UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Exposición simultánea y secuencial al lipopolisacárido de *Pasteurella multocida* y a la bacteria en cultivos de fosa nasal de conejo

Clara Stefany Romero Hurtado

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Bogotá, Colombia
2012

Exposición simultánea y secuencial al lipopolisacárido de *Pasteurella multocida* y a la bacteria en cultivos de fosa nasal de conejo

Clara Stefany Romero Hurtado

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Salud Animal

Director

DMV, DVM, Carlos Arturo Iregui Castro

Línea de Investigación:

Fisiopatología Veterinaria

Grupo de Investigación:

Patobiología Veterinaria

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia

Bogotá, Colombia

2010

(Dedicatoria o lema)

A mis padres, a mi hermano, a mi lindo sobrinito, a mis abuelitas y a

Nicolás y Roberto Romero Hurtado:

Como me haces falta, como me haces falta, la noche es quieta y se oye mi voz te está llamando mi alma.

Como me haces falta, como he haces falta, no aguanto más creo que partiré la soledad me espanta, no quiero ver que mi vida se fue y tu haciendo me falta

Agradecimientos

Al Doctor Iregui mi inmensa gratitud por su predisposición permanente e incondicional en la dirección y asesoramiento científico de éste trabajo y por el estímulo constante para continuar creciendo intelectualmente.

A Pita quien llegó para alegrarme los días.

A todos los conejitos que percibieron mi dolor en cada experimento.

Al Doctor Doncel por su hospitalidad.

A la Doctora Lucía Botero por su fraternidad.

A todos mis compañeros del laboratorio, por los días de estudio, dedicación, técnicas y experimentos que enriquecieron mi estadía en la universidad.

Resumen

Las enfermedades respiratorias son una de las entidades que generan las mayores pérdidas económicas en varios sistemas de producción y *Pasteurella multocida* es reconocida como el agente causal predominante en este tipo de afecciones. En este trabajo se determinó el papel que cumple el lipopolisacárido (LPS) de *P. multocida* en cuanto a la adhesión de la bacteria durante las primeras fases de infección en el epitelio respiratorio y los efectos deletéreos de la bacteria sobre las células del tejido. Para la evaluación de las lesiones se utilizó microscopia óptica de luz y para estimar la cantidad de bacteria adherida al epitelio respiratorio así como la cantidad de LPS presente en citoplasma de células caliciformes se utilizó la técnica de doble marcación enzimática y evaluación computarizada de las imágenes obtenidas por la doble coloración. En los epitelios expuestos con LPS de *P. multocida* y *P. multocida* simultáneamente así como en los retados con LPS de *P. multocida* y 30 minutos después *P. multocida* se obtuvo mayor cantidad de bacterias adheridas y lesiones más severas respecto de los tratamientos que incluían únicamente *P. multocida* y *P. multocida* más 30 minutos después LPS de *P. multocida*. Los anteriores hallazgos siguiere que el LPS de *P. multocida* colabora en el proceso de adhesión de la bacteria lo que permite un mayor número de *P. multocida* adherida a las células respiratorias y con ello a un mayor número de lesiones en el mencionado epitelio.

Palabras clave: Lipopolisacárido, *Pasteurella multocida, e*pitelio respiratorio, células caliciformes, células ciliadas.

Abstract

Respiratory diseases are major causes of economic losses in all production systems, and *Pasteurella multocida* has been recognized as one the main causing agents involved. In this project we have evaluated the role of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide, (LPS) in the ability of the bacteria to attach to the tissue during the initial phases of infection of respiratory epithelium, as well as the effects of the bacterial infection on the tissue. Light microscopy was used to evaluate the tissue lesions. In order to assess the amount of bacteria attached to the respiratory epithelium, and the amount of LPS in the cytoplasm of goblet cells, we used enzymatic labeling and computer analysis of the images. In epithelium exposed to simultaneous LPS and P. multocida or sequentially LPS followed by *P. multocida* 30 minutes later, we observed higher amounts of bacteria attachment and more severe lesions compared to the to the cell cultures treated with only P. multocida or with P. multocida followed by LPS treatment 30 minutes later. The present data suggest that *P. multocida's* LPS aids in the adhesion process, allowing for higher numbers of bacteria to attach to the respiratory epithelial cells, and therefore to a higher amount of lesion on the epithelium.

Keywords: Lipopolysaccharide*, Pasteurella multocida,* respiratory epithelium, goblet cells, ciliated cells.

Contenido

	Pág
Lista de figuras……..... XI	
Lista de tablas……..... X	
Lista de abreviaturas……... XI	
1. Capítulo 1. …… 15	
1.1 Introducción general a la enfermedad respiratorio por *Pasteurella multocida*….....	15
1.2 Antecedentes históricos de *Pasteurella multocida*…...……..	15
1.2.1 Factores de virulencia…….....	18
1.3 El lipopolisacarido …….	20
1.3.1 Antecedentes históricos…….	20
1.3.2 Estructura química del lipopolisacárido de *Pasteurella multocida*……...	22
1.3.2.1 El lípido A…….....	22
1.3.2.2 El núcleo o *core*……..	24
1.3.2.3 Efectos generales del lipopolisacárido…….	26
1.4 Complejo respiratorio de los conejos…….	27
1.4.1 Aspectos generales…….	27
1.4.2 Formas de presentación……	28
2. Capítulo 2……..... 32	
2.1 Introducción……	32
2.2 Materiales y métodos……	34
2.2.1 Aislamiento de la bacteria……...	34
2.2.2 Secuenciación de la cepa bacteriana……	34
2.2.3 Mantenimiento y realce de la virulencia de la bacteria……...	35
2.2.4 Extracción, purificación, cuantificación y actividad biológica del LPS	

de *Pasteurella multocida*……... 35
2.2.5 Cultivo in vitro (Explantes) de Septo Nasal de Conejo……... 36
2.2.6 Diseño Experimental……. 37
2.2.7 Procesamiento de los Tejidos……. 38
2.2.8 Valoración de las lesiones por Hematoxilina-Eosina……. 39
2.2.9 Análisis de Imágenes de marcación de LPS con lectinohistoquímica y de *Pasteurella multocida* con inmunoperoxidasa indirecta…….…… 41
2.2.10 Análisis estadístico: estimación de la cantidad de LPS en el citoplasma y superficie apical de células caliciformes y de bacterias adheridas al epitelio respiratorio…….. 43
2.3 Resultados……. 45
2.3.1 Secuenciación de la bacteria……. 45
2.3.2 Extracción, purificación, cuantificación y actividad biológica del LPS de *P. multocida*……... 46
2.3.3 Exposición simultánea y secuencial al LPS de *P. multocida* y a *P. multocida* en explantes de fosa nasal de conejo (H&E)…….. 46
2.3.4 Estimación de la cantidad de LPS contenido en el citoplasma y superficie apical de células caliciformes y *P. multocida* adheridas al epitelio respiratorio (IPI-LH)…… 50
2.3.5 Resultados estadísticos…….. 53
2.4 Discusión…… 55
Conclusiones y recomendaciones……. 63
Bibliografía…… 64
A. Anexo: Mantenimiento de la bacteria sistema Cryobank®…… 82
B. Anexo: Extracción y purificación del LPS por método fenol – agua caliente 83
C. Anexo: Cuantificación del LPS…… 85
D. Anexo: Doble marcación enzimática Peroxidasa – fosfatasa alcalina indirecta…….. 86
E. Anexo: Árbol de distribución de distancias para *P. multocida* y secuencia Consenso entre los oligos 27-F y 1942-R para la muestra *P. multocida*…… 88

F. Anexo: Secuencia Consenso entre los oligos 27-F y 1942-R para la muestra *P. multocida*…… 89
G. Anexo: Tabla de registro prueba de esterilidad del LPS……. 90
H. Anexo: Número de pixeles de *P. multocida* y de LPS de *P. multocida* para cada una de las repeticiones de los tratamientos…….. 91
I. Anexo: Resultados estadísticos SAS Pixeles *Pasteurella multocida*……... 92
J. Anexo: Resultados estadísticos SAS Pixeles LPS de *P. multocida*……. 96

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Estructura del lípido A de *Pasteurella multocida*…….. 22

Figura 1-2: Representación propuesta de la disposición del LPS en la membrana externa de *P. multocida*……... 23

Figura 1-3: Estructura del core de *P. multocida*……..... 24

Figura 1-4a: Glicoforma A del LPS de *P. multocida*…….. 25

Figura 1-4b: Glicoforma B del LPS de *P. multocida*…….. 25

Figura 2-1. Regiones anatómicas para la evaluación cualitativa y semicuantitativa de las lesiones en el explante…….. 40

Figura 2-2: Análisis de imágenes en el programa ImageJ 1.41…… 42

Figura 2-3: Epitelio respiratorio de septo nasal expuesto simultánea y secuencialmente al LPS de *P. multocida* y a *P. multocida*……..... 58

Figura 2-4: Actividad de células caliciformes para los cinco tratamientos…….. 49

Figura 2-5: Exposición simultánea y secuencial al LPS de *P. multocida* y a *P. multocida* en explantes de septo nasal lectinohistoquímica (LH) e inmunoperoxidasa…… 52

Figura 2-6: Promedio de pixeles para el número estimado de bacterias adheridas al borde ciliado de células ciliadas……. 54

Figura 2-7: Promedio de pixeles para el número estimado de lipopolisacárido de *P. multocida*…… 54

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Tratamientos a los que fueron sometidos los explantes de septo nasal de feto de conejo…….....	37
Tabla 2-2: Gradación de severidad de lesiones en H&E……	39
Tabla 2-3: Tratamientos a comparar……	44
Tabla 2-4: Porcentaje de identidad de *P. multocida* utilizada en este trabajo….....	45
Tabla 2-5: Grados cambios y lesiones para cada uno de los tratamientos (H&E)……..…	47
Tabla 2-6: Promedio de la cantidad estimada de LPS en el contenido y superficie apical de las CC y de la cantidad de bacterias adheridas al borde ciliado del epitelio respiratorio…….	51

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
ACC	Actividad de células caliciformes
AGS	Adenocarcinoma epitelial cells line
ANAVA	Análisis de varianza
CC	Células caliciformes
CD	Células descamadas
CD14	Cluster of differentiation 14
CHOS	Carbohidratos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G -	Gram negativas
Glac	Galactosa
GlaNAc	N-acetul-D-glucosa
Glc	Glucosa
GPL	General Public License
h	Horas
H&E	Hematoxilina y Eosina
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IL-1	Interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
IP	Via intraperitoneal
IPI	Inmunoperoxidasa indirecta
KDO	3-deoxy-D-manno-octulosonico

LD-Hep	L-glycero-D-manno-heptosa
LH	Lectinohistoquimica
LOS	Lipooligosacárido
LPA	Limulus polyphemus
LPS	Lipopolisacárido
MC	Muerte celular
MD-2	Proteína de diferenciación mieloide 2
MEM	Medio Esencial Mínimo Eagle Dulbecco
NCBI	National center for Biotechnological information
PC	Pérdida de cilias
PCho	Fosfocolina
PCR	Reacción en cadena de la polimeraza
PEtn	Fofatoetanolamina
PMT	Toxina de *Pasteurella multocida*
RDP	Ribosomal Database
SM	Septum medio
SV	Septum ventral
TLR4	Toll like receptor 4
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
UFC	Unidades formadoras de colonia
VC	Vacuolas citoplasmáticas

Introducción

La *Pasteurella multocida* es considerada el agente causal más importante de las enfermedades respiratorias en los conejos y es el microorganismo que genera las mayores de pérdidas económicas en los sistemas de producción cunícola (Murataugh *et al.,* 1996; Bureau *et al.,* 2001; Retamal, 2001.

En la práctica productiva, esta especie es con frecuencia sometida a sobrepoblación, cambios drásticos de temperatura o estrés, situaciones que contribuyen a la aparición natural de la enfermedad respiratoria por *P. multocida* (Manning, 1982; Kawamoto *et al*., 1900; Deeb *et al.,* 1999; Deeb & DiGiacomo, 2000; Takashima *et al.,* 2001, Jaglic *et al.,* 2006; Stahel *et al.,* 2009).

La adhesión bacteriana a un tejido se considerada como la etapa esencial y el primer desafío que debe superar un microorganismo para causar enfermedad (Paradis *et al.,* 1994; Fletcher, 1996; Jaques, 1996; Triandafillu *et al.,* 2003). Este proceso ocurren entre moléculas presentes en la superficie de las células epiteliales y bacteriana, es conocido que el componente más abundante de la superficie de las bacterias Gram negativas (G -) es el lipopolisacárido (LPS) (Hermannson *et al.,* 1982; Rimler and Rhoades 1999; Raetz and Whitfield; Boyce *et al.,* 2004), por lo que podría tener un papel relevante durante la adhesión a los epitelios.

A pesar de lo anterior, los estudios de la participación de esta molécula en los procesos de adhesión y colonización de las bacterias G - a los epitelios son escasos y los superan aquellos dedicados a otras estructuras bacterianas tales como la fimbria (De Weger *et al.,* 1987; Ruffolo *et al.,* 1997; Ofek *et al.,* 2003; Lui *et al.,* 2004). Belanger *et al.,* 1992; Fletcher *et al.,* 1993; Gupta *et al.,* 1994; Pier *et al.,* 1996; Tang *et al.,* 1996, proponen que el LPS es esencial para la adhesión de bacterias Gram negativas (G -); en la presente investigación se propuso determinar si el LPS de *P. multocida* actúa como adhesina favoreciendo de esta manera la adhesión de un mayor número de bacterias y de efectos deletéreos sobre las células del epitelio respiratorio de fosa nasal de conejo.

Capítulo 1. Revisión de literatura

1.1. Introducción general a la enfermedad respiratoria por *Pasteurella multocida*

Las infecciones respiratorias por bacterias Gram negativas (G -) en distintas especies animales domésticas y salvajes representan un problema sanitario y económico significativo (Retamal, 2001). *Pasteurella multocida* es considerado uno de los principales agentes patógenos involucrados en este tipo de enfermedades, a esto se debe agregar la complejidad de que ella forma parte de la microbiota normal de las vías aéreas superiores de sus hospederos y que bajo circunstancias de normalidad parece mantenerse en un aparente estado de equilibrio con sus hospederos; con todo, en condiciones ecológicas que le son favorables, es capaz de desarrollar propiedades de virulencia e inducir enfermedad (Mackowiak, 1982; Tannock, 1990; Gamiño *et al.,* 2005).

1.2. Antecedentes históricos de *Pasteurella multocida*

Es un microorganismo G - que pertenece a la familia *Pasteurellaceae*; según Gray (1939), fue Toussaint quien lo aisló por primera vez en 1879 de aves que morían súbitamente o con signos clínicos como cianosis de la cresta y barbillas, descarga nasal y ocular purulenta e inflamación en dedos y patas. En 1880 Louis Pasteur caracterizó morfológica y bioquímicamente un microorganismo aislado de muestras sanguíneas de aves silvestres que morían con signos similares a los descritos por Toussaint (Pasteur, 1880; Gray 1913).

Desde su aislamiento la bacteria ha recibido varios nombres, el primero fue propuesto por Burril (1883) como *Micrococcus gallicidus;* Kitt en 1893 propuso *Bacterium multicidum* ya que a demás de aves afectaba porcinos, equinos y bovinos. Hueppe (1886) lo nombró *Bacterium septicaemia haemorrhagica* por ser el agente casal de la septicemia hemorrágica en los bovinos; hacia 1887 Trevisan propuso el nombre genérico de *Pasteurella* en honor a Pasteur y desde entonces se conoce bajo este último.

Luego surgirían las primeras clasificaciones de la bacteria basadas en los hospederos así, Ligniéres (1900) establecería la primera clasificación como *P. bovicida, P. avicida, P. boviseptica*; Topley & Wilson (1929) introdujeron a la clasificación de Ligniéres a *P. séptica,* pero no sería sino hasta Rosenbusch y Merchant (1939) que se designaría con el nombre definitivo de *Pasteurella multocida,* haciendo alusión a quien la caracterizara y a sus múltiples hospederos (Trevisan, 1887; Weber *et al.,* 1984). Roberts (1947) utilizaría antisueros preparados en conejos con sintomatología de enfermedad respiratoria por *Pasteurella multocida* subespecie *séptica* para proteger a ratones contra la exposición de varias cepas de otras pasteurellas. Bajo el sistema propuesto por Roberts de protección pasiva en ratones, fue posible identificar cuatro serogrupos distintos: I, II, III y IV. Carter (1955) utilizaría una prueba de hemoaglutinación con eritrocitos humanos del grupo O y extractos capsulares purificados de *P. multocida* para identificar cuatro serogrupos a los que denominó tipo capsular A, B, C y D.

En 1967, Carter, analizó algunos aislamientos de un brote de cólera aviar de África Central y no encontró similitudes con los ya establecidos bajo su protocolo e incluyó uno nuevo tipo, al que adjudicó la letra E. Más tarde se encontró que el tipo C era esporádico y desde 1963 no volvió a registrarse, por tal motivo fue excluido. Rimler & Rhoades (1987) aislaron de pavos un grupo de bacterias que no coincidían con ninguno de los serogrupos existentes, por lo que añadieron a la lista el tipo F, que actualmente afecta a pavos y conejos (Jaglic *et al.,* 2008). En 1963, Namioka & Bruner desarrollaron una prueba de aglutinación donde utilizaban el extracto bacteriano que quedaba después de someter a la bacteria a una mezcla de ácido clorhídrico (HCl) y antisueros de conejos.

