel. descamadas	Vacuolas	Espacios intercel	CC activas	Perd. Ciliat
Exp 1	1	67	3	1	0		0	7	0
	2	59	1	1	0		0	9	0
	3	85	4	9	0		0	11	0
	4	42	2	1	0		0	9	0
	5	77	1	1	0		0		0
	6	57	0	0	0		0		0
	7	62	2	0	0		0		0
	8	75	3	1	0		0		0
Total		524	16	14	0	0	0	36	0
Porcentaje			3,1	2,7	0,0	0,0	0,0	6,9	0,0
Exp 2	1	69	5	2	0	12	0	10	0
	2	55	2	2	0	10	0	9	0
	3	47	0	2	0		0	12	0
	4	45	0	1	0		0	8	0
	5	64	1	2	0	10	0	11	0

	6	58	3	1	0	12	0	10	0
	7	61	0	0	0		0	9	0
	8	49	3	0	0	11	0		0
Total		448	14	10	0	55	0	69	0
Porcentaje			3,1	2,2	0,0	12,3	0,0	15,4	0,0
Exp 3	1	45	1	0	0	7	0	8	0
	2	33	0	0	0	8	0	6	0
	3	37	0	0	0	9	0	6	0
	4	49	0	0	0	6	0		0
	5	40	0	0	0	9	0		0
	6	35	1	0	0		0		0
	7	41	0	0	0		0		0
	8	38	0	0	0	7	0	22	0
Total		318	2	0	0	46	0	42	0
Porcentaje			0,6	0,0	0,0	14,5	0,0	13,2	0,0
	1	69	4		3	4	0		0
Exp 4	2	77	3	3	2	5	3	15	0
	3	62	2	4	6	1	0	16	0

	4	67	1		5	11	0	18	0
	5	61	2		6	5	0		0
	6	70	2	2		6	0	17	0
	7	62	0	6		3		16	
	8	66				6			
Total		534	14	15	22	41	3	82	0
Porcentaje			2,6	2,8	4,1	7,7	0,6	15,4	0,0

Tratamiento *P. multocida* + sobrenadante *B. bronchiseptica*

	Número de campo	# celulas contadas	Picnosis	Muerte cel	Cel. descamadas	Vacuolas	Espacios intercel	CC activas	Perd. Cilias
Exp 1	1	59	0	0	0	8	0	14	47
	2	55	0	0	0	10	0	10	47
	3	60	0	0	0	8	0	15	36
	4	51	0	0	0	6	0	14	36
	5	58	0	0	0	3	0	13	12
	6	41	0	0	0	3	0	9	
	7	49	0	0	0	4	0	13	
	8	46	1	0	0	3	0	12	
Total		419	1	0	0	45	0	100	178
Porcentaje			0,2	0,0	0,0	10,7	0,0	23,9	42,5
Exp 2	1	53	0	0			0	5	37
	2	41	0	0	0		2	12	32
	3	47	0	0	0		0	6	30

	4	45	0	0	0		3	7	15
	5	39	0	0	0		1	5	18
	6	47	0	0	0		0	7	20
	7	43	0	0	0		0	5	37
	8	55	2	0	0		0	8	27
Total		370	2	0	0	0	6	55	216
Porcentaje			0,5	0,0	0,0	0,0	1,6	14,9	58,4
Exp 3	1	48	3		0	9	1	8	
	2	35	1	1	0		1	12	
	3	59	0	1	0		0		
	4	40	0	0	0	11	1	11	
	5	51	0	0	0	9	0	8	
	6	37	2	0	0	10	0		
	7	43	0	1	0		1	11	
	8	56	0		0	8	1	6	
Total		369	6	3	0	47	5	56	0
Porcentaje			1,6	0,8	0,0	12,7	1,4	15,2	0,0

	1	60	0	0	3	4	0	7	
Exp 4	2	59	0			4	1	8	
	3	45	0	0		3	0	9	
	4	62	0	3		8	0	7	
	5	50	0	0		3	0	6	
	6	45	0	0		5	0	8	
	7	45	0	0		7	0	8	
	8	52	0			3	1	6	
Total		418	0	3	3	37	2	59	0
Porcentaje			0,0	0,7	0,7	8,9	0,5	14,1	0,0

Tratamiento *P. multocida* + sobrenadante *B. bronchiseptica* desnaturalizado

	Número de campo	# células contadas	Picnosis	Muerte cel	Cel. descamadas	Vacuolas	Espacios intercel	CC activas	Perd. Ciliias
Exp 1	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	6								
	7								
	8								
Total		0	0	0	0	0	0	0	0
Porcentaje			0	0	0	0	0	0	0
Exp 2	1	82	2	3	0	16		6	0
	2	90	0	3	0	19	0	3	0
	3	103	3	7	0	11		0	0

	4	67	0	2	0	12	1	6	0
	5	76	1		0	11	2	3	0
	6	59	2		0	7	1	2	0
	7	72	1		0	9	1	4	0
	8	80			0	6	0	0	0
Total		629	9	15	0	91	5	24	0
Porcentaje			1,4	2,4	0,0	14,5	0,8	3,8	0,0
Exp 3	1	57	0	3	0	8	2		3
	2	64	2		0	5	0	9	
	3	46	1	2	0	6	0	9	0
	4	45	0	2	0	6	0	12	2
	5	62	0		0	12	0	12	0
	6	75	1	3	0	8	0		0
	7	61	1		0		0	11	0
	8	45	0		0	6	0		0
Total		455	5	10	0	51	2	53	5
Porcentaje			1,1	2,2	0,0	11,2	0,4	11,6	1,1

Exp 4	1	70		4	0	3	0	10	0
	2	53			0	4	0	6	0
	3	59	2		0	2	0	8	0
	4	55	3		0	5	0	7	0
	5	0	0			0	0		0
	6	0	0			0	0		0
	7	0	0			0	0		0
	8	0	0			0			0
Total		237	5	4	0	14	0	31	0
Porcentaje			2,1	1,7	0,0	5,9	0,0	13,1	0,0

Co-cultivo *P. multocida* + *B. bronchiseptica*

	Número de campo	# células contadas	Picnosis	Muerte cel	Cel. descamadas	Vacuolas	Espacios intercel	CC activas	Perd. Ciliás
Exp 1	1	51	1	0	0	3	0	12	9
	2	57	1	0	0	2	0	13	6
	3	53	2	0	0		0	14	5
	4	50	4	0	0		0	10	2
	5	49	0	0	0		0	9	3
	6	53	0	0	0		0	8	5
	7	52	0	0	2		0	10	15
	8	54	1	0	0		0	12	
Total		419	9	0	2	5	0	88	45
Porcentaje			2,1	0,0	0,5	1,2	0,0	21,0	10,7
Exp 2	1	48	2	0	0	4	0	9	9
	2	47	0	0	0	2	0	10	13
	3	43	0	0	0	2	0	8	4

	4	50	0	0	0		0	10	
	5	45	0	0	0		0	9	
	6	43	0	0	0		0	7	
	7	51	1	0	0		0	10	
	8	57	0	0	0		0	17	
Total		384	3	0	0	8	0	80	26
Porcentaje			0,8	0,0	0,0	2,1	0,0	20,8	6,8
Exp 3	1	52	0	0	0		0	11	
	2	59	0	0	0		0	7	
	3	59	1	0	1		0	8	
	4	53	1	1	0		0		
	5	56	1	1	0	7	0		
	6	54	1	0	0	7	0		
	7	61	0	0	0	4	0		
	8	50	0	0	0		0	8	
Total		444	4	2	1	18	0	34	0
Porcentaje			0,9	0,5	0,2	4,1	0,0	7,7	0,0

Exp 4	1	67	0	2	12	4	0	7	
	2	50	0	2	30	4	0	9	
	3	50	0	1	32	2	0	12	
	4	61	0	0	50	3	0	10	
	5	56	0	2	49	4	0	12	
	6	66	1	1	6	2	0	11	
	7	63	3	4	54	6	0	14	
	8	69	0	1	52		0	9	
Total		482	4	13	285	25	0	84	0
Porcentaje			0,8	2,7	59,1	5,2	0,0	17,4	0,0

Control solo medio de cultivo de explantes (DMEM)

	Número de campo	# células contadas	Picnosis	Muerte cel	Cel. descamadas	Vacuolas	Espacios intercel	CC activas	Perd. Ciliac
Exp 1	1	55		0	0	0	1	16	

	2	52	0	0	0	0	0	14	
	3	55	0	0	0	1	1	13	3
	4	53		0	0		0	10	
	5	52	0	0	0	0	0	12	
	6	51	0	0	0	1	1	14	
	7	48	0	0	0	0	0	12	
	8	51	1	0	0	0	0	14	
Total		417	1	0	0	2	3	105	3
Porcentaje			0,2	0,0	0,0	0,5	0,7	25,2	0,7
Exp 2	1	43	0	1	0	1	0	12	
	2	51	1	0	0		2	13	
	3	49	0	0	0	1	0	10	
	4	52	1	0	0		0	13	
	5	50		2	0		0	13	
	6	50	1	1	0		2	14	
	7	52	0	0	0	0	0	13	
	8	50	0	1	0	1	0	11	
Total		397	3	5	0	3	4	99	0

Porcentaje			0,8	1,3	0,0	0,8	1,0	24,9	0,0
Exp 3	1	43		2	0		1		0
	2	45		1	0		0		0
	3	47	0	2	0		0		0
	4	48	0	1	0		0		0
	5	50	0	1	0		0		0
	6	42		0	0		1		0
	7	45	0	0	0		0		0
	8	49	0	1			0	1	0
Total		369	0	8	0	0	2	1	0
Porcentaje			0,0	2,2	0,0	0,0	0,5	0,3	0,0
Exp 4	1	62	0	0			0	11	0
	2	63	0	0			0	8	0
	3	59	1	2			0	10	0
	4	63	0	0			0	10	0
	5	52	2	2			0	11	0
	6	62	0	0			0	6	0
	7	60		1		0	0	8	0

	8	45	0	0			0	4	0
Total		466	3	5	0	0	0	68	0
Porcentaje			0,6	1,1	0,0	0,0	0,0	14,6	0,0

ANEXO B: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE CONTEOS CELULARES DE CORNETES DE CONEJO TRATADOS CON *P. multocida* y/o *B. bronchiseptica*

La estadística descriptiva de los datos obtenidos en los conteos celulares en explantes de cornete de conejo, permitió entender el comportamiento de las respuestas a los tratamientos. La estadística descriptiva contiene los valores **N** (número de experimentos), **promedio**, **desviación estándar**, **valor crítico**, **valor mínimo**, **valor medio** (mediana) y **valor máximo**. Todos los valores se obtuvieron con el programa statistix 9.0 (Statistix analytical software, Florida, U.S.A)

A. Estadística descriptiva por tratamiento = solo *Bordetella*

	CCactivas	Celdescam	Espaciosi	Muerte	PerdCilia
N	3	3	3	3	3
Mean	18.970	3.9633	0.0000	1.7200	3.5000
SD	7.2000	6.4365	0.0000	2.7402	3.6315
C.V.	37.955	162.40	M	159.32	103.76
Minimum	11.930	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Median	18.660	0.5000	0.0000	0.2800	3.2500
Maximum	26.320	11.390	0.0000	4.8800	7.2500

	Picnosis	Vacuolas
N	3	3
Mean	0.8700	2.9000
SD	0.3859	1.2088
C.V.	44.354	41.681
Minimum	0.5000	1.7500
Median	0.8400	2.7900
Maximum	1.2700	4.1600

B. Estadística descriptiva por tratamiento = *Bordetella* + sobrenadante de *Pasteurella*

	CCactivas	Celdescam	Espaciosi	Muerte	PerdCilia
N	3	3	3	3	3
Mean	12.697	1.0900	0.0667	1.1700	1.0833
SD	12.505	1.8879	0.1155	1.0096	1.8764
C.V.	98.488	173.21	173.21	86.287	173.21
Minimum	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0000

Median	13.090	0.0000	0.0000	1.0100	0.0000
Maximum	25.000	3.2700	0.2000	2.2500	3.2500

	Picnosis	Vacuolas
N	3	3
Mean	0.6933	3.4167
SD	0.3955	1.9335
C.V.	57.046	56.589
Minimum	0.2500	1.6800
Median	0.8200	3.0700
Maximum	1.0100	5.5000

C. Estadística descriptiva por tratamiento = *Bordetella* + Sobrenadante de *Pasteurella* desnaturalizado

	CCactivas	Celdescam	Espaciosi	Muerte	PerdCilia
N	3	3	3	3	3
Mean	14.173	10.283	1.4533	7.2033	0.0300
SD	6.8848	14.246	1.4963	2.0671	0.0520
C.V.	48.576	138.53	102.96	28.697	173.21
Minimum	7.5100	1.0500	0.2000	5.9800	0.0000
Median	13.750	3.1100	1.0500	6.0400	0.0000
Maximum	21.260	26.690	3.1100	9.5900	0.0900

	Picnosis	Vacuolas
N	3	3
Mean	3.2033	19.950
SD	1.5067	11.960
C.V.	47.036	59.950
Minimum	2.1000	9.1600
Median	2.5900	17.880
Maximum	4.9200	32.810

D. Estadística descriptiva por tratamiento = Co-cultivo

	CCactivas	Celdescam	Espaciosi	Muerte	PerdCilia
N	3	3	3	3	3
Mean	19.753	19.870	0.0000	0.9000	8.2933
SD	2.0139	34.001	0.0000	1.5588	8.7171
C.V.	10.195	171.12	M	173.21	105.11
Minimum	17.430	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Median	20.830	0.4800	0.0000	0.0000	7.5000
Maximum	21.000	59.130	0.0000	2.7000	17.380

	Picnosis	Vacuolas
N	3	3
Mean	1.2533	1.8967
SD	0.7769	2.8521
C.V.	61.990	150.38
Minimum	0.7800	0.2400
Median	0.8300	0.2600
Maximum	2.1500	5.1900

E. Estadística descriptiva por tratamiento = Solo medio de cultivo de explante DMEM

	CCactivas	Celdescam	Espaciosi	Muerte	PerdCilia
N	3	3	3	3	3
Mean	20.283	0.0000	0.5767	0.7767	2.8767
SD	8.2743	0.0000	0.5200	0.6793	4.9825
C.V.	40.794	M	90.179	87.462	173.21
Minimum	10.730	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Median	24.940	0.0000	0.7200	1.0700	0.0000
Maximum	25.180	0.0000	1.0100	1.2600	8.6300

	Picnosis	Vacuolas
N	3	3
Mean	1.0900	1.4967
SD	0.2443	1.8252
C.V.	22.416	121.95
Minimum	0.8100	0.0000
Median	1.2000	0.9600
Maximum	1.2600	3.5300