Bajo este esquema era posible identificar 11 serotipos distintos; el extracto bacteriano fue bautizado como antígeno O por su analogía con las pruebas serológicas de *P. multocida* en las que utilizaban como antígeno glóbulos rojos del grupo O de humanos (Carter 1955). Si bien el O del grupo sanguíneo deriva del sistema de clasificación ABO descrito por el patólogo austriaco Karl Landsteiner para los hemogrupos humanos donde O corresponde a cero (Ø) ó al hemogrupo que no expresa los antígenos A o B en su superficie (O del alemán Ohne = *sin, faltante, carente*), no significaba que la bacteria careciera del extracto bacteriano utilizado para identificar a los 11 serotipos, como la expresión "antígeno O" podía resultar confusa, ese mismo año el extracto bacteriano fue rebautizado como "antígeno somático" así no se suscitaba confusión alguna y quedaba claro que era constitutivo del microorganismo (Namioka y Bruner, 1963).

Una década después Heddleston *et al.* (1972) desarrollaron una técnica de precipitación en agar gel para la tipificación somática, con el propósito de identificar cepas de cólera aviar. La prueba incluía el uso de un sobrenadante de un cultivo bacteriano de *P. multocida* luego de ser sometido a centrifugación y calentamiento a 100ºC por 60 min. Con esta técnica era posible identificar 16 tipos somáticos diferentes; Brogden & Packer (1979) encontraron que el sobrenadante por tratamiento térmico de Heddleston y el componente extraído del tratamiento con HCl de Namioka & Bruner (1963) correspondían al mismo antígeno de superficie bacteriana, el lipopolisacárido (LPS), y que los resultados de ambos protocolos coincidían en 16 serotipos somáticos si en la prueba de Namioka y Bruner se utilizaba además de HCl un calentamiento a 56ºC por 60 min o 100 ºC por 30 min (Harper *et al.,* 2011). En la actualidad se identifican 5 serogrupos (A,B,D,E y F) basados en la capsula y 16 serotipos somáticos (1-16) basados en la estructura del LPS (Carter, 1967; Heddleston *et al.,* 1972; Brogden & Packer, 1979), además se divide en cuatro subespecies según su capacidad de utilizar trehalosa, dulcitol y sorbitol: *P. multocida* subespecie *multocida,* subespecie *septica*, subespecie *gallicida* (Koneman *et al.,* 1999) y *tigres*, las dos primeras se aíslan de mamíferos y aves, la tercera de aves y la última de grandes felinos (Christense *et al.,* 2005).

1.2.1 Factores de virulencia

Varios factores de virulencia se han descritos para *P. multocida,* dentro de los que se incluyen: la cápsula o polisacárido capsular (Boyce & Adler, 2000), la sialidasa o neuraminidasa (Scharmann *et al.,* 1969; White *et al.,* 1995; Straus *et al.,* 1996). La fimbria o pili, la toxina PMT, la hemaglutinina filamentosa, proteínas externas de membrana (OMP) (Geschwend *et al.,* 1997), el sistema de metilación de la adenina (Chen *et al.,* 2003) y el LPS (Rimler & Rhoades, 1989).

La cápsula se documenta como uno de los principales factores de virulencia de muchas bacterias patógenas, está constituida por polisacáridos y juega un papel importante en la adhesión a la superficie de los epitelios, aumenta la tolerancia a la desecación, puede afectar la fagocitosis (Smith *et al.,* 1999) y reducir la acción del complemento (Sinepes & Hirsh, 1986); algunas cepas de *P. multocida* son acapsulares y en general se reconoce que son menos virulentas y más susceptible a la fagocitosis (Sinepes *et al.,* 1987; Smith *et al.,* 1999; Boyce *et al.,* 2000). Se sabe que existe variabilidad en la composición de la cápsula, por ejemplo, la de *P. multicida* tipo A posee ácido hialurónico y el polisacárido (1.4)-β-D-xylan (Rosener *et al.,* 1992); el tipo D contiene ácido hialurónico y heparina y el tipo F glucosaminoglicanos y condroitin (Rimler, 1994).

La sialidasa o neuraminidasa es la única enzima extracelular glucolítica producida por la *P. multocida* (Corfield, 1992), es importante en la nutrición de la bacteria puesto que con ella obtiene la fuente de carbono por ruptura de enlaces glucosídicos del ácido siálico de la superficie epitelial de sus hospederos (Rodríguez *et al.,* 1987; Corfield, 1992).

La fimbria o pili es una proteína de superficie, se han identificado dos tipos de pili para *P. multocida,* en el serogrupo D el pili tipo 1, el cual permite la unión a receptores que contengan carbohidratos (CHOs) como D-manosa, que en bacterias como la *E. coli* permite la adhesión al epitelio del tracto gastrointestinal y urinario (Ofek *et al.,* 2003).

En los serogrupos A, B y D se describe el pili tipo 4 el cual tiene afinidad a receptores disacáridos como GalNAC(1-4)Gal y en bacterias como *P. aeruginosa* permite la

adhesión a células cornéales y a superficies plásticas y métalicas, además este pili es la estructura responsable del "*twitching motility"* que permite el desplazamiento de bacterias como *P. aeruginosa, Neisseria gonorrhoeae* y *Myxococcus xanthus* (Shi *et al.,* 1996; Watson *et al.,* 1996; Ward and Zusman, 1997; O`Toole and Kolter, 1998). Para *P. multocida* la fimbria tipo 4 solo se ha detectado como estructura de adhesión a la superficie de la mucosa de nasofaringe y en células HeLa, sin embargo no ha sido posible comprobar el desplazamiento de la bacteria a partir de esta fimbria como ocurre en los patógenos arriba descritos (Ruffolo *et al.,* 1997; Doughty *et al.,* 2000).

La toxina de *P. multocida* (PMT) o toxina dermonecrótica es producida por el serogrupo D*,* es el factor de virulencia más importante en la rinitis atrófica de los porcinos, está constituida por 1285 aminoácidos y es codificada por el gen *ToxA* de la bacteria, se le conoce como un factor mitogénico en células como fibroblastos y osteoclascos (Rimler & Rhoades, 1989).

Se han identificado dos genes que codifican para la expresión de hemaglutininas filamentosas conocidos como *fhab1 y fhab2* en *P. multocida* A:3 causante del cólera aviar*.* Estudios recientes en pavos demostraron que la inactivación del gen *fhab2* resulta en un alto grado de atenuación de la bacteria cuando se inocula vía intranasal, lo que sugiere un rol importante para esta proteína en la invasión y colonización (Tatum *et al.,* 2005).

Las proteínas de membrana externa (OMP) son consideradas factores de patogenicidad e imunogenicidad de las bacterias G (-) (Denner & Potter, 1989). En *P. multocida* se han identificado más de 50 genes que codifican para OMP involucradas en la captación del hierro, ion importante para la replicación y supervivencia de la bacteria dentro del hospedero (Garrido, 2005). Las porinas son OMP presentes en *P. multocida*, algunas forman canales tipo III a través de los cuales pasan moléculas de bajo y alto peso como hierro y vitamina B12 hacia el espacio periplásmico (Braun, 1995).

Otras como la proteína H tienen un alto poder de inmunogenicidad estimulando la producción de anticuerpos, por lo que es considera uno de los principales antígenos de membrana externa de la bacteria (Lee *et al.,* 2007).

El sistema de metilación de la adenina funciona a través de la DNA adenina metilasa (Dam) que sustituye uno o varios átomos de hidrógeno por grupos metílicos en la adenina de los sitios 5'-GATC-3', regulando de esta forma la replicación y reparación del de DNA así como la transcripción de algunos genes (Boye & Lobner-Olesen, 1990). Chen *et al.* (2003) encontraron un aumento en la tasa de mutación espontánea de *P. multocida* al poner en contacto la Dam con un promotor expresado en un plásmido, sugiriendo que la Dam puede funcionar como reguladora de genes de virulencia en *Pasteurellaceae* tal y como ocurre en otras bacterias G - como *E. coli,* en la que este sistema regula la expresión de las principales proteínas de membrana externa (Henderson & Owen, 1999) y cuya Dam tiene una similitud del 55% con la de *P. multocida* (Chen *et al.,* 2003).

1.3. El lipopolisacárido

1.3.1. Antecedentes históricos

La aparición de una molécula capaz de inducir fiebre y enfermedad como consecuencia de una pobre higiene llamó la atención en el siglo XVIII, nombrada en ese entonces como material pirógeno o toxina, cobraría gran importancia en 1872 cuando un bacteriólogo alemán atribuiría la gran mayoría de las muertes en las guerras no a los ataques de tropas contrarias sino a una partícula proveniente de microorganismos a la que llamó “Microsporon septicum’’.

En 1874 el patólogo danés Panum quien extraía sustancias de materia orgánica en descomposición, reportó una sustancia resistente al calor, no volátil, soluble en agua y capaz de inducir fiebre; años más tarde Robert Koch con el desarrollo de las primeras técnicas de cultivo bacteriano, demostró que las bacterias que crecían en éstos, eran capaces de generar sepsis en animales en los que eran inoculadas (Rietchel *et al.,* 1999).

En 1892 Richard Pfeiffer trabajando en el laboratorio de Koch, identifico una molécula resistente al calor proveniente de lisados de *Vibrio cholerae* causante de shock toxico en animales, este hecho llamó su atención pues la aparición del shock no se relacionaba con la presencia de las bacterias vivas; desde entonces los productos tóxicos secretados por bacterias vivas se conocieron como *toxinas* y los materiales tóxicos constitutivos de éstas como *endotoxina* (Rietschel & Cavaillon, 2002). Entre 1930 y 1940 gracias al avance en técnicas bacteriológicas fue posible discernir las primeras características químicas de la molécula, se logro identificar una porción lipídica y una glicosídica, motivo por el cual recibe el nombre de lipopolisacárido (LPS), años más tarde se establecería que el LPS hace parte de la segunda membrana de las bacterias G - y que no se encuentra en bacterias Gram positivas (Rietschel *et al.,* 1999).

1.3.2. Estructura química del LPS de *Pasteurella multocida*

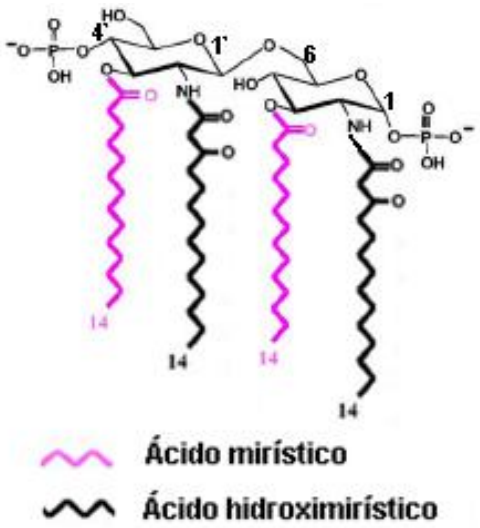
El LPS es una molécula glicolipídica anclada a la membrana externa y se le considera como el antígeno de superficie más importante de las bacterias G -, como quiera que ella representa las tres cuartas partes de su superficie (Mayeux, 1997; Raetz & Whitfield, 2002). Se encuentra altamente conservada entre las distintas especies de bacterias G -, no obstante se pueden encontrar diferencias en cuanto a su estructura y composición, así en algunas especies el LPS está constituido por tres regiones a saber, el lípido A, el núcleo o “core” del LPS y una cadena lateral de azúcares conocida como antígeno O, en otras en cambio solo se encuentra el lípido A y el núcleo (Rimler, 1990).

El LPS que contiene las tres regiones recibe la denominación de *lipopolisacárido* (LPS), mientras que LPS que carece de antígeno O recibe el nombre de *lipooligosacárido* (LOS), tal es el caso de *P. multocida* tipo A, B, D y E que carecen de la expresión del antígeno O en sus respectivos LPS siendo éstos LOS. (Hitchcock & Brown, 1983; Lugtenberg *et al.,* 1984; Peppler, 1984; Manning *et al.,* 1986; Rimler, 1990).

1.3.2.1. Lípido A

El lípido A de *P. multocida* está constituido por un disacárido de glucosamina unidos entre sí por un enlace β1- 6. A cada molécula de glucosamina se le une una molécula de ácido hidroximirístico a través de un enlace amida en las posiciones 2 y 2`, y en las posiciones 3 y 3` se une una molécula de ácido mirístico (Erler *et al.,* 1977; Strain *et al.,* 1983; Caroff & Karibian, 2003) (Figura 1-1).

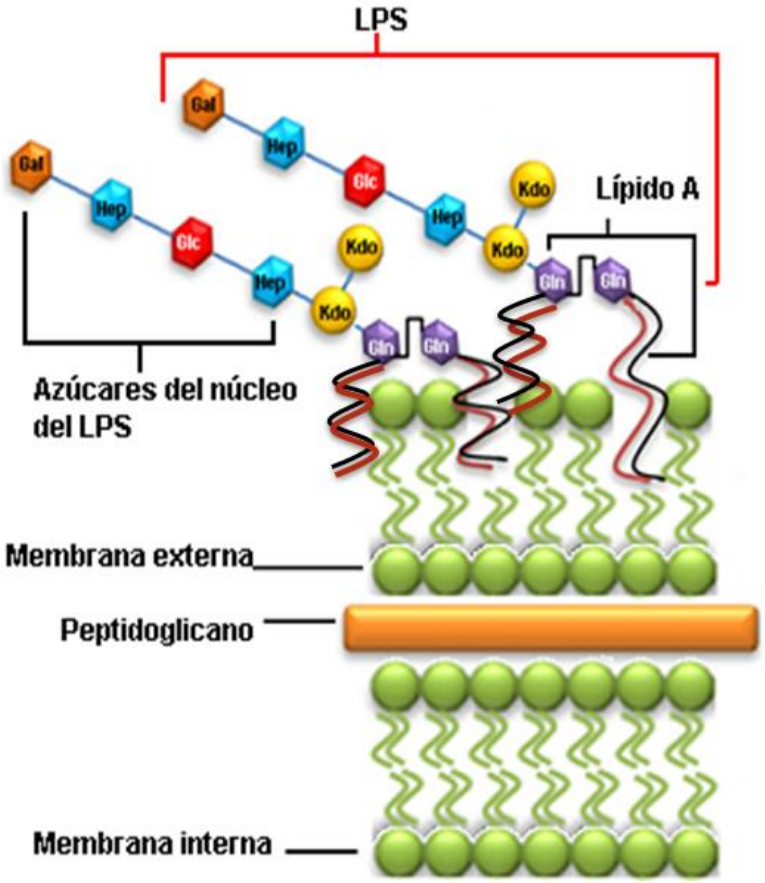
Figura 1-1: Estructura del lípido A de *Pasteurella multocida*



Modificado de: (Caroff & Karibian, 2003).

Los ácidos grasos del lípido A se insertan en la membrana externa de la bacteria y se asume que el disacárido protruye en un ángulo de 45º con respecto a ella (Weckesser & Mayer 1988; Rietschel & Brade, 1992) (Figura 1-2).

Figura 1-2: Representación propuesta de la disposición del LPS en la membrana externa de *P. multocida*.

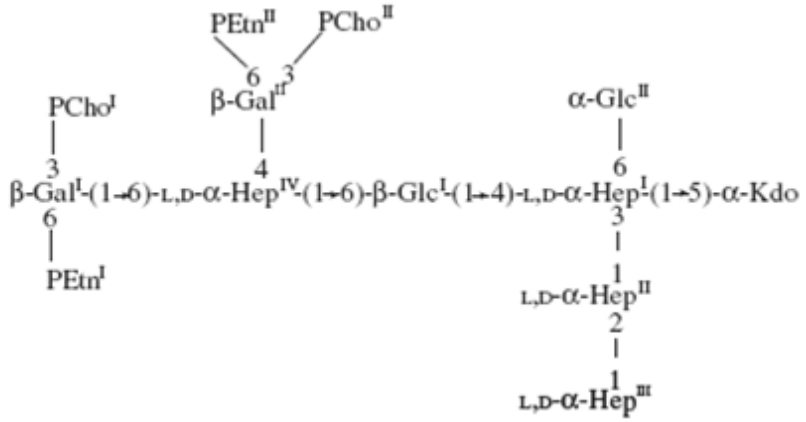


Adaptado de Weckesser & Mayer, 1998.

1.3.2.2. Núcleo o *Core*

Típicamente el núcleo de LPS consta de 8 a 12 unidades de CHOs; en el caso de *P. multocida* éste contiene los sacáridos L- glycero-D-manno-heptosa (L,D-Hep), glucosa (Glc) y galactosa (Gal), lineales y ramificados, además de las aminas fosfatadas fosfoetanolamina (PEtn) y fosfocolina (PCho) (Figura 1-3) (Michael *et al.,* 2005).

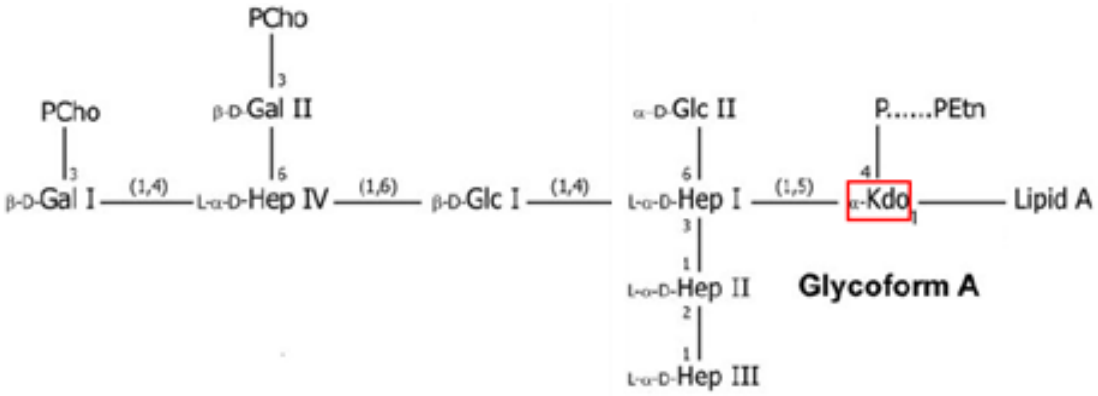
Figura 1-3: Estructura del core de *P. multocida*



(Michael *et al.,* 2005)

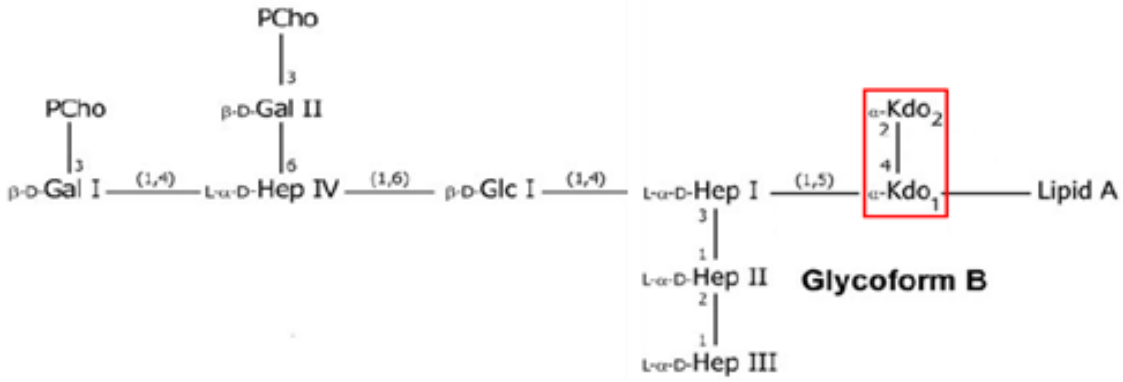
El núcleo y el lípido A se unen entre sí a través del residuo ácido 3-deoxy-D-manno-octulosonico (KDO); recientemente se identifico que el núcleo del LPS de *P. multocida* puede expresar dos glicoformas, la glicoforma A con un residuo KDO (figura 1-4a) y la glicoforma B con 2 residuos (figura 1-4b) y sus implicaciones fisiopatologícas aún no se conocen con detalle (Harper *et al.,* 2007).

Figura 1-4a. Glicoforma A del LPS de *P. multocida*



(Modificado de Harper *et al.,* 2007)

Figura 1-4b. Glicoforma B del LPS de *P. multocida*



(Modificado de Harper *et al.,* 2007)

1.3.2.3 Efectos generales del LPS

El LPS es un potente activador del sistema inmune, con propiedades proinflamatorias y es el principal responsable del shock inducido por bacterias G -. El lípido A es la porción del LPS biológicamente activa, puesto que interactúa con moléculas proteicas del hospedero originando distintas cascadas de reacciones inmunes e inflamatorias (Shenep, 1997).

Cuando el LPS es liberado de la membrana de la bacteria entra en contacto con varias proteínas del suero, entre ellas la proteína de unión al LPS (LBP) y los receptores CD14, TLR4 y MD-2 (Rietschel *et al*., 1996; Backhed *et al*, 2003). La primera es la encargada de capturar al LPS para facilitar la asociación del LPS con el receptor CD14; este receptor es el que transfiere el LPS al complejo de reconocimiento celular (TLR4/MD-2) (Heumann *et al*., 1998; Malhotra *et al.,* 1998). La señal de transducción del LPS inicia con la oligomerización del receptor TLR4 y finaliza con la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL6 y TNFα) o de interferones tipo I (α, β1a y β1b) (Lu *et al*., 2008).

Los productos de la transducción inducen varios tipos de respuestas en el organismo tales como, aumento en la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos y células endoteliales (Cohen, 2002), extravasación de neutrófilos, activación del factor XII de la coagulación, fibrinólisis y la vía clásica del complemento. Posterior a la liberación de citoquinas e interferones debe ocurre la señal de inhibición de la transducción la cual tiene como fin proteger al hospedero de las acciones del LPS (Kobayashi *et al.,* 2002).

Cuando los mecanismos inhibitorios se agotan y prevalecen las respuestas inducidas por el LPS, los eventos mencionados pueden terminar en shock endotóxico, falla multiorgánica y muerte del hospedero (Suffredini *et al.,* 1989; Pixley *et al.,* 1993; Raetz *et al.,* 2002).

1.4 Complejo respiratorio de los conejos

1.4.1. Aspectos generales

Consiste en un proceso patológico multifactorial causado por un grupo de agentes microbianos al parecer favorecidos por un conjunto de factores ambientales externos adversos para los animales; *P. multocida,* aparece como el principal agente implicado en este proceso (Deeb & Digiacomo, 2000).

En conejos los serotipos capsualres de *P. multocida* más prevalentes son el A:3 y el acapsular D:1 (Al-Haddawi *et al.,* 2000), con menos prevalencia se encuentra el tipo F (Jaglic, 2007); el serotipo A:3 es el más frecuentemente aislado de neumonías en esta especie (67%) (Fuller *et al.,* 2000). En Colombia se han identificado para esta especie los serotipos A y D (Moreno, 1995).

Poco se sabe sobre la patogénesis de la pasteurellosis en las distintas especies (Caswell & Williams, 2007). En el conejo se asume que las vías aéreas superiores son el sitio de permanencia de estos patógenos (Deeb *et al.,* 1990); se sugiere que allí bajo circunstancias propicias para el patógeno se inicia su multiplicación descontrolada que podría llevar a dos situaciones, una es la migración y colonización del tracto respiratorio inferior o a otras regiones del mismo tracto superior y la otra es la diseminación sistémica de la bacteria o algunos de sus factores de virulencia vía hematógena, lo que finalmente podría llevar a disfunción multiorgánica (Iregui & Mendoza, 1992; Murillo & Iregui, 1993).

1.4.2. Formas de presentación

Para esta bacteria se describen tres formas principales de presentación clínica: enfermedad respiratoria superior, enfermedad respiratoria inferior y septicemia (Kpodekon *et al.,* 1999).

En la enfermedad respiratoria superior los signos van desde conjuntivitis, rinitis, sinusitis, traqueítis hasta el desarrollo de atrofia de los cornetes nasales; las lesiones histopatológicas corresponden a vacuolización e hinchazón de las células epiteliales, pérdida de cilias asociadas a células en degeneración o necróticas, infiltrado de neutrófilos entre las células epiteliales, hiperplasia, metaplasia y/o hiperactividad de células caliciformes (CC) y algunas bacterias adheridas a las microvellosidades y a las cilias (Fanuchi *et al.,* 1998; Botero & Iregui, 1999 a,b; Yanagihara *et al.,* 2001; Doncel, 2004; Esquinas, 2004).

En la enfermedad respiratoria inferior se presenta una bronconeumonía de tipo lobar fibrinosa (bronconeumonía lobar craneoventral) (Caswell & Williams, 2007) o pleuroneumonía supurativa (Kpodekon *et al.,* 1999); la mucosa nasal y traqueal están congestionadas, el pulmón es firme y se observan áreas nodulares rojas o grises, regiones de atelectasia, presencia de abscesos, bronquios con material purulento y hemorrágico y septos distendidos (Caswell & Williams, 2007).

Al microscopio se encuentra bronconeumonía supurativa o fibrinosa, los alveolos y los bronquios contienen heterófilos, macrófagos, fibrina, edema, eritrocitos, detritus de células necróticas y septos con exudado fibrinoso (Caswell & Williams, 2007).

En la forma septicémica los animales mueren rápidamente entre las 24 a 48 horas siguientes de iniciado el cuadro. Puede haber cianosis de orejas y mucosas oculares; en la necropsia se encuentra edema subcutáneo generalizado, hemorragias en la

pleura y pericardio con abundante cantidad de fluido amarillo que coagula al contacto con el aire (Caswell & Williams, 2007). Congestión severa en pulmón, en el árbol bronquial se observa un contenido generalmente purulento; hay congestión hepática y puede presentar focos blanquecinos en su parénquima que corresponden a necrosis (Glavis & Magyar, 1990).

Microscópicamente en el pulmón se observa congestión, edema, fibrina en espacios alveolares, formación de microtrombos, presencia de heterófilos y hemorragias; en general se reporta un cuadro compatible con el síndrome de dificultad respiratoria aguda del humano (Iregui & Mendoza, 1992).

Exposición simultánea y secuencial al lipopolisacárido de *Pasteurella multocida* y a la bacteria en cultivos de fosa nasal de conejo

Resumen

El presente trabajo se realizó en explantes de fosa nasal de conejo, con el objetivo de determinar si el lipopolisacárido (LPS) de *Pasteurella multocida* colabora con el proceso de adhesión a las células respiratorias y con ello a un mayor desarrollo de lesiones en el tejido. Para estimar la cantidad de *P. multocida* y de su LPS se utilizó la técnica de doble marcación enzimática y posterior a ello un análisis bioinformático de esta manera fue posible estimar el número de bacterias y la cantidad de LPS en el tejido en unidades de pixeles. Se utilizaron 5 tratamientos, control negativo, exposición única con *P*

. multocida, exposición simultánea a LPS de *P. multocida* y a la bacteria, exposición con LPS de *P. multocida* y 30 minutos después la bacteria y exposición con *P. multocida* y 30 minutos después su LPS. Se utilizó un diseño completamente al azar y se obtuvo diferencias en el número de bacterias adheridas y en la cantidad de LPS ($p < 0.001$). Los tratamientos donde se utilizó LPS y bacteria simultáneamente y LPS y 30 min después *P. multocida* aumentó considerablemente el número de bacterias adheridas y lesiones más severas en comparación con los tejidos expuestos con bacteria únicamente y bacteria y 30 min después LPS. Lo anterior sugiere que el LPS de *P. multocida* colabora en el proceso de adhesión permitiendo que un mayor número de bacterias se adhieran al tejido y con ello un mayor daño a las células del epitelio respiratorio.

Palabras clave: Lipopolisacárido, *Pasteurella multocida, e*pitelio respiratorio, células caliciformes, células ciliadas.

Simultaneous and sequential exposure to *Pasteurella multocida's* lipopolysaccharide and microorganism in cultures obtained from rabbit nostrils

Abstract

In the present study tissue explants were obtained from rabbit nostrils, aimed at determining whether the lipopolysaccharide from *Pasteurella multocida* contribute to the bacterial adhesion to respiratory epithelial cells, and therefore to a higher development of tissue lesions. In order to determine the amount of *P. multocida* and its LPS, we used enzymatic labeling, and subsequent computer analysis. The number of bacteria and the amount of LPS was estimated using pixel counts. five treatment groups were evaluated: one group was control, the second was exposure of the tissue to P. multocida only, the third simultaneous exposure to LPS and bacteria, the fourth exposure to LPS and 30 minutes later to P. multocida and the fifth exposure to P. multocida and 30 minutes later to its LPS. Treatments groups randomized and there were obtained statistically significant differences in the number of bacteria attached to the tissue and in the amount of LPS detected ($p<0.001$). Simultaneous treatment with LPS and bacteria as well as LPS followed by *P. multocida* 30 minutes later led to a significant increase in the number of bacteria attached, and to more severe tissue lesions when compared to tissues treated with bacteria only or with bacteria followed by LPS 30 minutes later. All together these data suggest that *P. multocida's LPS* aids in the adhesion process, allowing for a higher number of bacteria to attach to the tissue, causing more damage to the respiratory epithelial cells.

Keywords: Lipopolysaccharide, *Pasteurella multocida*, respiratory epithelium, goblet cells, ciliated cells.

Capítulo 2

2.1 Introducción

La *Pasteurella multocida* es considerada el agente causal más importante de las enfermedades respiratorias en los conejos y es el microorganismo que genera las mayores de pérdidas económicas en los sistemas de producción cunícola (Murataugh *et al.,* 1996; Bureau *et al.,* 2001; Retamal, 2001. En la práctica productiva, esta especie es con frecuencia sometida a sobrepoblación, cambios drásticos de temperatura o estrés, situaciones que contribuyen a la aparición natural de la enfermedad respiratoria por *P. multocida* (Manning, 1982; Kawamoto *et al*., 1900; Deeb *et al.,* 1999; Deeb & DiGiacomo, 2000; Takashima *et al.,* 2001, Jaglic *et al.,* 2006; Stahel *et al.,* 2009).

La adhesión bacteriana a un tejido es el resultado de interacciones fisicoquímicas entre los patógeno y las células blancos de un hospedero de ella dependen la colonización y el establecimiento de la infección, de ahí que sea considerada como la etapa esencial y el primer desafío que debe superar un microorganismo para causar enfermedad (Paradis *et al.,* 1994; Fletcher, 1996; Jaques, 1996; Triandafillu *et al.,* 2003). Las interacciones ocurren entre moléculas presentes en la superficie de las células epiteliales y bacteriana, es conocido que el componente más abundante de la superficie de las bacterias Gram negativas (G -) es el lipopolisacárido (LPS) (Hermannson *et al.,* 1982; Rimler and Rhoades 1999; Raetz and Whitfield; Boyce *et al.,* 2004), por lo que podría tener un papel relevante durante la adhesión a los epitelios.

A pesar de lo anterior, los estudios de la participación de esta molécula en los procesos de adhesión y colonización de las bacterias G - a los epitelios son escasos y los superan aquellos dedicados a otras estructuras bacterianas tales como la fimbria (De Weger *et al.,* 1987; Ruffolo *et al.,* 1997; Ofek *et al.,* 2003; Lui *et al.,* 2004).

Belanger *et al.,* 1992; Fletcher *et al.,* 1993; Gupta *et al.,* 1994; Pier *et al.,* 1996; Tang *et al.,* 1996, proponen que el LPS es escencial para la adhesión de bacterias Gram negativas (G -); en la presente investigación se propuso determinar si el LPS de *P. multocida* actúa como adhesina favoreciendo de esta manera la adhesión de un mayor número de bacterias y de efectos deletéreos sobre las células del epitelio respiratorio de fosa nasal de conejo.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Aislamiento de la Bacteria

La cepa de *P. multocida* utilizada en la presente investigación hace parte del cerapio del grupo de Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional, la cual a su vez había sido obtenida a partir de cornetes, tráquea y pulmón de conejos con signos clínicos de rinitis, enfermedad pulmonar o septicemia. Estos animales procedían de granjas comerciales de la Sabana de Bogotá.

2.2.2. Secuenciación de la cepa bacteriana

A las cepas rotuladas como *P. multocida* se les practicaron los siguientes procedimientos:

- Extracción del DNA.
- Amplificación por PCR de la región de 1465 pb del gen ribosomal 16S.
- Purificación de los fragmentos de PCR y secuenciación con los iniciadores universales: 27F, 1492R.
- Análisis de la cobertura taxonómica por el método Neighbour Joining que entrega el fragmento amplificado 27F y 1492R del DNA ribosomal 16S.
- Limpieza manual de cada una de las bases de cada fragmento secuenciado.
- Ensamblaje de las secuencias y definición de la región consenso mediante la herramienta bioinformática Sequencher 4.9 Gene Code.
- Análisis bioinformático de cada fragmento ensamblado contra diferentes bases de datos de clasificación taxonómica, basada en las secuencias de 16S disponibles en el Ribosomal Database Project (RDP), GreenGenes y National Center for Biotechnological infromation (NCBI).
- Clasificación taxonómica de la región consenso.
- Alineamiento de secuencias tipo, proveniente de la RDP mediante la herramienta Clustal X 2.0.10 para diseñar un árbol de distancia basado en el algoritmo de Neighbour Joining.
- Visualización e interpretación del árbol de distancia y distribución bajo la herramienta Mega4 tree Explorer.
- Alineamiento básico local entre la secuencia consenso de la muestra.

2.2.3. Mantenimiento y realce de la virulencia de la bacteria

La *P. multocida* se mantuvo a – 70 ºC en un sistema de criovial de perlas suspendidas en caldo soya tryptona suplementado con glicerol y sacarosa (Anexo A). Para estimular la virulencia de la bacteria posterior a la descongelación, se inoculó 3 asas de masa bacteriana diluida en 0,5 ml de solución salina al 0.9% vía intraperitoneal (IP) en 3 ratones que tras a la aparición de los primeros signos de enfermedad fueron sacrificados. De hisopados de tráquea y pulmón de esos animales se aíslo nuevamente la bacteria (Esquinas, 2007) y se confirmo su identidad con la inoculada a través de una nueva secuenciación de la cepa bacteriana.