F. Estadística descriptiva por tratamiento = solo *Pasteurella multocida*

	CCactivas	Celdescam	Espaciosi	Muerte	PerdCilia
N	3	3	3	3	3
Mean	0.2500	6.7400	0.2500	4.8500	0.0000
SD	0.4330	11.674	0.4330	4.1009	0.0000
C.V.	173.21	173.21	173.21	84.555	M
Minimum	0.0000	0.0000	0.0000	2.0000	0.0000
Median	0.0000	0.0000	0.0000	3.0000	0.0000
Maximum	0.7500	20.220	0.7500	9.5500	0.0000

	Picnosis	Vacuolas
N	3	3
Mean	3.3733	14.227
SD	0.6466	7.8990
C.V.	19.169	55.522
Minimum	3.0000	7.6800
Median	3.0000	12.000
Maximum	4.1200	23.000

G. Estadística descriptiva por tratamiento = *Pasteurella multocida* + sobrenadante de *B. bronchiseptica*

	CCactivas	Celdescam	Espaciosi	Muerte	PerdCilia
N	3	3	3	3	3
Mean	0.6100	18.543	0.6100	0.8767	16.917
SD	0.6843	31.187	0.6843	1.5184	14.740
C.V.	112.18	168.19	112.18	173.21	87.134
Minimum	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Median	0.4800	1.0800	0.4800	0.0000	23.750
Maximum	1.3500	54.550	1.3500	2.6300	27.000

	Picnosis	Vacuolas
N	3	3
Mean	0.2600	2.7133

SD	0.2706	3.0282
C.V.	104.06	111.60
Minimum	0.0000	0.0000
Median	0.2400	2.1600
Maximum	0.5400	5.9800

H. Estadística descriptiva por tratamiento = *Pasteurella multocida* + sobrenadante de *B. bronchiseptica* desnaturalizado

	CCactivas	Celdescam	Espaciosi	Muerte	PerdCilia
N	3	3	3	3	3
Mean	12.667	28.833	1.6633	5.1300	6.667E-03
SD	8.6474	49.941	1.5547	2.2488	0.0115
C.V.	68.269	173.21	93.472	43.836	173.21
Minimum	3.8200	0.0000	0.0000	3.1800	0.0000
Median	13.080	0.0000	1.9100	4.6200	0.0000
Maximum	21.100	86.500	3.0800	7.5900	0.0200

	Picnosis	Vacuolas
N	3	3
Mean	2.9900	10.750
SD	2.2577	4.3885
C.V.	75.508	40.824
Minimum	1.1000	5.9100
Median	2.3800	11.870
Maximum	5.4900	14.470

ANEXO C: ANOVA DE TRATAMIENTOS CON *P. multocida* y/o *B. bronchiseptica* en explantes de cornete de conejo *in vitro*.

El análisis de varianza de un factor en un modelo totalmente al azar, permitió el reconocimiento de diferencias estadísticamente significativas a través de las cuales, se pudieron agrupar las respuestas a los tratamientos, bajo la hipótesis nula mencionada en la metodología. Se comprobaron los supuestos del modelo y se llevó a cabo el cálculo de los valores P a diferentes niveles de confianza (entre 0,01 y 0,1)

Análisis de varianza totalmente al azar para Celulas calciformes activas

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	7	1347.93	192.561	3.82	0.0126
Error	16	807.12	50.445		
Total	23	2155.04			

Grand Mean 12.425 CV 57.16

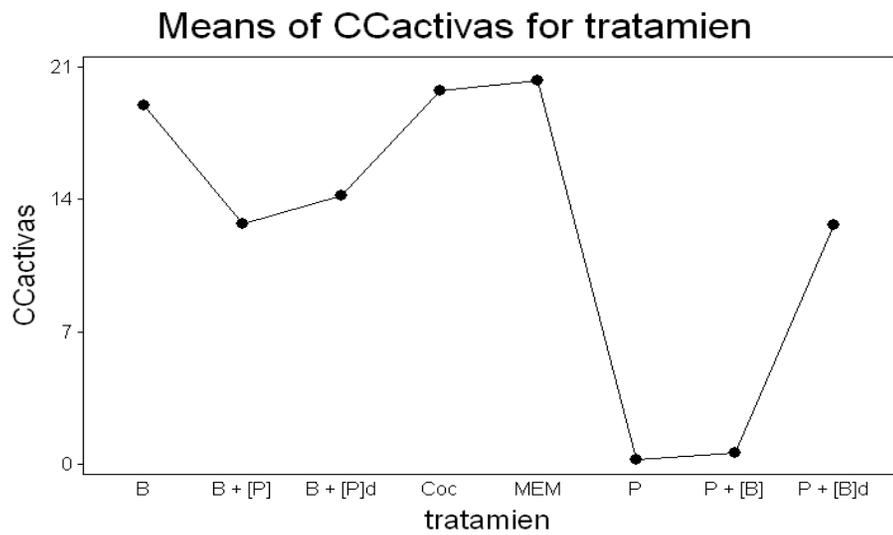
Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	2.23	0.0877
O'Brien's Test	0.99	0.4727
Brown and Forsythe Test	1.09	0.4148

LSD All-Pairwise Comparisons Test of CCactivas by tratamien

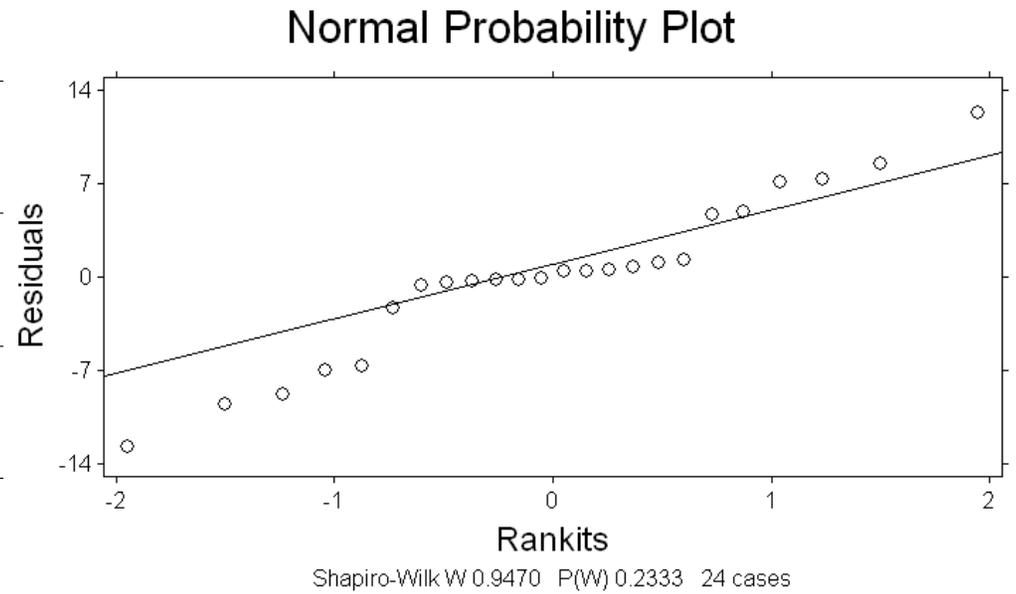
tratamien	Mean	Homogeneous Groups
MEM	20.283	A
Coc	19.753	A
B	18.970	A
B + [P]d	14.173	AB
B + [P]	12.697	AB
P + [B]d	12.667	AB
P + [B]	0.6100	B
P	0.2500	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 5.7991
 Critical T Value 2,921 Critical Value for Comparison 16.938
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

Patrones de agrupación de los tratamientos



Gráfica de probabilidad normal



ANOVA completamente al azar para células descamadas

El tratamiento "células descamadas" no cumple los supuestos de homogeneidad de varianzas ni normalidad, con lo cual se concluyó que las respuestas observadas fueron efecto del artefacto creado por la manipulación del tejido. Las observaciones al microscopio corroboraron estos hallazgos. En la foto se muestra el artefacto de corte, en el cual no hay continuidad del epitelio y de forma abrupta se pierde la arquitectura del tejido. El corte y la manipulación llevan a la pérdida de células epiteliales, lo cual no se relaciona con la acción de las bacterias en el experimento

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	7	2222.3	317.474	0.51	0.8159
Error	16	10014.0	625.878		
Total	23	12236.4...			