2.2.4. Extracción, purificación, cuantificación y actividad biológica del LPS de *P. multocida*

Para la extracción se utilizó el método descrito por Westphal and Jann (1965) donde la masa bacteriana se pasa por feno y agua caliente. Para eliminar los residuos de fenol se dializó por 48 h contra agua destilada estéril a 3 ºC (Anexo B). Para la cuantificación se empleó la técnica de colorimetría ensayo de purpald descrito por Lee and Tsai (1999); brevemente, este método consiste en la medición del aldehído que se produce al ser oxidado el residuo KDO del LPS por el periodato de Na^+ ($NaIO_4$), el cual reacciona con el purpald (4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol) formando una solución de color violeta que posteriormente es medida con una longitud de onda de 595 nm (Anexo C).

La esterilidad del LPS se comprobó mediante siembra en agar BHI con y sin sangre ovina al 5%, se incubó a 37ºC y se observó el cultivo diariamente durante 6 días para descartar el crecimiento de cualquier contaminante (Gallego, 2007).

La actividad biológica del LPS se determinó en ratones por la técnica descrita por Esquinas (2007), la cual tiene como fin evaluar la capacidad patogénica del LPS obtenido; la prueba consistió en inocular una dosis de 25 µg de LPS disuelto en 100 µl de SSF vía IP en 5 ratones, como control se inyectaron 125 µl de SSF vía IP en otros

5 ratones. Pasadas 8 h de la inoculación se realizó una eutanasia humanitaria de los animales para la posterior evaluación de las lesiones en pulmón e hígado por histopatología y con el propósito de identificar el LPS de *P. multocida* en los animales a los cuales se les inoculó la molécula se realizó inmunohistoquimica con anticuerpos específicos contra LPS de *P. multocida.*

2.2.5 Cultivo in vitro (Explantes) de Septo Nasal de Conejo

El cultivo in vitro de los septos nasales de feto de conejo se llevó a cabo según la metodología descrita por Esquinas (2007) y Gallego (2007).

El procedimiento consistió en la extracción de fetos de 26 días de gestación por cesárea, una vez extraídos se procedió a su eutanasia a través de sección medular, posterior a ello se realizaron cortes transversales y secuenciales de fosa nasal de aproximadamente 2 mm de grosor (explantes), para luego ser mantenidos en medio esencial mínimo Eagle Dulbecco (MEM) durante el tiempo de experimentación.

2.2.6 Diseño Experimental

Los explantes fueron sometidos al siguiente esquema de tratamientos (Tabla 1)

Tabla 2-1: Tratamientos a los que fueron sometidos los explantes de septo nasal de feto de conejo

Número de Explantes	Reto / Tratamientos	Tiempo de Incubación
14	Control negativo 10 ml (explante únicamente con medio de cultivo)	2 h
14	*P. multocida* 10^7 UFC *	2 h
14	LPS 10 µl/ml ** de *P. multocida* + *P. multocida* 10^7 UFC simultáneamente	2 h
14	LPS 10 µl/ml ** de *P. multocida* + 30 min después lavado con MEM y exposición a *P. multocida* 10^7 UFC	2 h
14	*P. multocida* 10^7 UFC + 30 min después lavado con MEM y exposición a LPS 10 µl/ml de *P. multocida*	2 h

* Brockmeier, 2004. ** Halloy, 2004.

Todos los tratamientos fueron sometidos a las siguientes condiciones durante el tiempo de incubación:

- Cámara húmeda con una temperatura de 37 ºC y una atmósfera de 5% de CO_2.
- Explantes en cajas de Petri de 5 cm de diámetro por 2 cm de alto con un volumen total de 10 ml de MEM para cada tratamiento.
- Después de los tiempos de incubación correspondientes de los septos de cada tratamiento durante 2 h se pusieron en cajas de Petri estériles con 10 ml del mismo medio y se incubaron por 60 min adicionales.
- Luego se retiraron del medio, se lavaron nuevamente dos veces con MEM y se fijaron en formalina bufferada al 3,7% por 24 h. De cada tratamiento los tejidos se dividieron en 2 grupos: 7 explantes para la coloración de hematoxilina – eosina (H&E) y 7 para doble marcación enzimática.

2.2.7 Procesamiento de los Tejidos

La evaluación de las lesiones en los septos nasales se hizo mediante microscopía de luz, utilizando la técnica de rutina de H&E.

Para visualizar el LPS de *P. multocida* y a *P. multocida* en el epitelio respiratorio de los septos nasales se hizo doble marcación enzimática, para el primero se utilizó la técnica de lectinohistoquímica (Leathem & Atkins,1983, modificada por Brio & Riera, 1995) y para la segunda se empleó la técnica de inmunoperoxidasa indirecta (IPI) (Meyer and Walker, 1987). Brevemente, para el LPS sobre los cortes de septo nasal se adicionó un conjugado de lectina-enzima, se utilizó la lectina *Limulus polyphemus* (LPA) conjugada con la enzima fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase Conjugated *Limulus polyphemus* Lectin -Horseshoe Crab- de EY laboratorios Inc), la cual se une específicamente al azúcar 2-keto-3-deoxioctanato (KDO) del núcleo del LPS (Pistole, 1981). Para la visualización de la bacteria se utilizaron anticuerpos policlonales producidos en oveja marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Para la visualización simultánea del LPS y la bacteria se realizó primero la técnica de inmunoperoxidasa y antes de su revelado las secciones de tejido se incubaron con lectina LPA conjugada con la enzima fosfatasa alcalina; Para mayor seguridad del

contacto directo de los antígenos, anticuerpos y lectina con el tejido, se dejaron secar los cortes durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de adicionar los mismos, así durante los tiempos de incubación las superficie del tejido se mantuvo en contacto directo con soluciones antes mencionadas (Anexo D).

2.2.8 Valoración de las lesiones por Hematoxilina-Eosina

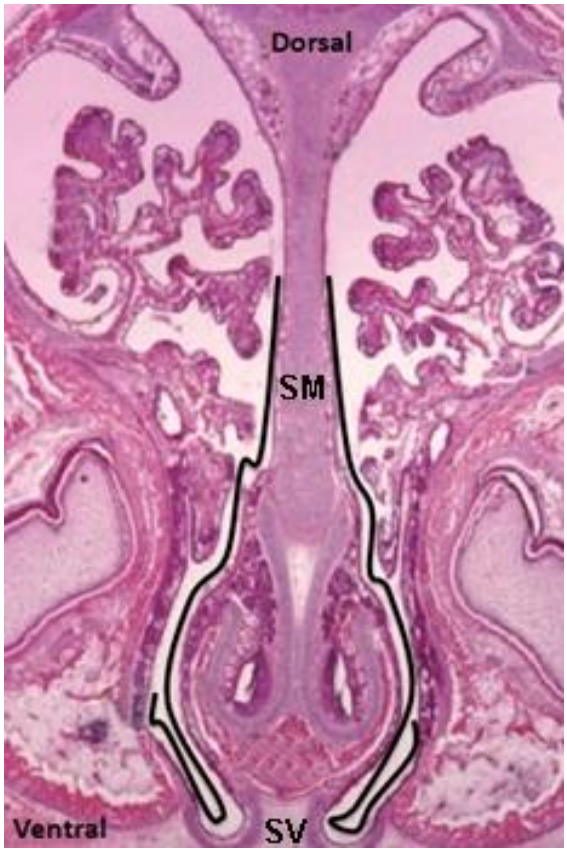
Las lesiones en el epitelio respiratorio de septo nasal fueron valoradas con objetivo de 100X y evaluadas semicuantitativamente en cuanto a severidad; para esta valoración se tuvo en cuenta la gradación propuesta por Bernet *et al.* (1999) además de la clasificación propuesta por Murillo e Iregui (1993) para lesiones del epitelio respiratorio (Tabla 2-2). Las regiones anatómicas seleccionadas en los septos fueron aquellas en las que se ubica el epitelio respiratorio (subrayado de Figura 2-1) (Wexler *et al.,* 2006).

Tabla 2-2: Gradación de severidad de lesiones en H&E

Cambios Histopatológicos	**Parámetros de severidad**			
	Ausente -	Leve +	Moderado ++	Severo +++
Células descamadas (CD)	Arquitectura del epitelio respiratorio normal	Menos de 5 células en una o varias áreas del epitelio	5-10 células en una o varias áreas del epitelio	En más de 10 células en una o varias áreas del epitelio
Presencia de vacuolas citoplasmáticas (VC)				
Muerte celular (MC)				
Perdida de cilias (PC)		En un área menor al 10% del tejido	En un área entre el 10%-70% del tejido	En un área mayor al 60%
Actividad de células caliciformes (ACC)		Menos de 5 células de 10 epiteliales eran caliciformes en una o varias áreas del epitelio	5-8 células de 10 epiteliales eran caliciformes en una o varias áreas del epitelio	8-10 células de 10 epiteliales eran caliciformes en una o varias áreas del epitelio

Adaptado de Bernet *et al*. (1999), Murillo & Iregui (1993)

Figura 2-1. Regiones anatómicas para la evaluación cualitativa y semicuantitativa de las lesiones en el explante



Línea continua (epitelio respiratorio), SM (septum medio), SV (septum ventral).

Para la lesión actividad de células caliciformes se tuvo en cuenta además, el tamaño del citoplasma, altura de la célula dentro del epitelio, aglomeración y liberación del material citoplasmático.

2.2.9 Análisis de Imágenes de marcación de LPS con lectinohistoquímica y de *Pasteurella multocida* con inmunoperoxidasa indirecta

Para la estimación de la cantidad de LPS presente en el citoplasma y superficie apical de células caliciformes (CC) y de *P. multocida* adherida al borde ciliado de epitelio respiratorio, se utilizó el programa ImageJ versión 1.41 con licencia GPL (*General Public License)* disponible para todos los sistemas o plataformas y ampliamente utilizado en el análisis de imágenes biomédicas (Abromoff et al., 2004).

Brevemente el procedimiento fue:

- Obtención de fotografías de los tejidos a través de cámara digital (figura 2-2a).

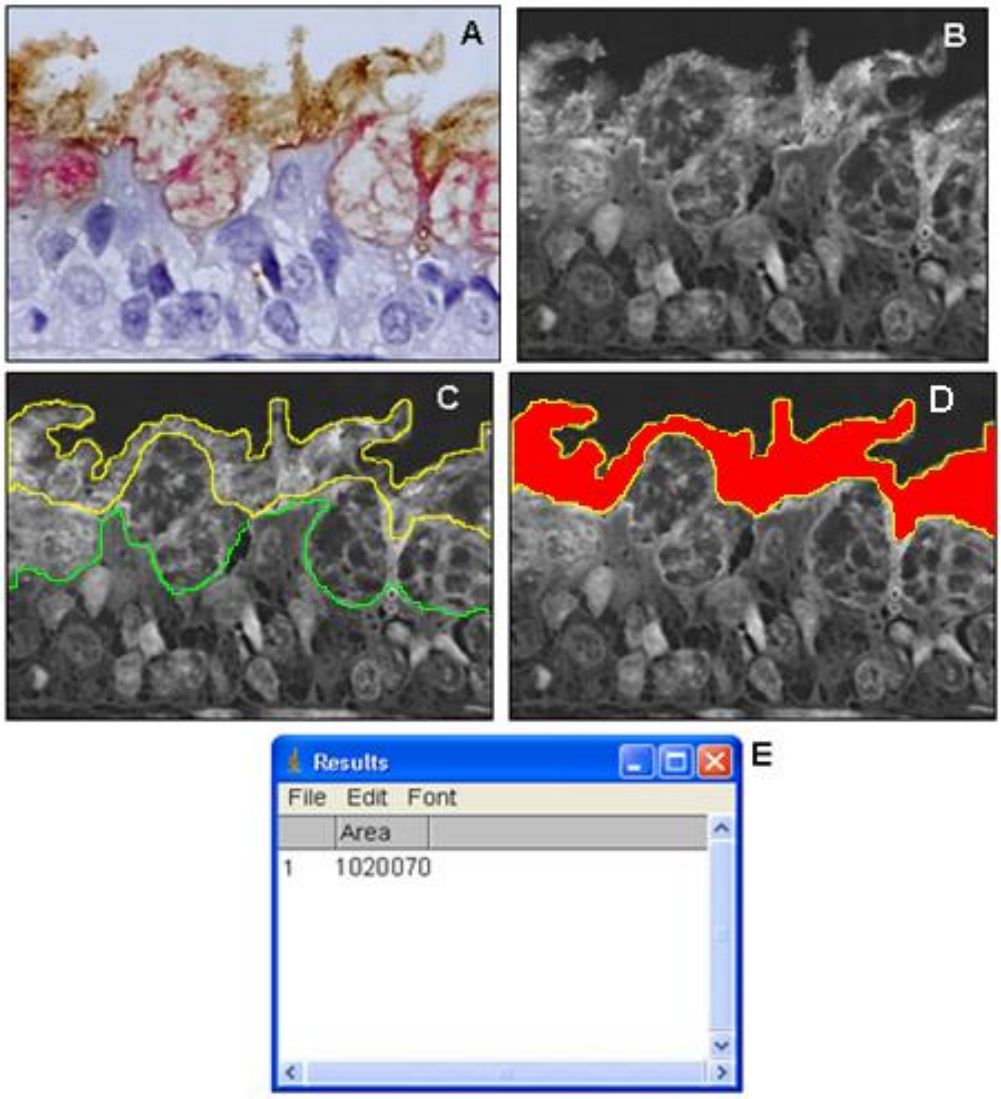
Mediante el programa ImageJ 1.41. El procedimiento que se realizó fue:

- Conversión de las fotografías a imágenes de 8 bits (Image > Type> 8 bit) (figura 2-2b).

- Conversión de las imágenes de 8 bit a imágenes binarias (Image > Adjust > Thershold) (figura 2-2c).

- Análisis y estimación de la cantidad de LPS y de bacterias presentes en las imágenes binarias en unidad de pixeles (Image>Analize>measure) (figura 2-2d).

Figura 2-2: Análisis de imágenes en el programa ImageJ 1.41.



A. Fotografía digital de septo nasal expuestos a LPS de *P. multocida* y 30 minutos después *P. multocida,* coloración marrón (*P. multocida)*, coloración rojiza (LPS de *P. multocida).* B. Imagen de 8 bits de la figura A. C. Imagen binaria y áreas de pixeles a estimar de la figura A. D. El Área roja corresponde a la coloración marrón de la figura A. E. Cantidad de pixeles presentes en el área roja de la figura D correspondientes al número de pixeles presentes en la coloración marrón de la figura A.

2.2.10 Análisis estadístico: estimación de la cantidad de LPS en el citoplasma y superficie apical de células caliciformes y de bacterias adheridas al epitelio respiratorio

Los resultados fueron analizados mediante el modelo estadístico completamente al azar con un total de 5 tratamientos (Tabla 2-3). Donde, Yijk = Media poblacional + *efecto de los tratamientos* + error experimental.

Para demostrar los supuestos del modelo se utilizaron las pruebas de Shapiro Wilk para normalidad de los errores (González, 2006) y la de Levene para homogeneidad de varianzas, para determinar si hubo o no diferencias entre los tratamientos se llevó a cabo un análisis de varianza (ANAVA) con intervalo de confianza del 95% y la prueba de comparación múltiple de Tukey para identificar qué tratamientos se comportaron de manera diferente (Martínez y Martínez, 1997).

Las hipótesis a probar con el ANAVA para la cantidad estimada de LPS de *P.* multocida presente en el citoplasmas y superficie apical de CC y para la cantidad estimada de bacterias adheridas al borde ciliado del epitelio respiratorio, corresponden a:

Hipótesis nula (Ho): no hay diferencias estadísticamente significativas en la cantidad estimada de LPS de *P. multocida* presente en el citoplasma y superficie apical de células caliciformes del epitelio respiratorio ni en el número estimado de bacterias adheridas al borde ciliado entre los 5 tratamientos. Ho: $\mu 1 = \mu 2 = \mu 3 = \mu 4 = \mu 5$

Hipótesis alterna (Ha): por lo menos uno de los tratamientos se comporta de manera diferente en cuanto en la cantidad estimada de LPS de *P. multocida* presente en el citoplasma y superficie apical de células caliciformes del epitelio respiratorio. Ha: $\mu j \neq \mu ji$

Tabla 2-3: Tratamientos a comparar

Tratamiento	Variables
Control Negativo	Cantidad estimada de LPS presente en citoplasma y superficie apical de la CC y cantidad estimada de bacterias adheridas al borde ciliado.
P. multocida	
LPS y *P. multocida* simultáneamente	
LPS + 30 min después *P. multocida*	
P. multocida + 30 min después LPS.	

2.3 Resultados

2.3.1 Secuenciación de la bacteria

Según los resultados obtenidos por las herramientas de clasificación taxonómica SeqMatch de la RDP, Compare BlastN de GreenGenes y por el alineamiento básico local del NCBI, la cepa de *P. multocida* utilizada en este estudio comparte porcentajes de identidad superiores al 96% con el género-especie *Pasteurella multocida subespecie multocida* (Tabla 2-4).

Tabla 2-4. Porcentaje de identidad de *P. multocida* utilizada en este trabajo

Base de datos	% de identidad	Género – especie
Ribosomal Database Project	96	*Pasteurella multocida subespecie multocida*
GreenGenes	98.94	
NCBI	98	

Para ubicar la secuencia consenso dentro de un género-especie específico, se efectuó un árbol de distancias en ClustalX entre las secuencias tipo de la RDP y la secuencia consenso de la *P. multocida* de esta investigación, con lo que se pudo inferir que según las distribución de los nodos, la secuencia 16S de *P. multocida* de este trabajo conserva alta identidad y distribución similar dentro de género - especie *Pasteurella multocida subespecie multocida,* la secuencia consenso 16S de la *P. multocida* empleada demostró una identidad del 99%. El árbol de distribución de distancias entre las secuencias tipo del RDP elaborados en ClustalX 2.0.10 y visualizado en la interfaz gráfica MEGA 4.0, así como la secuencia consenso entre los oligos 27-F y 1942-R para la bacteria *P. multocida* de este trabajo se encuentra en el anexo E.1 y E.2 respectivamente.