Grand Mean 11.165 CV 224.06

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	2.90	0.0369
O'Brien's Test	1.29	0.3168
Brown and Forsythe Test	0.52	0.8090

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
tratamien	7.0	M	0.0000
Error	M		

Component of variance for between groups -102.801
Effective cell size 3,0

tratamien	Mean
B	3.9633
B + [P]	1.0900
B + [P]d	10.283
Coc	19.870
MEM	0.0000
P	6.7400
P + [B]	18.543
P + [B]d	28.833
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	14.444
Std Error (Diff of 2 Means)	20.427

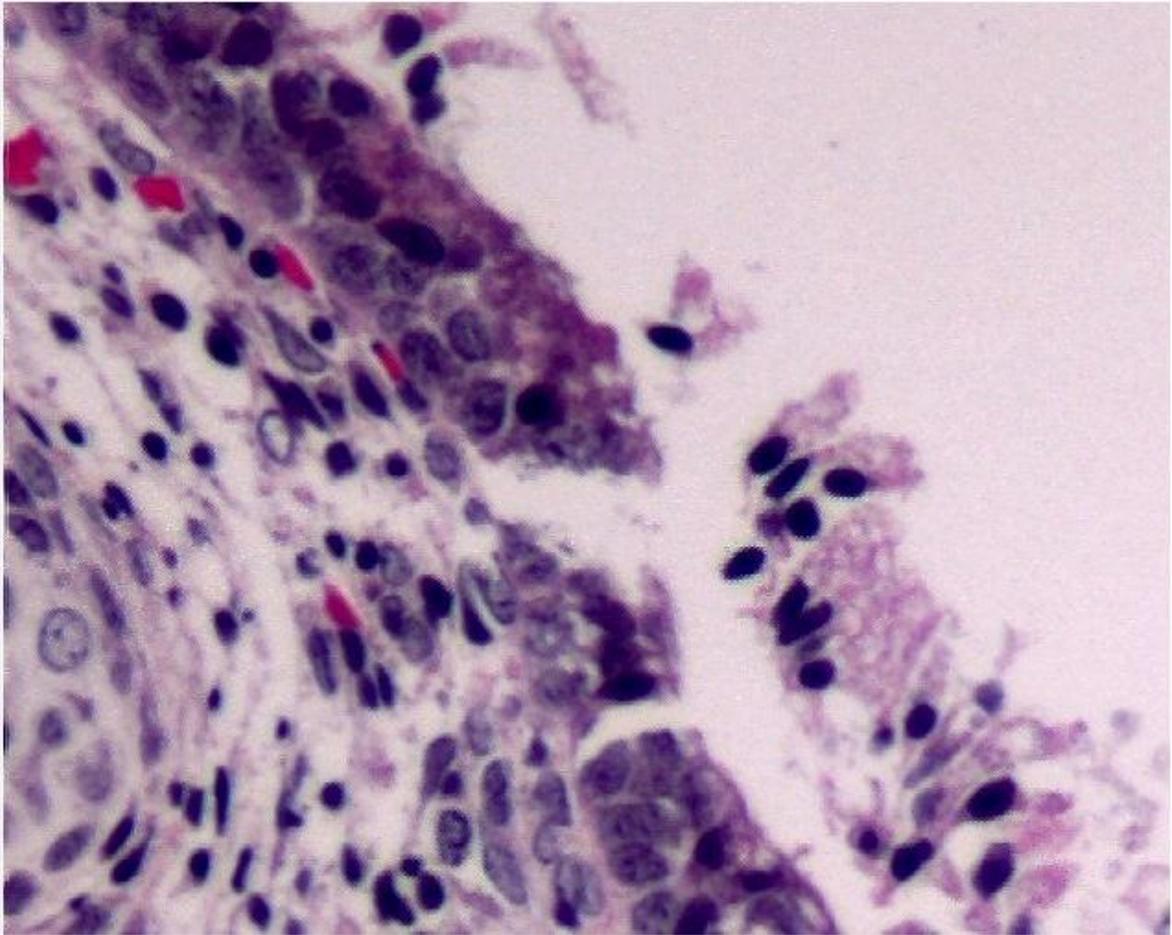


FOTO ANEXO C: Artefacto de corte en el epitelio de explante de cornete cultivado *in vitro*. Se observa la pérdida abrupta de la continuidad de la capa más externa del tejido, liberando células cuyos núcleos hiper cromáticos muestran muerte de las células de forma súbita.

Análisis de varianza totalmente al azar para espacios interepiteliales

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	7	8.9472	1.27817	1.83	0.1505
Error	16	11.1917	0.69948		
Total	23	20.1389			

Grand Mean 0.5775 CV 144.82

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	2.97	0.0337
O'Brien's Test	1.32	0.3030
Brown and Forsythe Test	1.60	0.2060

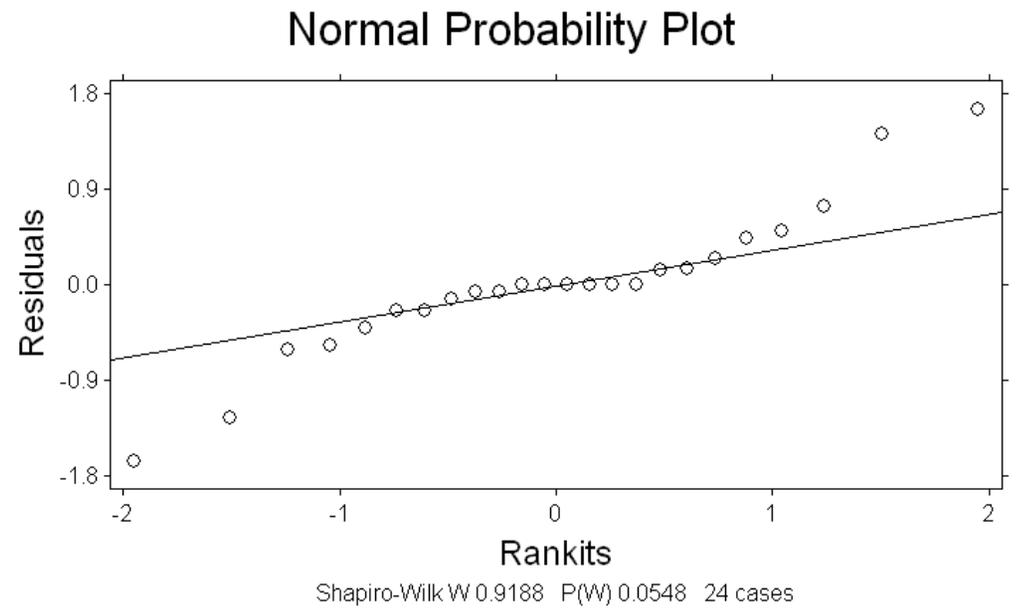
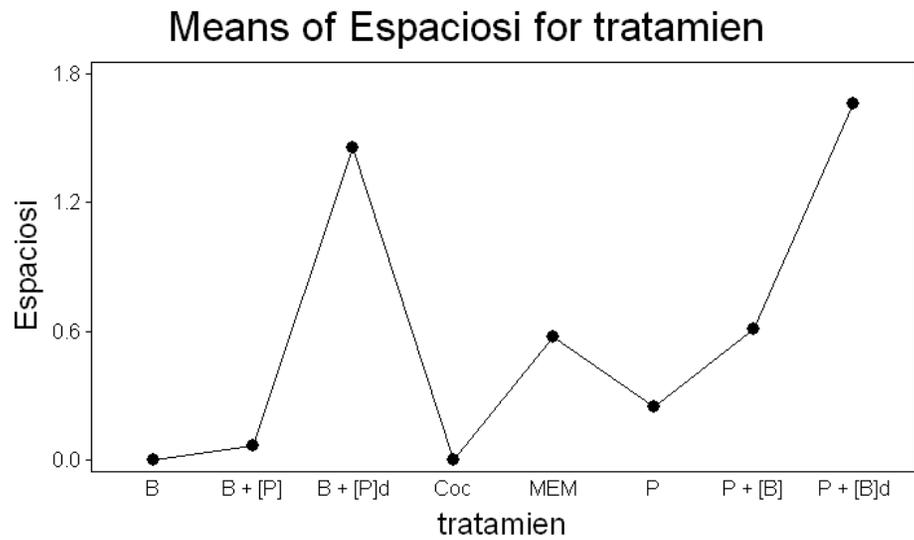
Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Espaciosi by tratamien

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
P + [B]d	1.6633	A
B + [P]d	1.4533	A
P + [B]	0.6100	A
MEM	0.5767	A
P	0.2500	A
B + [P]	0.0667	A
B	0.0000	A
Coc	0.0000	A

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.6829
Critical Q Value 6,080 Critical Value for Comparison 2.9356
There are no significant pairwise differences among the means.

^P
Patrones de agrupación de los tratamientos

Gráfica de probabilidad normal



ANOVA completamente al azar para muerte celular

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	7	132.722	18.9603	3.80	0.0128
Error	16	79.745	4.9841		
Total	23	212.468			

Grand Mean 2.8283 CV 78.93

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	2.27	0.0822
O'Brien's Test	1.01	0.4597
Brown and Forsythe Test	0.34	0.9228

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Muerte by tratamien

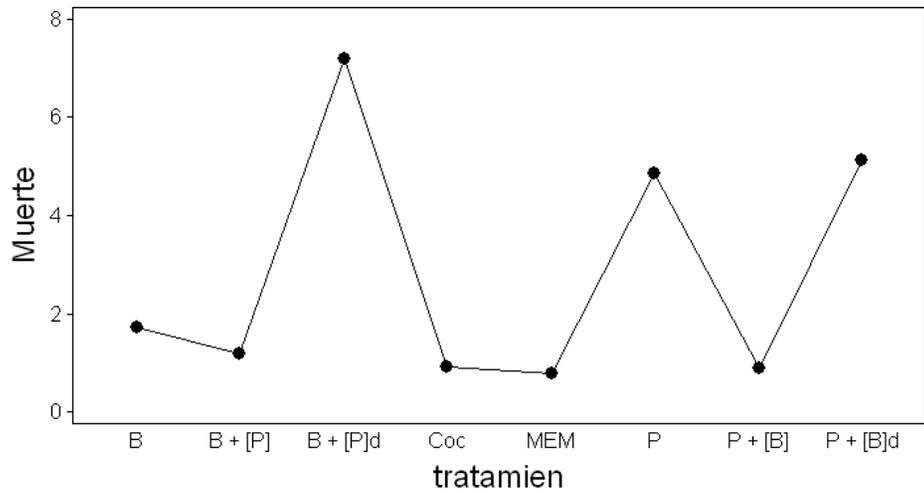
tratamien	Mean	Homogeneous Groups
B + [P]d	7.2033	A
P + [B]d	5.1300	AB
P	4.8500	AB
B	1.7200	B
B + [P]	1.1700	B
Coc	0.9000	B
P + [B]	0.8767	B
MEM	0.7767	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 1.8228
Critical T Value 2,921 Critical Value for Comparison 5.3241
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

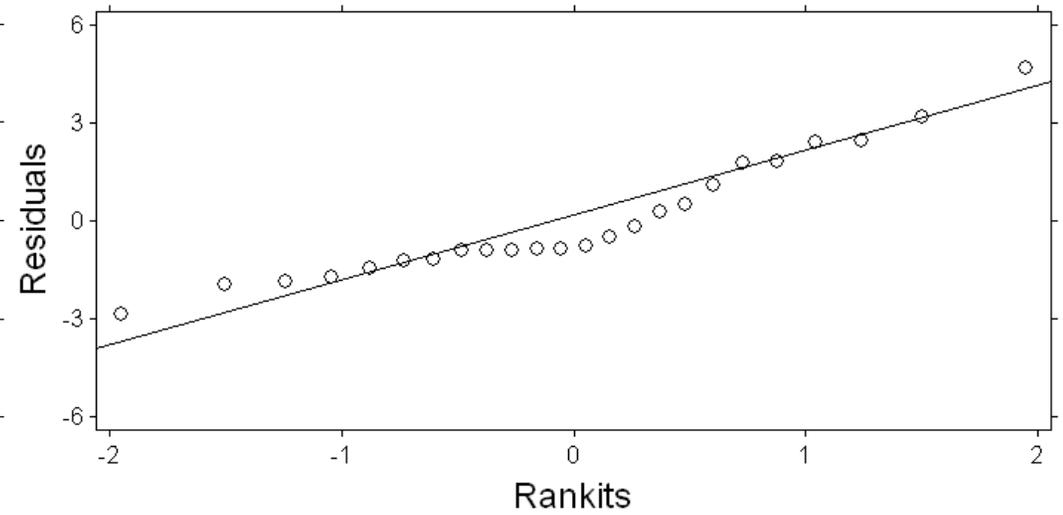
Patrones de agrupación de los tratamientos

Gráfica de probabilidad normal

Means of Muerte for tratamien



Normal Probability Plot



ANOVA completamente al azar para perdida de cilias

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	7	728.81	104.116	2.49	0.0622
Error	16	669.59	41.849		
Total	23	1398.40			

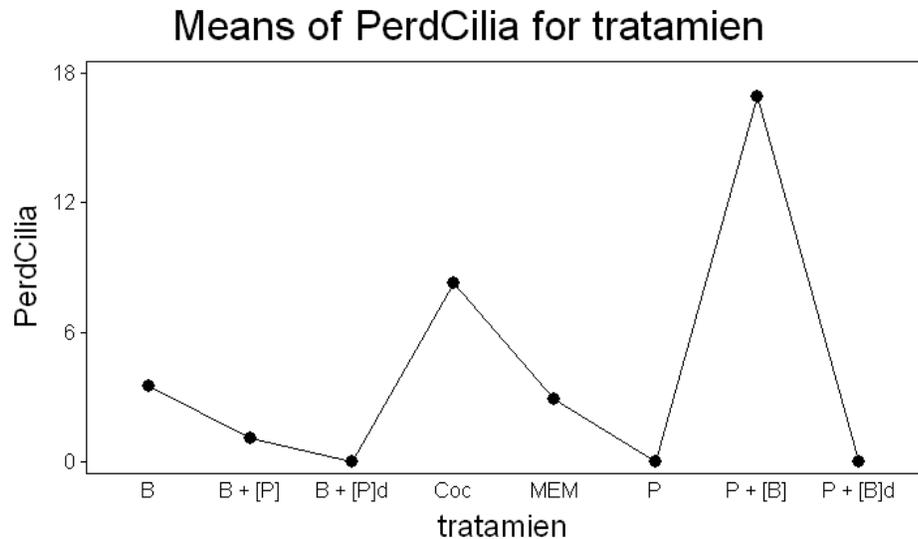
Grand Mean 4.0883 CV 158.23

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	3.38	0.0207
O'Brien's Test	1.50	0.2358
Brown and Forsythe Test	1.12	0.3976