2.3.2 Extracción, purificación, cuantificación y actividad biológica del LPS de *P. multocida*

Se obtuvo una concentración final de 2683.29 µg/ml de LPS de *P. multocida.* No se encontró contaminación bacteriana alguna durante los 6 días de la prueba de esterilidad del LPS (Anexo F). En cuanto a la actividad biológica del LPS uno de los ratones del grupo inoculado con esta molécula murió a las 4 h post inoculación, mostro erizamiento y dificultad respiratoria, por lo que se decide sacrificar a los 4 animales restantes del mismo grupo y a los 5 del grupo control (sin LPS) antes de cumplir las 8 h reportadas en el protocolo de Esquinas (2007). En la necropsia se encontró edema y petequias en parénquima pulmonar. En histopatología se demostró severo edema alveolar generalizado, moderada infiltración de PMN en septos alveolares y migración de éstos a la luz alveolar, en hígado se encontró congestión e infiltración de PMN. Por inmunohistoquímica con el uso de anticuerpos contra LPS de *P. multocida*, se obtuvo una fuerte marcación en citoplasma de macrófagos alveolares en pulmón y citoplasma de células de kupffer en el hígado.

2.3.3 Exposición simultánea y secuencial al LPS de *P. multocida* y a *P. multocida* en explantes de fosa nasal de conejo (H&E)

Los septos nasales del grupo control incubados únicamente con medio de cultivo (MEM) no presentaron cambios o lesiones en el epitelio respiratorio (Figura 2-1a).

En los septos nasales expuestos únicamente a la bacteria se encontró moderada descamación celular, moderada actividad de células caliciformes (CC) , consistente en este caso aumento en el volumen de su citoplasma, la mayoría de las CC mostraban este cambio, leve pérdida de cilias, leve presencia de vacuolas intracitoplasmáticas y muerte de células ciliadas (Figura 2-1b).

En el epitelio respiratorio de dos de los tratamientos: exposición con LPS de *P. multocida* y *P. multocida* simultáneamente y exposición con LPS de *P. multocida* y 30

minutos después *P. multocida* las lesiones fueron más severas y consistieron en descamación celular y presencia de detritos en la luz septal, aumentada actividad de células caliciformes representada por aumento en el volumen de su citoplasma en algunas CC y otras expulsando el producto de su secreción, moderada pérdida de cilias, vacuolización del citoplasma y muerte de células ciliadas (Figuras. 2-1c, 2-1d).

Por otro lado, las lesiones en los septos nasales expuestos a *P. multocida* y 30 minutos después a la exposición con LPS tuvieron un grado moderado para descamación celular de células epiteliales, actividad de células caliciformes, pérdida de cilias, vacuolas intracitoplasmáticas y muerte de células ciliadas (Figura 2-1e).

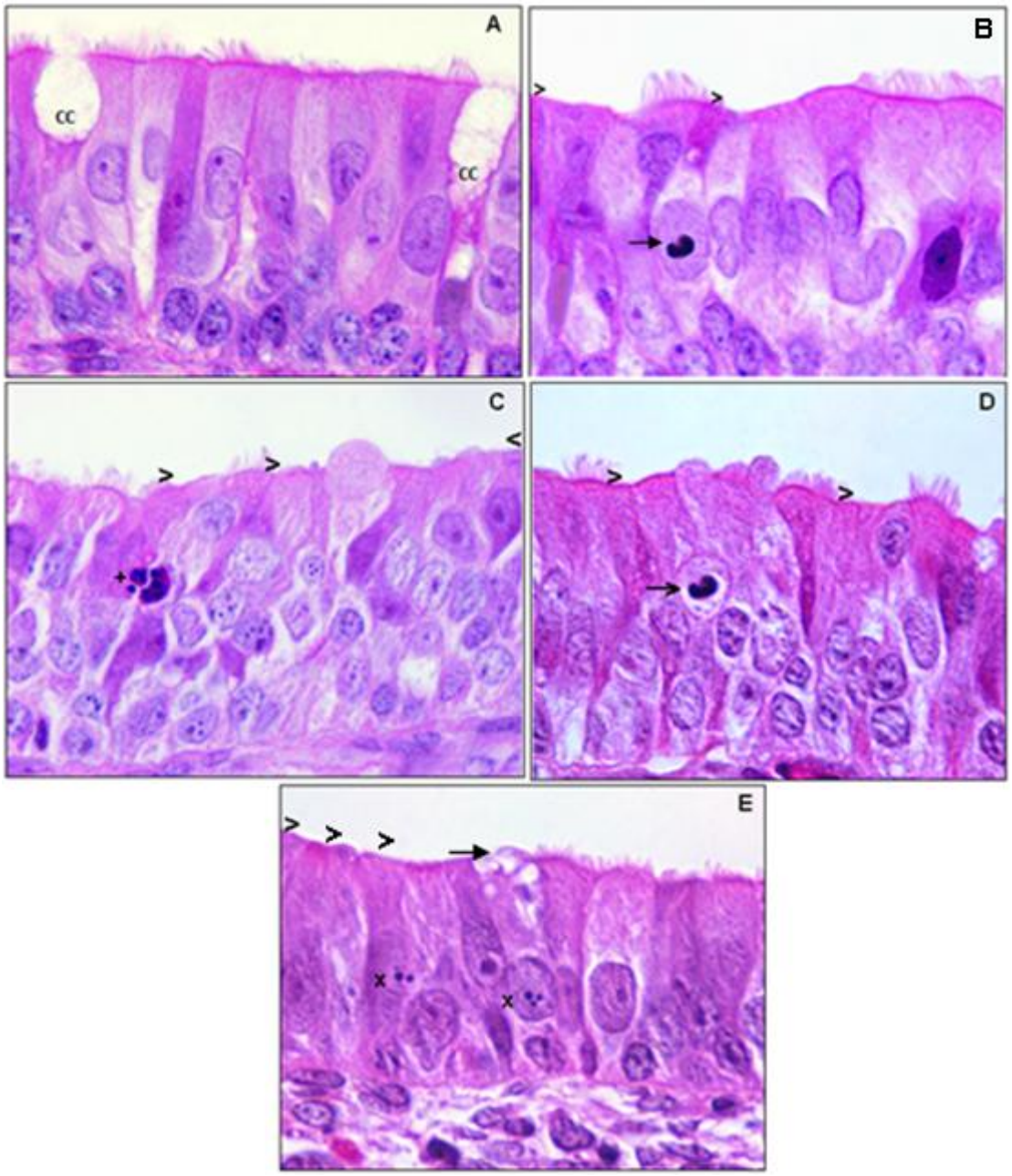
Un resumen de los grados de las lesiones evaluados por la técnica de H&E se muestra en la tabla 2-5, el registro fotográfico de las mismas en las figura 2-3 y 2-4.

Tabla 2-5: Grados las lesiones para cada uno de los tratamientos (H&E)

Tratamiento	CD	AC	PC	VC	MC
Control negativo	-	-	-	-	-
Exposición a *P. multocida*	++	++	+	+	+
Exposición simultánea a LPS de *P. multocida* y a *P. multocida*	+++	+++	++	++	++
Exposición a LPS de *P. multocida* y 30 minutos después a *P. multocida*	+++	+++	++	++	++
Exposición a *P. multocida* y 30 minutos después a LPS de *P. multocida*	++	++	++	++	++

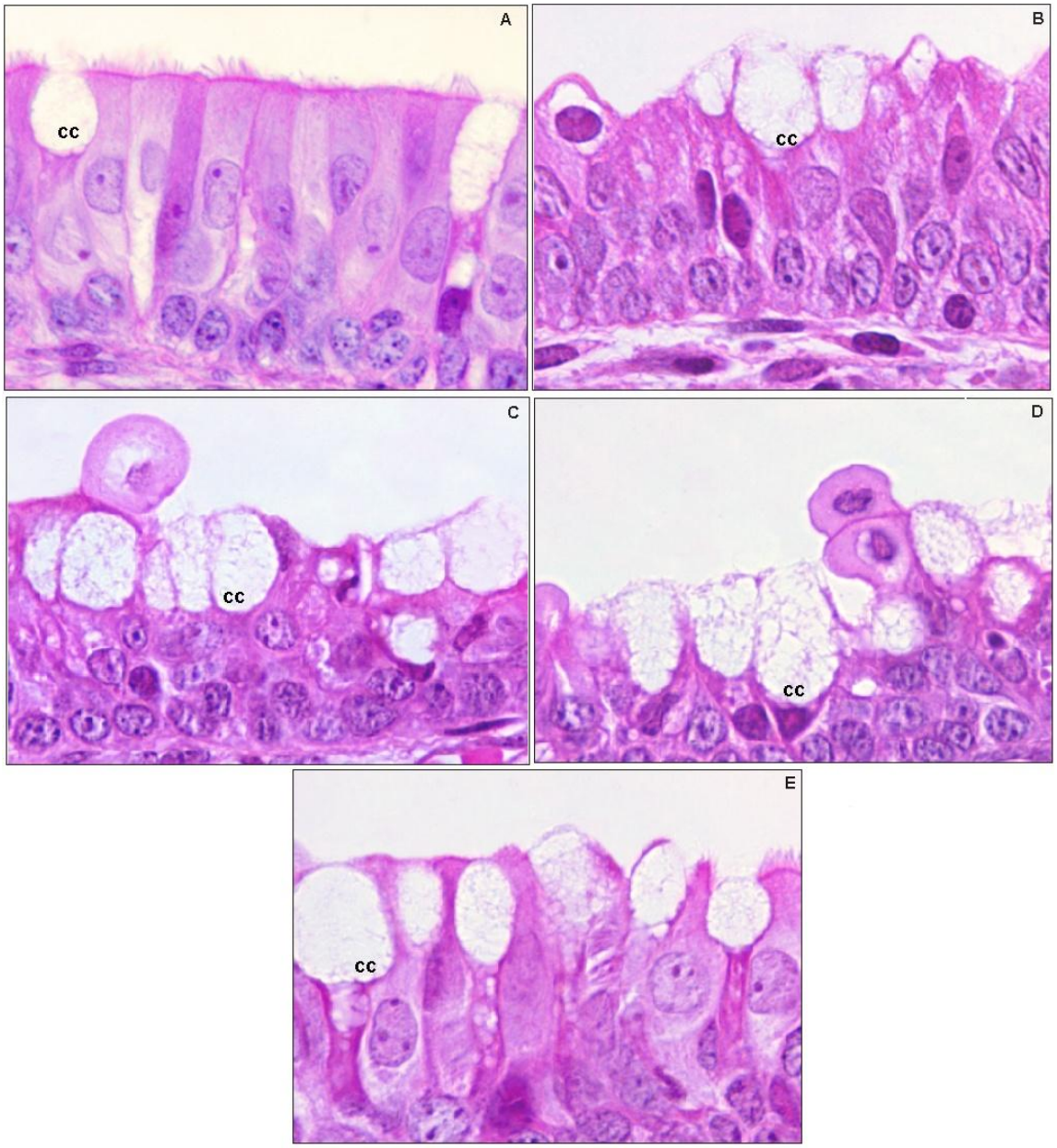
CD: células descamadas, AC: Actividad de células caliciformes, PC: pérdida de cilias, VC: presencia de vacuolas citoplasmáticas y MC: muerte celular.

Figura 2-3. Epitelio respiratorio de septo nasal expuesto simultánea y secuencialmente al LPS de *P. multocida* y a *P. multocida.*



A. Control negativo. B. Septo nasal expuesto con *P. multocida:* pérdida de cilias (cabeza de flecha), picnosis nuclear (flecha). C. Septo nasal expuesto con LPS de *P. multocida* y *P. multocida* simultáneamente: pérdida de cilias (cabeza de flecha) muerte celular (cruz). D. Septo nasal expuesto con LPS de *P. multocida* y 30 minutos después *P. multocida:* picnosis nuclear (flecha), pérdida de cilias (cabeza de flecha). E. Septo nasal expuesto con *P. multocida* y 30 minutos después LPS de *P. multocida:* pérdida de cilias (cabeza de flecha), Condensación de la cromatina (x) y vacuolización apical del citoplasma de una de estas células (flecha). H&E. 100X.

Figura 2-4. Actividad de células caliciformes para los cinco tratamientos.



A. Control negativo, máximo (aprox.) por cada 10 células ciliadas; el citoplasma de las CC no sobrepasa en altura la de los otros tipos celulares. B. Septo nasal expuesto con *P. multocida* aumento considerable de la proporción de CC respecto a otros tipos celulares, el citoplasma de las primeras comprime el de las ultimas principalmente hacia los lados. C. Septo nasal expuesto con LPS de *P. multocida* y *P. multocida* simultáneamente y D. Septo nasal expuesto con LPS de *P. multocida* y 30 minutos después *P. multocida,* la proporción de CC frente a los otros tipos celulares aumenta significativamente, en algunos casos el área del epitelio cubierta por las CC supera ampliamente a la cubierta por los otros tipos celulares; también los citoplasmas de las CC sobrepasan en altura al de las demás. E. Septo nasal expuesto con *P. multocida* y 30 minutos después LPS de *P. multocida,* apariencia similar a D; células caliciformes (CC). H&E. 100X

2.3.4. Estimación de la cantidad de LPS de *P. multocida* contenido en el citoplasma y superficie apical de células caliciformes y *P. multocida* adheridas al epitelio respiratorio (LH-IPI)

Los resultados de la cantidad estimada de LPS de *P. multocida* en el citoplasma y borde apical de las CC y de bacterias adheridas al borde ciliado del epitelio respiratorio se encuentran en la tabla 2-6, el resultado corresponde al promedio de la cantidad de pixeles de 7 repeticiones para cada uno de los tratamientos, procesado por el programa computacional ImageJ 1.41, en el que la información colorimétrica es transformada en información numérica bajo el modelo de color RGB (Red – Green – Blue). El valor de pixeles para cada repetición en cada tratamiento se muestra en el anexo G.

Con base en el análisis anterior, la intensidad y cantidad de la coloración tanto para el LPS como para *P. multocida* fue mayor en el tratamiento que incluía LPS de *P. multocida* y *P. multocida* aplicados simultáneamente, seguido de los retos LPS de *P. multocida* y 30 minutos después *P. multocida, P. multocida* y 30 minutos después su LPS, y finalmente el reto que incluía únicamente a *P. multocida.*

La marcación para *P. multocida* tuvo un color marrón y apariencia granular, mientras que la marcación para el LPS de *P. multocida* fue de color rojizo y apariencia difusa (Figura 2-5). La marcación positiva en los 4 tratamientos con *P. multocida* sola o LPS de *P. multocida* y la bacteria conjuntamente demostró las siguientes características: en el caso de los tejidos expuesto únicamente al microorganismo la coloración marrón se vio principalmente sobre el borde ciliado de las células correspondientes y libre en la luz del tejido; no obstante, también se encontró la coloración rojiza propia del LPS del contenido de las CC y la coloración marrón propia de *P. multocida* también se demostró en relación con la coloración rojiza del LPS (Fig. 2.5 C –cruz).

En los tres experimentos restantes del LPS con *Pasteurella multocida*, las anteriores características del experimento solo con *P. multocida*, fueron similares pero de mayor intensidad (Figs. 2.5 D-F).

No se encontró marcación positiva alguna para ninguno de los dos antígenos en cuestión LPS de *P. multocida* o *P. multocida* en ninguno de los cortes del grupo control negativo, esto es, no expuestos.

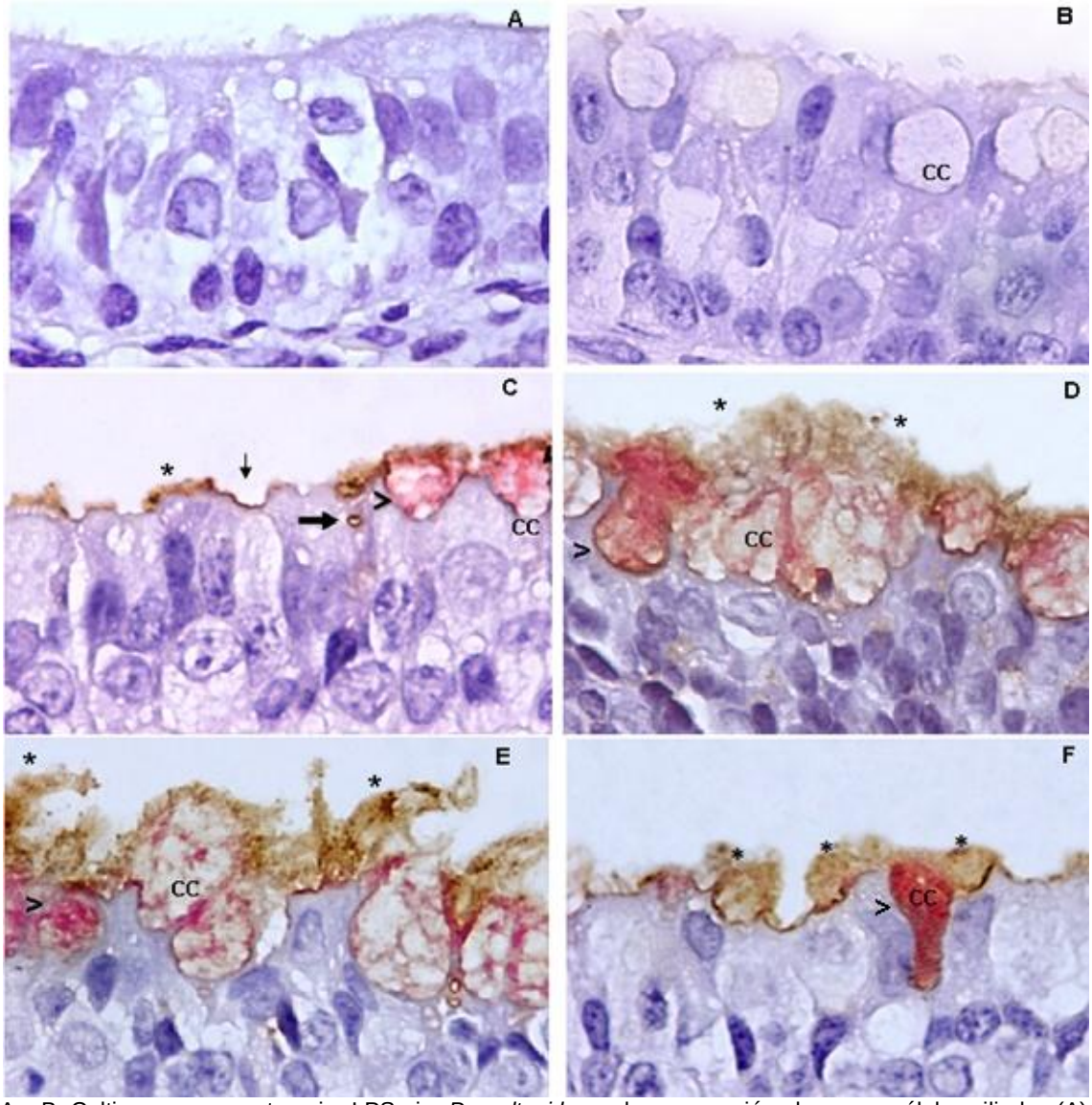
La comparación fotográfica de las marcaciones por tratamientos se muestra en la figura 2-5.

Tabla 2-6. Promedio de la cantidad estimada de LPS en el contenido y superficie apical de las CC y de la cantidad de bacterias adheridas al borde ciliado del epitelio respiratorio*

Tratamiento	Cantidad estimada de Bacterias (pixeles)	Cantidad estimada de LPS (pixeles)
Control Negativo	0	0
P. multocida	59.897.6	1.247
LPS y *P. multocida* simultáneamente	1.024.041.1	2.080.027
LPS y 30 minutos después *P. multocida*	1.020.481.7	2.079.876
P. multocida y 30 minutos después LPS.	634.092.6	31.586

* Promedio de 7 repeticiones por cada experimento

Figura 2-5. Exposición simultánea y secuencial al LPS de *P. multocida* y a *P. multocida* en explantes de septo nasal lectinohistoquímica (LH) e inmunoperoxidasa (IPI)



A y B. Cultivos no expuestos ni a LPS ni a *P. multocida,* no hay marcación alguna en células ciliadas (A) ni en CC (B). C. Exposición solo con *P. multocida**, LPS en el citoplasma de CC (cabeza de flecha), se aprecia leve marcación para LPS en el borde apical de aparentes células ciliadas que han perdido sus cilias (flecha), nótese aparente marcación intracitoplasmáticas marrón dentro de posible célula ciliada (flecha gruesa), CC. D. exposición con LPS de *P. multocida* y *P. multocida* simultáneamente, aunque la mayor marcación para el LPS se encuentra en todo el contenido citoplasmático de las CC, parte de la misma parece mezclarse con la coloración para la bacteria; varias CC se encuentran en proceso de liberación de su contenido y con éste el LPS. E. Exposición con LPS de *P. multocida* y 30 min después *P. multocida,* apariencia y signos similar a D. F. Exposición con *P. multocida* y 30 min después LPS de *P. multocida.* Células caliciformes: CC; marcación positiva a *P. multocida:* *– coloración marrón; marcación positiva a LPS de *P. multocida* (cabeza de flecha – coloración rojiza). H&E. 100X.

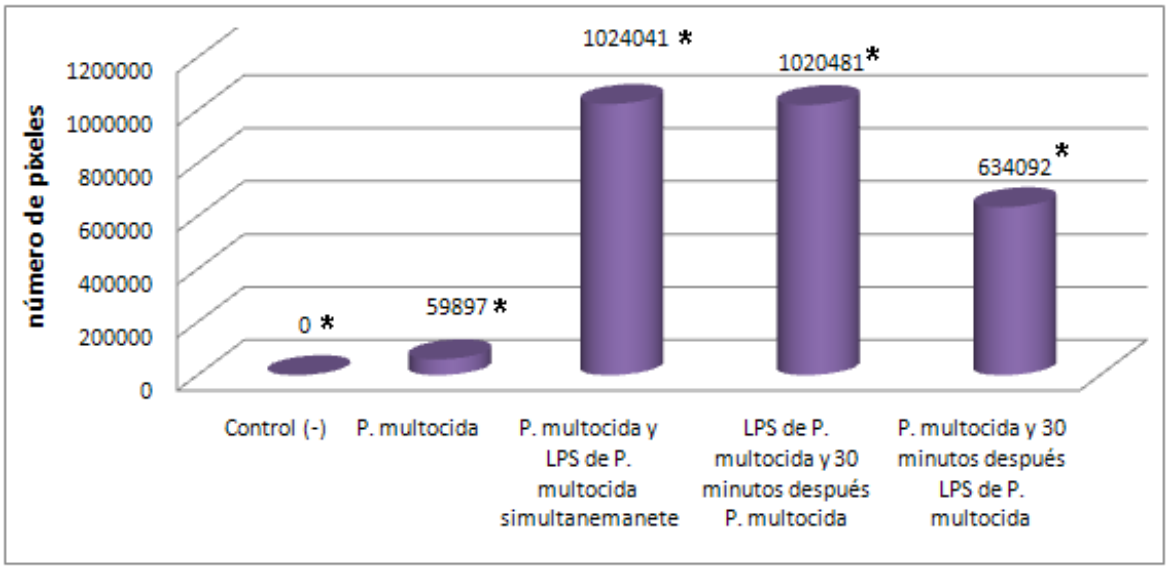
2.3.5 Resultados estadísticos

Se garantizó la homogeneidad del material experimental con las características de los animales utilizados (fetos de 26 días de gestación provenientes de hembras de último parto procedentes de la misma explotación). Para todas las pruebas estadísticas se utilizó un intervalo de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$).

La prueba de Shapiro & Wilk arrojó un Pr<W de <0.001 para las dos variables, lo que sugiere que el error experimental no se distribuye de manera normal sin embargo es posible probar las hipótesis puesto que la prueba F es robusta a la anormalidad del error y por ende se validan los resultados y las conclusiones obtenidas a partir de ellos (Martínez y Martínez, 1997; Kutner *et al*. 2005). Se obtuvo homogeneidad de varianzas con el test de Levene para cada una de las variables con un Pr > F 0.2450 para número estimado de bacterias adheridas al borde ciliado y a células caliciformes y un Pr > F 0.1027 para cantidad estimada de LPS presente en citoplasma de células ciliadas y de células caliciformes. Para las dos variables los resultados del ANAVA señalan que por lo menos uno de los tratamientos tiene un efecto diferente en cuanto al número estimado de bacterias adheridas y cantidad estimada de LPS presente en citoplasma y superficie apical de CC ($P_R > F < 0.001$). Con la prueba de comparación múltiple de Tukey fue posible determinar que todos los tratamientos tienen un comportamiento diferente, siendo el tratamiento 3 (*P. multocida* y LPS de *P. multocida* simultáneamente) el que mayor número de bacterias adheridas al borde ciliado presentó así como mayor cantidad de LPS en citoplasma y superficie apical de células caliciformes, seguido de los tratamientos 4 (LPS de *P. multocida* y 30 minutos después *P. multocida*), 5 (*P. multocida* y 30 minutos después LPS de *P. multocida*), 2 (*P. multocida*) y el tratamiento control (Medio de cultivo) (Figura 2-6 y 2-7).

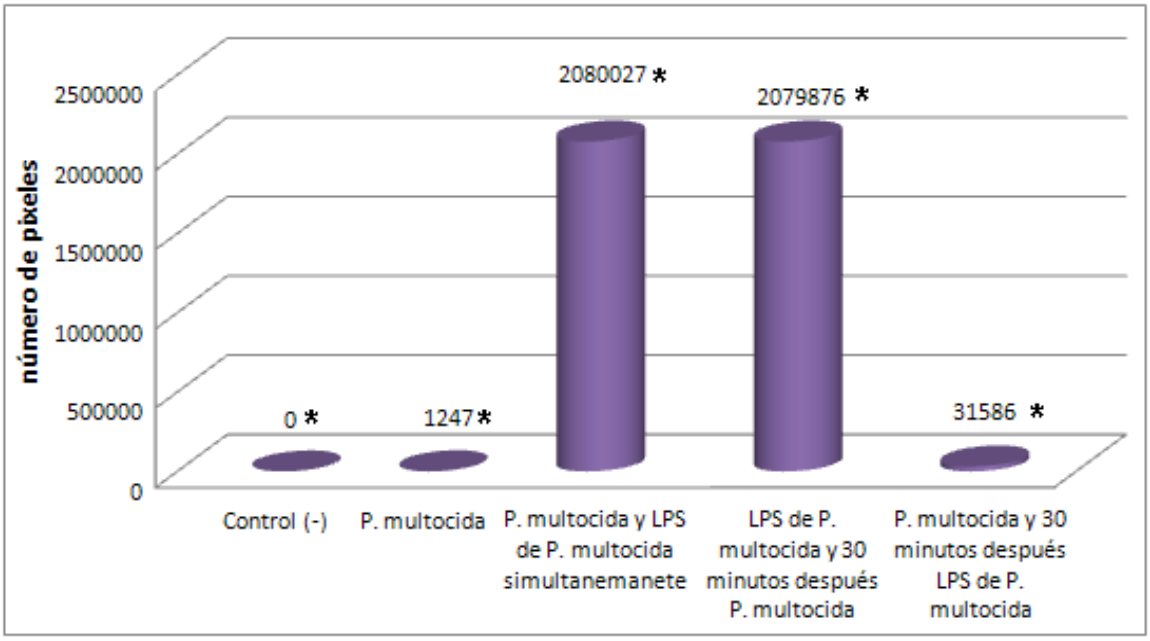
Los resultados completos de la estadística emitida por el análisis de los datos en el programa computacional SAS 9.1 se muestran en el anexo H.

Figura 2-6. Promedio de pixeles para el número estimado de bacterias adheridas al borde ciliado de células ciliadas



***** Diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos

Figura 2-7. Promedio de pixeles para la cantidad estimada de LPS de *P. multocida* presente en citoplasma y superficie apical de células caliciformes



***** Diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos

2.4 Discusión

El LPS de las bacterias G (-) es considerado uno de los principales factores de virulencia de estos microorganismos en su interacción con los hospederos (McIntire *et al.,* 1976; Takada & Kotani, 1992; Islam *et al.,* 2002; Cattherjee & Chaudnuri, 2003), un papel similar se le reconoce al LPS de *P. multocida* subespecie *multocida* serogupos A,B,D y F en las distintas especies mamíferas y aviares afectadas por ellas (Carter & Alwis, 1989; Kawamoto *et al.,* 1990; Moreno *et al.,* 2003; Jaglic *et al.,* 2004; Catry *et al.,* 2005); sin embargo, la mayor parte de los estudios dedicados a estas moléculas se han concentrado en el entendimiento de sus efectos sistémicos una vez ellas alcanzan el torrente circulatorio (Roantree, 1971; Rietschel *et al.,* 1991; Raetz & Whitceld, 2002; Brogden *et al.,* 1995; Hodgson, 2006), por el contrario, muchos menos han sido los esfuerzos aplicados a conocer el papel que juegan los LPS de sus respectivos patógenos durante las primeras fases de adhesión de éstos a las superficies epiteliales (Farley *et al.,* 1988; Williams & Fletcher, 1996; Simuni *et al.,* 2000).

El objetivo principal de este trabajo fue determinar si el LPS de *P. multocida* favorece la adhesión de la bacteria al epitelio respiratorio del septo nasal de fetos de conejo durante las primeras fases de infección. Mediante la exposición simultánea y secuencial al LPS de *P. multocida* y a la bacteria fue posible demostrar que el LPS aumenta significativamente la adhesión de *P. multocida* a las células del epitelio respiratorio del septo nasal de conejos. El LPS demostró marcada predilección por el contenido del citoplasma de las CC y la membrana apical de las células ciliadas. La bacteria por si sola se adhirió a la membrana apical de las células ciliadas. Cuando el LPS se encontraba mezclado con el contenido de las CC, la bacteria también se adhirió a éstas en abundante cantidad con posible mediación del LPS (Figura 2-5). Adicional, la severidad de las lesiones sobre las células del epitelio fue mucho mayor ($P<0.001$) en los dos tratamientos en los que se expuso los cultivos de septo nasal al LPS y a la bacteria simultánea o secuencialmente, en comparación con aquellos en que se utilizó únicamente *P. multocida* o *P. multocida* y posteriormente su LPS (Tabla 2-6).

Esquinas (2007) demostró marcación positiva al LPS de *P. multocida* A:3 en el citoplasma de CC en el mismo modelo experimental que el empleado en este trabajo, con el uso de anticuerpos policlonales dirigidos contra la molécula a cambio de la lectina *Limulus polyphemus* (Fig. 2.5-A) implementada en esta investigación. Cabe preguntarse cómo llega el LPS al citoplasma de las CC. Una posible respuesta sería que el LPS de *P. multocida* es capaz de unirse a receptores CD14 libres en el glicocalix y moco del epitelio respiratorio e ingresar al citoplasma de ésta células por activación del complejo TLR4/MD2, similar a lo que ocurre con *Salmonella spp.* (Huber *et al.,* 2006; Lu *et al.,* 2008), tal y como sucede con el LPS de *Salmonella spp* y *E. coli* en epitelio intestinal (Hubert *et al.,* 2004). Otra posible ruta de ingreso del LPS al citoplasma de las CC sería por afinidad a porciones azucaradas de las mucoproteinas contendidas en el citoplasma de éstas células, Mahdavi *et al.* (2003) reportaron que el antígeno O de *H. pylori* utiliza la MUC5AC presente en el citoplasma de CC del estomago para infectar la mucosa gástrica de humanos. Para el caso de *P. multocida* también se planteo la posibilidad de que ella utilizaría algún sustrato presente en las glicoproteínas producidas por las células CC como sitio primario de unión para iniciar el proceso de adherencia (Esquinas, 2007); se debe tener en cuenta, no obstante, que el LPS de *P. multocida* A:3 carece de antígeno O; con todo, las heptosas del núcleo del LOS de *P. multocida* podrían interactuar con la MUC5AC presente en el epitelio respiratorio y permitir el establecimiento de la infección.

Un hallazgo inesperado en esta investigación fue que en los explantes retados únicamente con *P. multocida* se encontró (aunque en menor cantidad que en los experimentos en que se empleo la molécula pura) marcación positiva al LPS de la bacteria en el citoplasma de CC (Figura 2-5 y Tabla 2-6); lo anterior probablemente se deba a dos sucesos que ocurren en diferentes momentos durante el desarrollo del experimento, el primero de ellos sería que las bacterias durante la incubación con el medio de cultivo se replican y liberan de su membrana externa el LPS; el segundo sería que tras agotarse los nutrientes del medio las bacterias comienzan a morir y producto de la lisis bacteriana, sucede la liberación del LPS (Linsayd *et al.,* 1973; Devoe & Gilschrist, 1973; Wesphal *et al.,* 1978; Rietschel & Brade, 1992). Que posteriormente es detectado al realizar las coloraciones diferenciales durante la técnica de doble marcación enzimática.

La estimación de la cantidad de LPS de *P. multocida* y de *P. multocida* adheridos al epitelio respiratorio de fosa nasal de conejo se llevó a cabo a través del programa imágenes ImageJ 1.41 desarrollado por el National Institutes of Health para el conteo de células y productos celulares por coloraciones diferenciales y utilizado en análisis de imágenes biomédicas para la estimación de LPS, bacterias, células del epitelio respiratorio y células caliciformes, éstas últimas principalmente en órganos como yeyuno e íleon (Rasban, 1997-2004; Forder *et al.,* 2007; Yuan *et al.,* 2009).

El LPS es una molécula glicolípidica anclada a la membrana externa de las bacterias G -, puede llegar a medir 37 nm de largo y 3,5 de nm de ancho (Strauss *et al.,* 2009) y es considerado el antígeno de superficie más importante de estos patógenos (Whitfield, 2002). Se estima que una bacteria G - posee unas 3.5 x 10^6 moléculas de LPS que ocupan un área de 4.9 μm^2, si la superficie aproximada de uno de esto microorganismos oscila entre 6 a 9 μm^2 el LPS cubriría las tres cuartas partes de su superficie, lo que lo constituye en el mayor componente de la membrana externa en estos microorganismos (Mayeux, 1997; Raetz & Whitfield, 2002).