LSD All-Pairwise Comparisons Test of PerdCilia by tratamien

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
P + [B]	16.917	A
Coc	8.2933	AB
B	3.5000	B
MEM	2.8767	B
B + [P]	1.0833	B
B + [P]d	0.0300	B
P + [B]d	6.67E-03	B
P	0.0000	B

Alpha 0.1 Standard Error for Comparison 5.2820
 Critical T Value 1,746 Critical Value for Comparison 9.2218
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.



ANOVA completamente al azar para picnosis

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	7	33.2083	4.74404	4.30	0.0075
Error	16	17.6547	1.10342		
Total	23	50.8629			

Grand Mean 1.7167 CV 61.19

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	3.17	0.0266
O'Brien's Test	1.41	0.2686
Brown and Forsythe Test	0.99	0.4719

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Picnosis by tratamien

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
P	3.3733	A
B + [P]d	3.2033	A
P + [B]d	2.9900	AB
Coc	1.2533	BC
MEM	1.0900	C
B	0.8700	C
B + [P]	0.6933	C
P + [B]	0.2600	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.8577
 Critical T Value 2,120 Critical Value for Comparison 1.8182
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Picnosis by tratamien

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
P	3.3733	A
B + [P]d	3.2033	AB
P + [B]d	2.9900	AB
Coc	1.2533	AB
MEM	1.0900	AB
B	0.8700	AB
B + [P]	0.6933	AB
P + [B]	0.2600	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.8577
 Critical Q Value 4,903 Critical Value for Comparison 2.9735
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Picnosis by tratamien

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
P	3.3733	A
B + [P]d	3.2033	A
P + [B]d	2.9900	AB

Coc	1.2533	BC
MEM	1.0900	C
B	0.8700	C
B + [P]	0.6933	C
P + [B]	0.2600	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.8577
 Critical T Value 2,120 Critical Value for Comparison 1.8182
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

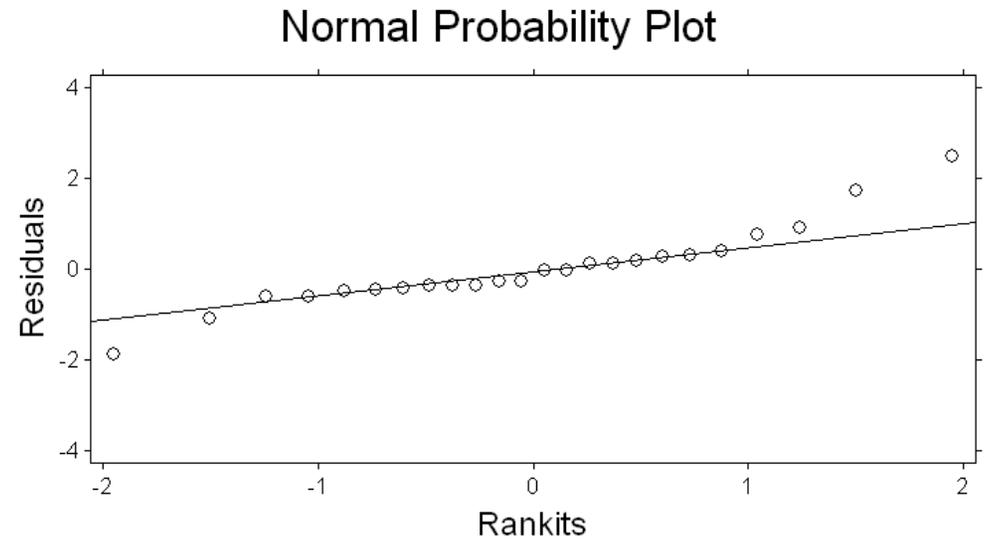
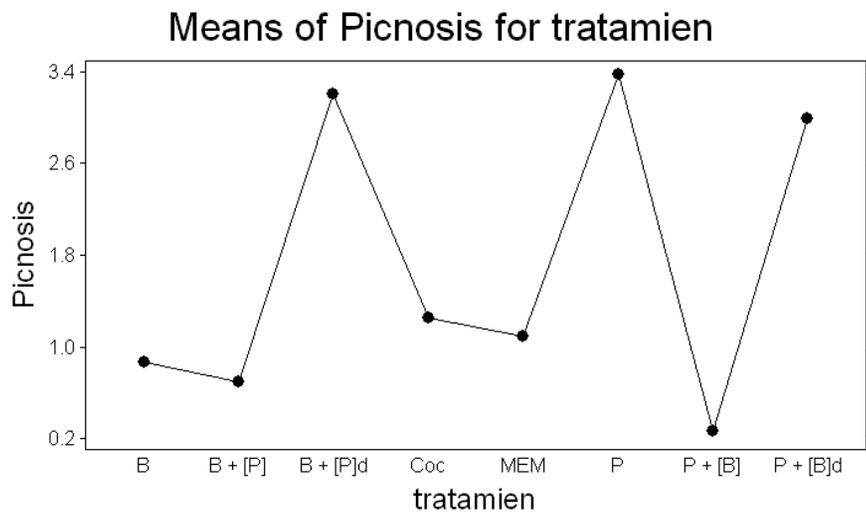
Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Picnosis by tratamien

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
P	3.3733	A
B + [P]d	3.2033	AB
P + [B]d	2.9900	AB
Coc	1.2533	AB
MEM	1.0900	AB
B	0.8700	AB
B + [P]	0.6933	AB
P + [B]	0.2600	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.8577
 Critical Q Value 4,903 Critical Value for Comparison 2.9735
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another

Patrones de agrupación de los tratamientos

Gráfica de probabilidad normal



Shapiro-Wilk W 0.9119 P(W) 0.0387 24 cases

ANOVA completamente al azar para vacuolización intracitoplasmática

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamien	7	1014.36	144.908	4.63	0.0053
Error	16	501.07	31.317		
Total	23	1515.42			

Grand Mean 7.1688 CV 78.06

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	3.13	0.0278
O'Brien's Test	1.39	0.2748
Brown and Forsythe Test	1.30	0.3135

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Vacuolas by tratamien

tratamien	Mean	Homogeneous Groups
B + [P]d	19.950	A
P	14.227	AB
P + [B]d	10.750	AB
B + [P]	3.4167	B
B	2.9000	B
P + [B]	2.7133	B
Coc	1.8967	B
MEM	1.4967	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.5692
 Critical Q Value 4,903 Critical Value for Comparison 15.841
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