Para *P. multocida* se han descrito algunas estructuras utilizadas para su adhesión a superficies epiteliales tales como la fimbria o pili (Doughty *et al.,* 2000) sin embargo, la gran extensión de área cubierta por el LPS sobre la bacteria harían de esta molécula un dispositivo ideal para la adherencia a las superficies apicales de las células epiteliales de sus hospederos ricas a su vez en moléculas como CHOs y glicoproteínas que pudieran ser compatibles física y químicamente con las porciones azucaradas del LPS; no obstante, los trabajos sobre el papel adherente del LPS a los epitelios han sido escasos (Camprubi *et al.,* 1993; Fletcher *et al.,* 1993; Gupta *et al.,* 1994; Pier *et al.,* 1996; Tang *et al.,* 1996); solo recientemente comienzan a aparecer estudios que abordan esta hipótesis de una forma más detallada (Bravo *et al.,* 2011; Chang *et al.,* 2011).

El primero en proponer una función adhesiva del LPS fue Maroudas (1973) quien tras culminar su trabajo en los requisitos químicos y mecánicos para la adhesión de fibroblastos en superficies sólidas hidrofílicas e hidrofóbicas, sugirió que el LPS podría tener un papel importante durante la adhesión de bacterias G - a las superficies epiteliales teniendo en cuenta que es la molécula de superficie más extensa de estos microorganismos, luego llegarían las primeras confirmaciones a esta hipótesis en bacterias de plantas, particularmente en *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium japonicum*, en las que al hidrolizar sus LPS se disminuía la adhesión de las bacterias a cultivos celulares de tabaco, zanahoria y raíces de legumbres, respectivamente (Wolpert & Albersheim, 1976, Matthysee *et al.,* 1978) .

En células de mamíferos Izhar *et al.* (1982) realizarían el primer trabajo de adhesión concluyendo que al mezclar al LPS de *Shigella flexneri* tres veces con hexano (un hidrocarburo utilizado para la extracción de ácidos grasos durante la obtención y purificación del LPS) se perdía el lípido A y los carbohidratos del núcleo del LPS de la bacteria, con lo que se disminuía la adhesión del microorganismo a células del colón de cobayos en un 50%. De allí en adelante surgieron una serie de investigaciones en patógenos como *Actinobacillus pleuropneumoniae Aeromonas sobria, Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae, Pseudomona aeruginosa, Salmonella typhi* y *Serratia marcescen,* con el propósito de determinar si la molécula intervenía en el proceso de adhesión de las bacterias.

Entre las estrategias utilizadas para demostrar el papel adherente del LPS, los autores diseñaron ensayos de inhibición de la adhesión con el uso anticuerpos monoclonales dirigidos bien fuera contra el antígeno O, contra el núcleo o contra la molécula completa de LPS o de LOS en distintos epitelios (McSweegan & Walker, 1986; Mroczenski-Wildey *et al.,* 1989; Bélanger *et al.,* 1990; Fletcher *et al.,* 1993; Paradis *et al.,* 1994; Franckie & Chang, 1994; Valkonen *et al.,* 1994; Palomar *et al.,* 1995; Tang *et al.,* 1996); los mismos investigadores concluyeron que al exponer a cada una de las anteriores bacterias con tales anticuerpos una menor cantidad de microorganismos se adherían a la superficie apical de los epitelios utilizados experimentalmente.

En *A. pleuropneumoniae,* la región del LPS que permite la adhesión al epitelio respiratorio de los porcinos es el núcleo de la molécula, estudios de inmunomicroscopía y citometría de flujo revelaron que el LPS semirugoso de los serotipos 1, 5 y 10, sobresale de la superficie capsular de este microorganismo, de esta manera esta porción del LPS puede interactuar con moléculas presentes sobre la superficie apical de los epitelios. (Jacques *et al.,* 1988). En adición, en el caso de cepas de *A. pleuropneumoniae* en las que se mutó la galactosamina (GalNAc) terminal de la cadena O, la adhesión a cortes de pulmón no se vio afectada, pero si las mutaciones se hacían en el azúcar N-acetil-hexosamina (HexNAc) o en la misma GalNac del núcleo, la adhesión de las bacterias se inhibía hasta en un 80% (Boekema *et al.,* 2003). El LPS de *P. multocida* A:3 utilizado en esta investigación carece de antígeno O, es decir se trata de un lipoologosacárido (LOS) (Rimler, 1990); sobre esta base se podría hipotetizar que los azucares del núcleo del LOS de *P. multocida* serotipo A:3, al igual que el de *A. pleuropneumoniae* serotipos 1, 5, y 10, emergerían por encima de la superficie de la membrana externa de la bacteria, en una posición favorable para formar interacciones con algunos componentes como glicoproteínas o CHOs de la membrana apical del epitelio respiratorio.

La utilización del LPS por parte de *P. multocida* serotipo A, sin embargo, tendría un inconveniente, *P. multocida* posee una gruesa capsula rica en ácido hialurónico y en el polisacárido (1.4)-β-D-xylan que se localizan por encima de su LOS y por tanto recubren la bacteria (Rosener *et al.,* 1992; Pandit & Smith, 1993); se debe señalar, no obstante, que varios autores han demostrado que durante el proceso de adhesión *P. multocida* pierde dicha capsula (Jaques *et al.,* 1993; Jacques *et al.* 1994; Boyce *et la.,* 2000), dejando al LPS como la principal cubierta del microorganismo, lo que haría aun más plausible y relevante el papel adherente del LPS.

En *H. pylori* el sacárido L-glycero-D-manno-heptosa (L,D-Hep) ubicado en la porción interna del núcleo del LPS es la región responsable de la adhesión de este patógeno a células epiteliales gástricas de humano y a la línea celular human gastric adenocarcinoma epithelial cell line (AGS) (Chang, 2011).

Valkonen *et al.* (1994) estudiaron las interacciones del LPS de *H. pylori* con las proteínas de membrana basal de epitelio gástrico y reportaron que la L,D-Hep del núcleo del LPS es capaz de unirse a la laminina, glicoproteína presente en la membrana basal de los epitelios, los autores plantearon la posibilidad de que la unión de esta bacteria a la mucosa gástrica ocurriría por enlaces entre la L,D-Hep y la laminina; quedaría por explicar, no obstante, cómo se adhiere este patógeno a la superficie apical del epitelio gástrico. Por otra parte, mutaciones en el gen HP0859 (*rfaD)* uno de los cuatro genes contiguos (HP0857- HP0860) encargados de codificar para la biosíntesis de la L,D-Hep en *H. pylori* disminuyen la cantidad de bacterias adheridas a las células AGS en comparación con la cepa salvaje de la bacteria (Raetz & Whifield, 2002; Valkonen *et al.,* 1994; Chang, 2011).

Cuatro L,D-Hep (Figura 1-3) hacen parte del núcleo del LPS de la *P. multocida* A:3 utilizada en esta investigación (Michael *et al.,* 2005), lo que nos permitiría proponer que *P. multocida* utilizaría este sacárido para facilitar la adhesión de la bacteria a la membrana apical de células del epitelio respiratorio y al contenido del citoplasma de CC del septo nasal de conejos de manera similar a lo que sucede con *H. pylori*.

Sobre la superficie apical del epitelio respiratorio se encuentra una capa rica en glicosaminoglicanos y CHOs con un grosor de 463 nm conocida como glicocalix (Kovbasnjuk & Spring, 2000), está capa está constituida por los glicosaminoglicanos heparan sulfato, condroitin sulfato y ácido hialurónico, y por los carbohidratos N-acetil-D-galactosamina (GalNaC), N-acetil-D-glucosa, fucosa, D- glucosa, arabinosa, D-galactosa, xilosa y manosa (Gibson *et al.,* 1994; Pruimboom *et al.,* 1996; Perfumo *et al.,* 1998; Gao *et al.,* 2010). Sobre ésta capa se encuentra una adicional de moco que proviene de las CC constituida principalmente por glicoproteínas tipo mucina (MUC5AC y la MUC5B) electrolitos, enzimas y agua (Takeyama *et al.,* 2001). Esta capa tiene un grosos entre 5.000 – 10.000 nm (Pappenheimer, 2001).

La sobreproducción de mucoproteinas y el aumento del grosor de la capa de glicocalix son una característica común de infecciones de vías aéreas (Li *et al.,* 1997; Smirnova *et al.,* 2000; Smirnova *et al.,* 2001). A pesar del aparente papel protector de ambas estructuras, ellas pueden ser utilizadas como sitios de unión para el establecimiento de infecciones bacterianas, así por ejemplo, la L,D-Hep del núcleo del *H. pylori* es capaz de unirse a la MUC5AC de la mucosa gástrica en humanos (Mahdavi *et al.,* 2003)*;* en algunos patógenos de vías respiratorias como *Bordetalla pertussis, Pseudomona cepia* y *P. aeruginosa*, la GalNAc del glicocalix sería la encargada de unirse con la L,D-Hep del núcleo del LOS para permitir la adhesión de éstas bacterias al dicho epitelio (Brennan *et al.,* 1991). Función similar se podría sugerir para el LPS de *P. multocida* de este estudio, como se dijo, en el núcleo del LPS de esta bacteria se encuentran cuatro L,D-Hep que pueden unirse a la GalNAc de la superficie epitelial de los explantes; recientemente Carrillo (2011) encontró cantidades apreciables de GalNac sobre las células del epitelio respiratorio de fosa nasal de conejo, por lo que es factible que la L,D-Hep del núcleo de la *P. multocida* de esta investigación establezca uniones con la GalNac del epitelio tal y como ocurre en las bacterias arriba mencionadas.

Parce claro que el LPS de algunas bacterias G (-) interviene en la adhesión de sus correspondientes patógenos a los epitelios de sus hospederos (Paradis *et al.,* 1994; Pier *et al.,* 1996; Tang *et al.,* 1996). Los mecanismos físico-químicos por los cuales sucede esta interacción así como los receptores específicos en la membrana apical de las células epiteliales para los azúcares del núcleo y de otras regiones del LPS lentamente son identificadas; algunos autores teorizan que para los patógenos cuyos LPS carecen de antígeno O, las interacciones entre estas bacterias y las superficies epiteliales de los hospederos ocurrirían gracias a que los LOS son de carácter hidrófobico y que esta característica les permitiría formar uniones hidrofóbicas con receptores glicoproteícos, proteicos y gangliosidicos de las membranas de las células, del moco o del glicocalix del hospedero (Knirel *et al.,* 1994; Zâhringer *et al.,* 1995), esta hipótesis, sin embargo, no ha sido confirmada (Thomas & Brooks, 2004).

Con las observaciones en este trabajo se podría adelantar la hipótesis de que en las infecciones por *P. multocida* sería necesario tener en cuenta en su tratamiento en las primeras fases de la infección el uso de sustancias capaces de inhibir la adhesión del LPS al epitelio respiratorio.

En conclusión, en este estudio se demostró que el LPS de *P. multocida* actúa como adhesina y facilita la adhesión de la bacteria al epitelio respiratorio de fosa nasal de conejo y con ello a un mayor número de lesiones en las células del mencionado epitelio.

3. Conclusiones y recomendaciones

3.1 Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten sugerir que el LPS de *P. multocida* actúa como adhesina y colabora en el proceso de adhesión bacteriana en células del epitelio respiratorio de fosa nasal de conejo y con ello facilita el desarrollo de lesiones más severas por parte del microorganismo en este tejido.

Bajo la circunstancia anterior sería necesario incluir dentro de los tratamientos para las enfermedades respiratorias generadas por *P. multocida* sustancias capaces de bloquear el efecto adhesivo del LPS. De esta manera se podrían impedir los procesos de adhesión, colonización y establecimiento de la infección en el epitelio respiratorio.

3.2 Recomendaciones

Con el propósito de disminuir la adhesión bacteriana y la severidad de las lesiones sobre las células del epitelio respiratorio resultaría útil realizar ensayos de adhesión que incluyan la presencia de azúcares de tal manera que éstos formen enlaces con las porciones azucaradas del LOS de *P. multocida* bien sea sobre la superficie bacteriana o una vez el microorganismo lo libere al medio. Con lo anterior se podría disminuir o bloquear la adhesión bacteriana y con ello los efectos deletéreos de la bacteria sobre la superficie celular del epitelio respiratorio.

Bibliografía

Abromoff, M.D., Magalhaes, P.D., & Ram, S.J. (2004). Image processing with Image J. *Biophotonics Inter. 11.* 36-42.

Al-Haddawi, M., Jasni, S., Samri-saad, M., Mutalib, A., Zuukifli, L., & Son, R. (2000). In vitro study of *Pasteurella multocida* adhesion to trachea, lung and aorta rabbits. *Vet J. 158.* 274-281.

Backhed, F., Normark, S., Schweda, E., Oscarson, S. & Richter-Dahlfors, A. (2003). Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes Infect*. 5: 1057-63.

Bélanger, M., Dubreuil, D., Harel, J., Girard, C., & Jacques, M. Role of lipopolysaccharides in adherence of Actinobacillus pleuropneumoniae to porcine tracheal rings. Infect Immun. 1990 Nov;58(11):3523–3530

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Diseases, *22.* 25–34.

Botero, L., & Iregui, C. (1999a). Caracterización por inmunohistoquímica de la relación de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* con el epitelio de fosas nasales y nasofaringe durante el curso de la neumonía enzoótica de los conejos. *Rev Med Vet Zoot. 46.* 3-12.

Botero. L., & Iregui. C (1999b). Caracterización de la interrelación entra la *Pasteurella multocida* y la *Bordetella bronchiseptica* con células epiteliales de la cavidad nasal y la nasofaringe durante el curso de la neumonía enzoótica de los conejos. *Rev Med Vet Zoot. 46.* 21-39.

Bouke, K.H.L., Boekemaa, Stockhofe-Zurwiedena, N., Smitha, H.E., Kampb, E.M., Puttenc, V., & Verheijdend, J. (2004). Adherence of Actinobacillus pleuropneumoniae to primary cultures of porcine lung epithelial cells. *Can J Vet Res. 68*. 33–41.

Boyce, E., & Lobner-Olesen, A. (1990). The role of dam methyltransferase in the contrl of DNA replication in *E. coli. Cell. 62.* 981-989.

Boyce, J., Lo, C., Wilkie, I., & Adler, B. (2004). Pasteurella and Mannheimia, *In* C. L. Gyles, C. O. Thoen, J. F. Prescott, & G. Songer (ed.), Pathogenesis of bacterial infections of animals. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom. 385–396.

Boyce, J.D., & Adler, B. (2000). The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B : 2). *Infect Immun. 68*. 3463–3468.

Braun, V., Hantke, K., & Köster, W. (1995). Bacterial iron transport. Mechanism, genetics and regulation. *Met. Ions Biol. Systs*. *35.* 67-145.

Bravo, D., Hoare, A., Silipo, A., Valenzuela, C., Salinas, C., Alvarez S., Molinaro, A., Valvano, M., & Contreras, I. (2011). Different sugar residues of the lipopolysaccharide outer core are required for early interactions of Salmonella enterica serovars Typhi and Typhimurium with epithelial cells. *Microbial Pathogenesis 50.* 70-80.

Brennan, M.J., Hannah, J.H., & Leininger, E. (1991). Adhesion of Bordetella pertussis to sulfatides and to the GalNAc (1-4) Gal sequence found in glycosphingolipids. *J Biol Chem*. *28.* 18827–31.

Brio, M.A., & Riera, P. (1995). Manual de bases teórico-prácticas de inmonocitoquimica. *Universidad de Oviedo*. *3.* 55-58.

Brockmeier, S., Palmer, M.V., Bolin, S.R. (2000). Effect of intranasal inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus *Bordetella bronchiseptica* or a combination of both organisms in pigs. *Am J Vet Res. 61.* 892-899.

Brogden, K.A., & Packer, R.A. (1979). Comparison of *Pasteurella multocida* serotyping systems. *Am.J.Vet.Res. 40*. 1332-1335.

Brogden, K.A., Ackermann, M.R., & Debey, B.M. (1995). Pasteurella haemolytica lipopolysaccharide-associated protein induces pulmonary in£ammation after bronchoscopic deposition in calves and sheep. Infection and Immunity. *63.* 3595- 3599.

Burril, T. J. (1883). New species of Micrococcirs (bacteria). *Am.Nat .17.* 319-320.

Camprubi, S., S. Merino, J. F. Guillot., & Tomas, J.M. (1993). The role of the O-antigen lipopolysaccharide on the colonization in vivo of the germfree chicken gut by *Klebsiella pneumonia*. *Microb. Pathog. 14.* 433-440.

Caroff, M., & Karibian, D. (2003). Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*. *338.* 2431-2447.

Carrillo, M. P. (2011). Inhibición in situ de la adhesión de *pasteurella multocida* a receptores del epitelio respiratorio de conejos por medio de lectinas. *Tesis. UNAL.* Colombia.

Carter, G.R. (1955). Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am.J.Vet.Res. 16.* 481-484.

Carter, G.R. (1967). Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica*. *Adv.Vet.Sci. 11.* 321-379.

Carter, G.R., & De Alwis, M.C.L. (1989). Haemorrhagic septicaemia. In: Adlam, C., Rutter, J.M. (Eds.). Pasteurella and Pasteurellosis. *Academic Press, London*. 131–160.

Caswell, J.F., Williams, K.J. (2007). Pathology of Domestic Animals. Eds 5. Cap. 5. Respiratory system. *Sanders Elsevier Edinburgh*. *2.* 589-604.