Statistix 9.0
 12:01:10

08/05/2012,

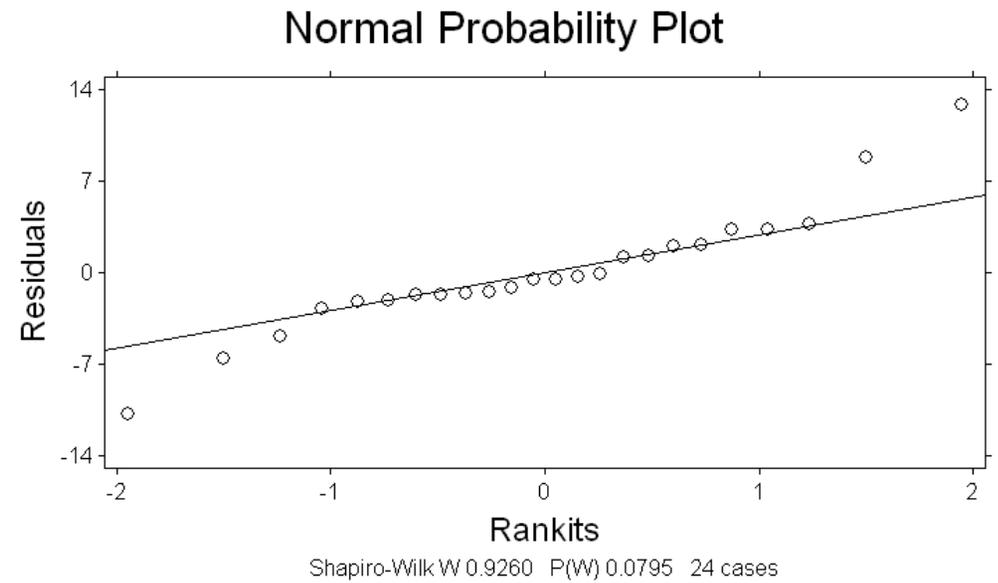
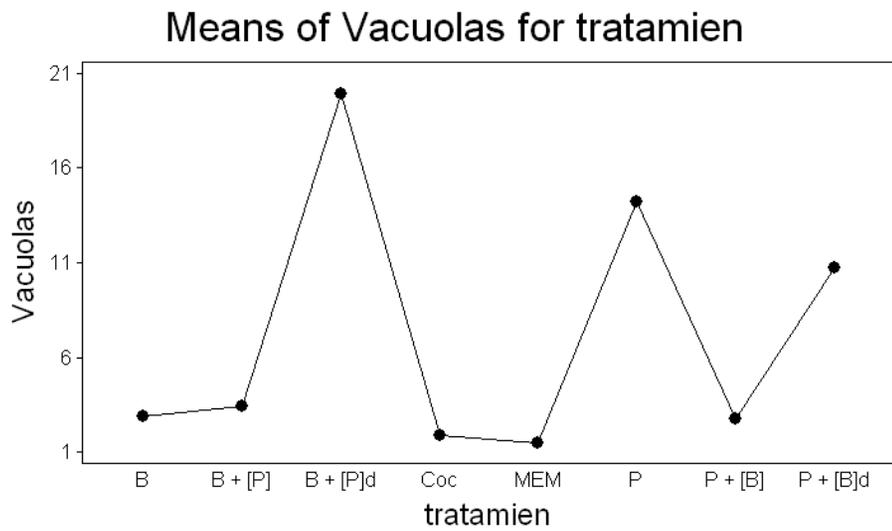
LSD All-Pairwise Comparisons Test of Vacuolas by tratamien

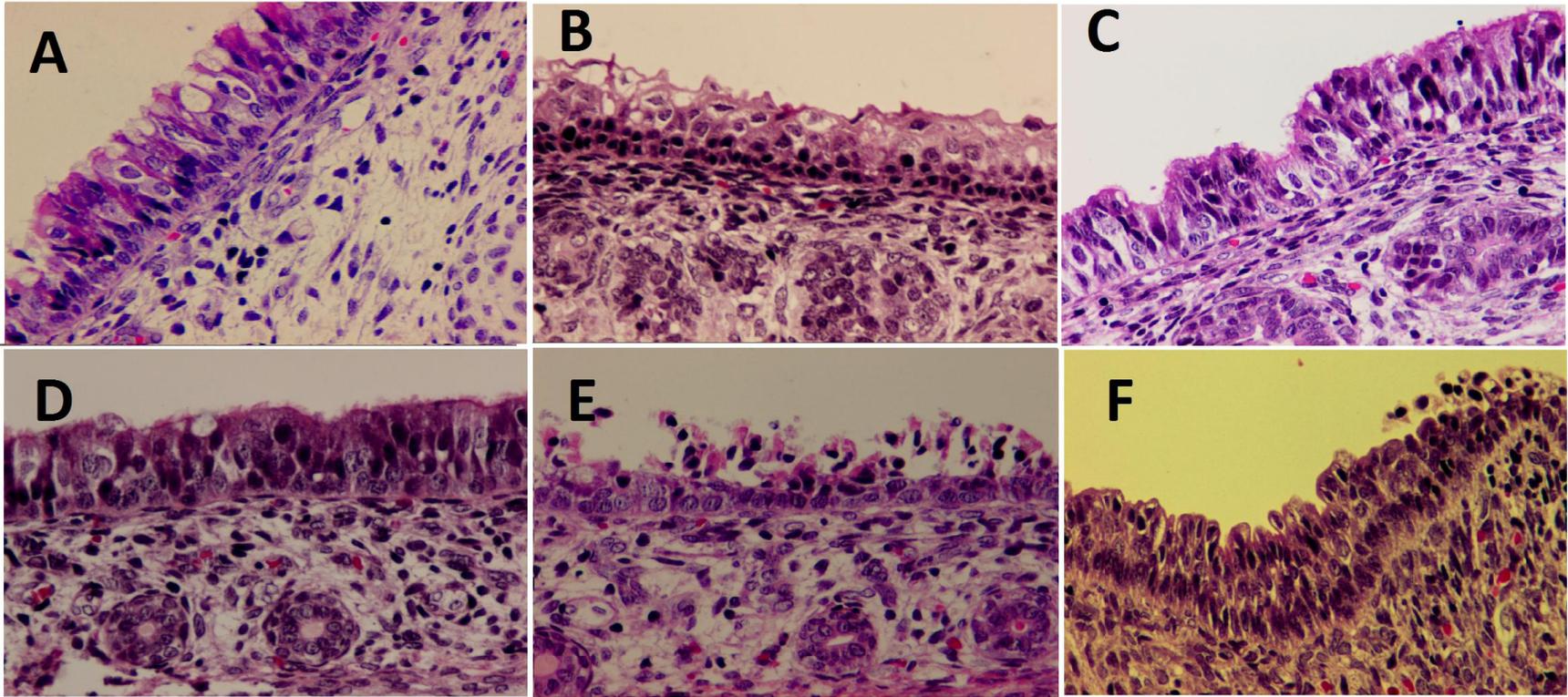
tratamien	Mean	Homogeneous Groups
B + [P]d	19.950	A
P	14.227	A
P + [B]d	10.750	AB
B + [P]	3.4167	B
B	2.9000	B
P + [B]	2.7133	B
Coc	1.8967	B
MEM	1.4967	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.5692
 Critical T Value 2,120 Critical Value for Comparison 9.6863
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

Patrones de agrupación de los tratamientos

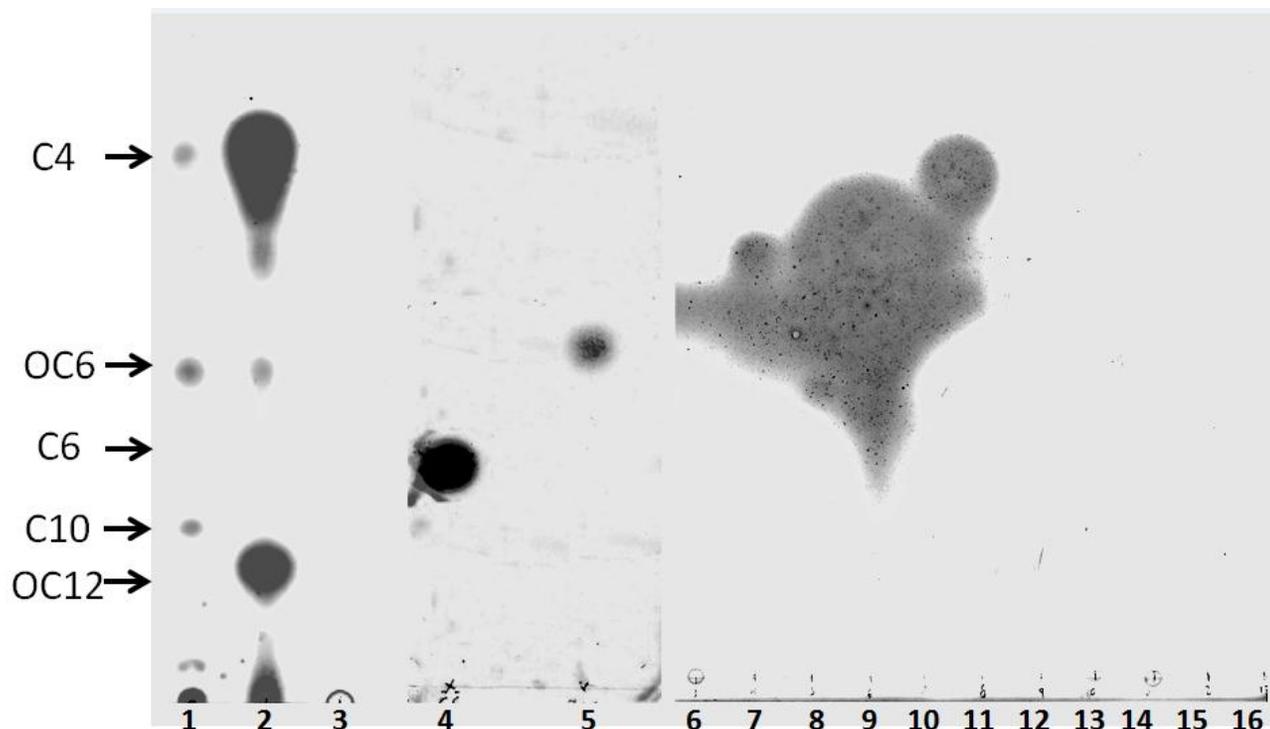
Gráfica de probabilidad normal



ANEXO D: CAMBIOS MORFOLÓGICOS CELULARES EN EXPLANTES DE CORNETE DE CONEJO

A: Control negativo (explante en medio DMEM únicamente). **B:** Explante inoculado con *P. multocida* en presencia de la lactonasa AiiA. **C:** Explante inoculado con *B. bronchiseptica* en presencia de la lactonasa AiiA. **D:** Control negativo. **E:** Explante inoculado con *B. bronchiseptica* estimulada con la OC14-AHL. **F:** Explante inoculado con *P. multocida* estimulada con la OC14-AHL.

ANEXO E: CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA DE ALGUNOS EXTRACTOS DE MEDIO DE CULTIVO DE *P. multocida* y/o *B. bronchiseptica* OBTENIDOS CON DOS SOLVENTES DIFERENTES



1: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. 2: *P. putida* IsoF. 3: Medio de cultivo sin inocular. 4: *N*-hexanoil homoserín lactona (patrón sintético) 5: *N*-3-(oxo)-hexanoil homoserín lactona (patrón sintético). 6: acetato de etilo. 7: *N*-tetradecanoil homoserín lactona. 8: *N*-hexanoil homoserín lactona 9: *N*-3-(oxo) hexanoil homoserín lactona. 10: *N*-3-(oxo)-tetradecanoil homoserín lactona (patrón sintético) 11: *P. multocida* en medio condicionado con *B. bronchiseptica*. 12: *B. bronchiseptica* en medio condicionado con *P. multocida*. 13: *P. multocida* super concentrado. 14: *B. bronchiseptica* superconcentrado. 15: Co-cultivo superconcentrado. 16: Diclorometano

ANEXO F: PREMIO MENCIÓN DE HONOR “MEJOR TRABAJO DE INVESTIGACIÓN” EN MODALIDAD POSTER POR LA SOCIEDAD URUGUAYA DE MICROBIOLOGÍA EN EL XX CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA



Premio Mención a

Juan Sebastián López Fernández

por la presentación del Poster

Determinación del daño histológico producido por la interacción entre *Pasteurella multocida* y *Bordetella Bronchiseptica* debido a señalización extracelular en la patogénesis

Autores : Juan Sebastián López Fernández, Carlos Arturo Iregui Castro, Catalina Arévalo Ferro
Universidad Nacional de Colombia

en el XX Congreso Latinoamericano de Microbiología y el IX Encuentro Nacional de Microbiólogos

Montevideo, 27 al 30 de setiembre de 2010.-

Dr. Pablo Zunino
Presidente de la Sociedad Uruguaya de Microbiología

Dra. Matilde Soubes
Presidente del XX Congreso Latinoamericano de Microbiología

155

ANEXO G: PRESENTACIÓN CHARLA EN EL CURSO TEÓRICO-PRÁCTICO “Quorum Sensing in-plant associated bacteria” EN EL CENTRO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA, EN TRIESTE, ITALIA.

INTERNATIONAL CENTRE FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY

This is to certify that

Juan Sebastián LÓPEZ FERNÁNDEZ

attended the Theoretical and Practical Course

“Quorum Sensing in Plant Associated Bacteria”

23 - 26 May 2011, Trieste, Italy

The Course consisted of 26 hours of lectures and guided discussion

The topics covered included:

- Quorum sensing in plant pathogenic bacteria
- Quorum sensing in plant beneficial bacteria
- Interspecies communication
- Interkingdom signaling
- Stability of bacterial communities
- Future trends

Dr. Vittorio Venturi
ICGEB
Trieste, Italy

Prof. F.E. Baralle
ICGEB Director-General
Trieste, Italy

ANEXO H: Presentación modalidad poster en la reunión numero 62 de la Sociedad Canadiense de Microbiologos, en Vancouver, Canadá



Event: CSM 2012 Vancouver
20-23 June 2012
The University of British Columbia

To Whom it May Concern:

This letter hereby confirms that registrant Sebastian Lopez did attend and fully participate in CSM 2012 held at the University of British Columbia Vancouver, Canada from June 20-23, 2012.

Best Regards,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jo Jorgenson', is written over a horizontal line.

Jo Jorgenson
CSM 2012 Secretariat
Conferences and Accommodation at UBC
5961 Student Union Blvd.
Vancouver, BC, V6T 2C9
Tel: +1 (604) 822-1050
Toll-Free: 1-888-822-1030 ext: 21050
Fax: +1 (604) 822-1069
E-mail: secretariat@thecon.ubc.ca

Conferences and Accommodation at UBC 5961 Student Union Boulevard Vancouver BC V6T 2C9
Telephone 604 822 1060 Facsimile 604 822 1069 Toll-Free 1 888 822 1030 Website