Catry, B., Chiers, K., Schwarz, S., Kehrenberg, C., Decostere, A., & De Kruif, A. (2005). Fatal peritonitis caused by Pasteurella multocida capsular type F in calves. *J. Clin. Microbiol*. *43.* 1480– 1483.

Chang , P., Wang, C., You, C., & Kao, Y. (2011). Effects of a HP0859 (rfaD) knockout mutation on lipopolysaccharide structure of Helicobacter pylori 26695 and the bacterial adhesion on AGS cells. Bio Research Comm. 497–502.

Chatterjee, S.N., Chaudhuri, K. (2003). Lipopolysaccharides of Vibrio cholerae:

Chen, L., Daniel, B.P., Scruggs, D.W., Banes, M.M., Reekes, B.Y., & Lawrence M,L. (2003). Alteration of DNA adenine methylase (Dam) activity in *Pasteurella multocida* causes increased spontaneous mutation frequency and attenuation in mice. *Microbiol. 149.* 2283-2290.

Christensen, H., Bisgaard, M., Angen, O., Frederiksen, W., & Olsen, J. E. (2005). Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. J.Clin.Microbiol. *43.* 259-270.

Cohen. J. (2002). The inmmunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 420. No. *6917.* 885-891.

Corfield, T. (1992). Bacterial sialidases - roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiol. 2.*509-521.

De Weger, L.A., Van der Vlugt, C., Wijfjes, A. (1987). Flagella of a plant-growth-stimulating Pseudomonas fluorescens strain are required for colonization of potato roots. *J Bacteriol*. *169.* 2769–73.

Deeb, B., & DiGiacomo, R. (2000). Respiratory diseases of rabbits. *Res. Med*. *3.* 465-480.

Deeb, B., & DiGiacomo, R., Bernard, B.I., & Silvernagel, S. (1990). *Pasteurella multocida* and infections in rabbits. *J Clin Microbiol*, *28.* 70-75.

Deeb, B., DiGiacomo, R., Bernard, B.I., & Silvernagel, S. (1999). *Pasteurella multocida* and infections in rabbits. *J Clin Microbiol*, *28.* 70-75.

Deneer, H.G., & Potter, A.A. (1989). Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae. *Infect-Immun*. *57.* 798-804.

Devoe, I.W., & Gilchrist, J.E. (1973). Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis. The J. Experimental medicine*. *138.* 1156-1167.

Doncel, B. (2004). Cuantificación y caracterización histoquímica preliminar de las células caliciformes en fosa nasal y nasofaringe de conejos sanos y con el síndrome de neumonía enzoótica. Tesis MsC FMVZ. *Unal.*

Doughty, S., Ruffolo, C., & Adler, B. (2000). The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida. Vet Microbiol*. 79-90.

Erler, W., Feist, H., & Flossmann, K. D. (1977). Binding relationships of fatty acids in lipid A of lipopolysaccharides from *Pasteurella multocida.* Arch Exp *Veterinarmed. 2.* 203-209.

Esquinas, P. (2004). Comparación ultraestructural de fosa nasal y nasofaringe de conejos sanos y enfermos con el síndrome de neumonía enzoótica. *Memorias IV Reunión anual de Patología Veterinaria*. La Plata. Argentina.

Esquinas, P. (2007). Interacción invitro entre la *Pasteurella multocida* y/o su lipopolisacárido con el epitelio de septo nasal de conejo. Tesis MSc FMVZ. *Unal*.

Fanucchi, M.V., Hotchkiss, J.A., & Harkema, J.R. (1998). Endotoxin potentiates ozone-induced mucous cell metaplasias in rat nasal epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol*. *152.* 1-9.

Farley, M.M., Shafer, W.M., & Spitznagel, J.K. (1988). Lipopolysaccharide structure determines ionic and hydrophobic binding of a cationic antimicrobial neutrophil granule protein. *Infect. Immun*. *56*.1589–1592.

Fletcher, E.L., Fleiszig, S.M.J., & Brennan, N.A. (1993). Lipopolysaccharide in adherence of *Pseudomona aeruginosa* to the cornea and the contact lenses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 34.* 1930-1936.

Fletcher, M. (1996). Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies, in Bacterial Adhesion*:* Molecular and Ecological Diversity, M. Fletcher, Editor. Wiley-Liss, Inc.: New York.

Forder, A. Howarth, G.S., Tivey, D.R., & Hughest, J. (2007). Bacterial Modulation of Small Intestinal Goblet Cells and Mucin Composition During Early Posthatch Development of Poultry. *Poultry Science*. *86.* 2396–2403.

Fuller, B.A. (1989). Microbiología de Burrows. *Ed. Interamericana. Ed. 22. México.*

Gallego, C. (2007). Interacción invitro entre la *Bordetella bronchiseptica* y/o su lipopolisacarido con el epitelio de septo nasal de conejo. Tesis MsC FMVZ. *Unal.* 2007.

Gamiño, A.E., Barrios, M.P., Cárdenas, L.P., Velázquez, F.A., & Vaca, F.P. (2005). Flora normal, probióticos y salud humana. *Acta Universitaria.* 15: 003: 34-40.

Gao, L., & Lipowsky, H. H. (2010). Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes. *Microvascular Research. 80*. 394-401.

Garrido, M.A. (2005). Caracterización de los sistemas de captación de hierro y zinc por el patógeno animal *Pasteurella multocida. Tesis. Universidad Auntónoma de Barcelona.*

Geschwend, G., Feist, H., Erler, W. (1997). Investigation of outer membrane proteins of Pasteurella. 2: Iron-regulated outer membrane proteins of Pasteurella multocida and Pasteurella haemolytica]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. *124.* 168-174.

Gibson, F.C., Tzianabos, A.O., & Rodgers, F.G. (1994). Adherence of Legionella pneumophila to U-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism. *Can J Microbiol 40.* 865–72.

Glavits, R., & Magyar, T. (1990). The pathology of experimental respiratory infection with *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in rabbits. *Act Vet Hung. 38.* 211-215.

González, B. (2006). Prueba de Shapiro & Wilk para verificar la normalidad de un conjunto de datos provenientes de muestras pequeñas. *Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales Universidad Rafael Landivar – Guatemala*.

Gray, H. (1913). In A System of Veterinary Medicine. 1. 420-423.

Gupta, S.K., Berk, R.S., Masinck, S., & Hazlett, L.D. (1994). Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect. Immun. 62*. 4572-4579.

Gupta, S.K., Berk, R.S., Masinck, S., & Hazlett, L.D. (1994). Pili and lipopolysaccharide of Pseudomonas aeruginosa bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect. Immun. 6*2. 4572-4579.

Halloy, D.J, Bouhet, S., Oswald, I.P., Goret-Nicaise, M., Kobisch, M., Mainil, J., & Gustin, P.G. (2004). Pathophysiological changes occurring during E. coli endotoxin and Pasteurella multocida challenge in piglets: relationship with cough and temperature and predicitive value for intensity of lesions. *Vet Research. 35.* 309–324.

Harper, M., Michael, F., John, M., Vinogradov, E., Adler, B., Boyce, J., & Adrew, D. (2011). *Pasteurella multocida* Heddleston serovars a and 14 express diferent lipopolysaccharide structures but share the same lipopolysaccharide biosynthesis outer core locus. *Vet Microbiol. 10.* 2-21.

Heddleston, K. L., & Rebers, P.A. (1972). Fowl cholera: cross-immunity induced in turkeys with formalin-killed in-vivo-propagated *Pasteurella*. *Avian Dis*. *16.* 578- 586.

Henderson, I.R., & Owen, P. (1999). The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and *oxyR*. *J Bacteriol .181.* 2132–2141.

Hermannson, M., Kjelleberg, S., Korhonen, T.K., Stjernstroe, T.A. (1982). Hydrophobic and electrostatic characterization of surface structures of bacteria and its relationship to adhesion to an air-water interface. *Arch Microbiol. 131*. 308-312.

Heumann, D., Glauser, M.P., & Calandra, T. (1998). Molecular basis of host-pathogen interaction in septic shock. *Curr Opin Microbiol*. *1*. 49-55.

Hitchcock, P.J., & Brown, T.M. (1983). Morphological heterogeneity amon Salmonella lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol*. *154.* 269-277.

Hodgson, J.C. (2006). Endotoxin and mammalian host responses during experimental disease. *J. Camp. Path. 135.* 157-175.

Hua Yuan, Cynthia, N., Perry., Chengqun, H., Eri, I.K., Carreira, S., Glembotski, S., & Gottlieb, R. (2009). LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol. 296.* 470-479.

Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Beutler, B., Galanos, C., & Freudenberg, M.A. (2006). R-form LPS, the master key to the activation ofTLR4/MD-2-positive cells. *Eur J Immunol. 36*. 701-711.

Hueppe, F. (1886). Ueber die Wildseucine und ihre Bedeutung für die Nationalökonomie und die Hygiene. *Berliner Klinische Wochenschrift. 44*. 753-758.

Iregui, C., & Mendoza, J.A. (1992). Early damages to lung capillaries in enzootic pneumonia of rabbits. *Acta Vet. Hung*. *40.* 195-201.

Islam, L.N., Nabi, A.H., Ahmed, K.M., Sultana, N. (2002). Endotoxins of enteric pathogens are chemotactic factors for human neutrophils. *J. Biochem. Mol. Biol. 35.* 482– 487.

Izhar, M. Nuchamowitz, Y., & Mirelman, D. (1982). Adherence of Shigella Jexneri to guinea-pig intestinal cells is mediated by a mucosal adhesin. *Infect and Imm. 35.* 1110-1118.

Jacques, M. (1996). Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysacharides in bacterial adherence. *Trends and microbiology. 4.* 408-410.

Jacques, M., Belanger, M., Diarra, M.S., Dargis, M., Malouin, F. (1994). Modulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron-restricted conditions and in vivo. Microbiology 140, 263–270.

Jacques, M., Goy, G., Mittal, K.R., (1988). Hemagglutinating properties of Actinobacillus pleuropneumoniae. *Can. J. Microbiol* . 34. 1046-1049.

Jacques, M., Kobisch, M., Belanger, M., Dugal, F. (1993). Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. Infect. Immun. 61, 4785–4792.

Jaglic, Z., Jeklova, E., Leva, L., Kummer, V., Kucerova, Z., Faldyna, M., Masakova, J., Nedbalcova, K., & Alexa, P. (2008). Experimental study of phatogenicity of *Pasteurella multocida* serogrup F in rabbits. *Vet Microbiol. 126* 168-177.

Jaglic, Z., Kucerova, Z., Nedbalcova, K., Hlozek, P., & Bartos, M. (2004). Identification of Pasteurella multocida serogroup F isolates in rabbits. *J. Vet. Med. 51*. 467–469.

Kawamoto, E., Sawada, T., & Suzuki, K., Maruyama, T. (1990). Serotypes of Pasteurella multocida isolates from rabbits and their environment in Japan. Nippon Juigaku Zasshi. *52*. 1277–1279.

Kawamoto, E., Sawada. T., Suzuki, K., & Maruyama, T. (1990). Serotypes of Pasteurella multocida isolates from rabbits and their environment in Japan. *Japanese J. Vet. Scie. 52.* 1277–1279.

Kitt, T. H. (1893). Bakterienkunde und Pathologische *Mikroskopie*. *304.* 23-26.

Knirel, Y.A., Reitschel, E., Marre, R., & Zahringer, U. (1994). The structure of the Ospecific chain of Legionella pneumophila serogroup 1 lipopolysaccharide. *Eur J Biochem.*239–45.

Kobayashi, K., Hernandez, L.D, Galan, J.E., Janeway, J.R., C.A., Medzhitov, R., Flavell, R.A., IRAK-M. (2002). Is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell.110*.191–202.

Koneman, E.W., Stephen, D.A., Williams, M.J., & Schrenberger, P.G. (1999) Diagnóstico Microbiológico. *Editorial Médica Panamericana.Buenos Aires, Argentina*. 388-461.

Kovbasnjuk, O.N., & Spring, K.R. (2000). The apical membrane glycocalyx of MDCK cells. *J. Membr. Biol. 176*. 19–29.

Kpodékon, M., Rideaud, P., & Coudert, P. (1999). Pasteurelloses du lapin: revue. *Revue Med Vet*. *150.* 221-238.

Krivan, H.C., Ginsburg, V., & Roberts, D.D. (1988). Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas cepacia isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). *Arch Biochem Biophys*. *260.* 493–6.

Krivan, H.C., Roberts, D.D., & Ginsburg, V. (1988). Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAcb1- 4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci. 85*: 6157–61.

Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J., Neter, J. & Li, W. (2005). Applied linear statistical models. 5th Ed. *McGraw-Hill. Irwin*. Boston.

Leathem, A., & Atkins, N. (1983). Lectin binding to formalin fixed parafin sections. *J Clin Pathol. 36.* 747-750.

Lee, H-M.,Takeyama. K., & Dabbagh, K. (2000). Agarose plug instillation causes goblet cell metaplasia by activating EGF receptors in rat airways. *Am. J. Physiol*. *278.* 185–92.

Lee, C.H & Tsai CM. Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation. *Anal Biochem.* 267:161-168.1999.

Li, J.D., Dohrman A, Gallup, M. Transcriptional activation of mucin by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 94:967–72. 1997.

Ligniéres, J. M. (1990). Contribution à létude et à la classification des septicèmies hémorrhagique. Les Pasteurelloses. *Ann.Inst.Pasteure. 15.* 734-736.

Lindsay, S. S., B. Wheeler, K. E. Sanderson, J. W. Costerton., & K.-J. Cheng (1973). The release of alkaline phosphatase and of lipopolysaccharide during the growth of rough strains of *Salmonella typhimurium. Can. J. Microbiol. 19.* 335-342.

Liu, Y., Yang, S., Xu, H. (2004). The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. J Biotechnol. *110.* 251–256.

Lu., Y.C., Yeh, W.C., & Ohashi, S.P. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. *42.* 145-151.

Lugtenberg. B. R., Van, B., & De Jong. (1984). Atrophic rhinitis in swine: correlation of *Pasteurella multocida* pathogenicity with membrane protein and lipopolysaccharide patterns. *Infect. Immun*. *46.* 48-54.

Mackowiak, P.A. (1982). The normal microbial flora. *N Eng J Med. 307*. 83-93.

Mahdavi, J., Male, A., Buller, H., Einerhand, A., Burne, T., & Dekker J. (2003). Muc5AC is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in human stomach. *Helicobacter. 8.* 521-523.

Malhotra, R., Priest, R., Foster, M.R., & Bird, M.I. (1998). P-selectin binds to bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Immunol* . *28.* 983-8.

Manning, P. J., Naasz, M. A., DeLong, D., & Leary, S.L. (1986). Pasteurellosis in laboratory rabbits: characterization of lipopolysaccharides of Pasteurella multocida by polyacrylamide gel electrophoresis, immunoblot techniques, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun*. *53.* 460-463.

Maroudas, N.G. (1973). Chemical and mechanical requirements for fibroblast adhesion. *Nature. 254.* 695-696.

Martínez, R.N., & Martínez, N. (1997). Diseño de experimentos. *Fondo Nacional Universitario.* 62-63.

Matthysse, A., Wyman, P.M., Kathryn, V., Holmes, V. Plasmid-Dependent Attachment of Agrobacterium tumefaciens to Plant Tissue Culture Cells. *Infec and Immun.* 516-522

Mayer, R.J., & Walker, J.H. (1987). Immunochemical methods in cell and Molecular Biology. *Academic Press*. *7.* 63-66.

Mayeux, R,P. (1997). Pathobiology of lipopolysaccharide. *J Tox Environm Health. 51*. 415-35.

Mayeux, R. P. (1997). Pathobiology of lipopolysaccharide. *J Tox Environm Health. 51.* 415-35.

McIntire, F.C., Hargie, M.P., Schenck, J.R., Finley, R.A., Sievert, W.H., Rietschel, E.T., Rosenstreich, D.L. (1976). Biologic properties of non toxic derivatives of a lipopolysaccharide from Escherichia coli K235, J. Immunol. *117.*674–678.

McSweegan, E. and Walker, R.I. (1986). Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. Infect. Immun. 53: 141-148.

Michael, S.T., Li, J., Vinogradov, E., Larocquce, S., Harper, M., & Cox, A. (2005). Structural analysis of the lipopolysaccharide of Pasteurella multocida strain VP161: identification of both Kdo-P and Kdo-Kdo species in the lipopolysaccharide. *Carbohydrate*. *1.* 59-68.

Montero C. Manual de técnicas de histoquímica básica. *Universidad Autónoma de México.* P. 122-124. 1997.

Moreno, A.M., Baccaro, M.R., Ferreira, A.J.P., & De Castro, A.F.P. (2003). Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing Pasteurella multocida subsp multocida isolates from pigs. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1743–1746.

Moreno, E.A. (1996). Aislamiento y tipificación de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* involucradas en el complejo neumónico de los conejos en una granja de la sabana de Bogotá. *Tesis Universidad Nacional de Colombia*.

Mroczenski-Wildey, M.J., Di Fabio, J.L. & Cabello, F.C. (1989). Invasion and lysis of HeLa cell monolayers by *Salmonella typhi*: role of lipopolysaccharide. *Microb. Pathog*. 6: 143- 152.

Murillo, J.C., & Iregui, C. (1993). Descripción morfológica de la presencia de bacterias durante el curso del síndrome neumonía enzoótica en conejos. Rev Acovez. *17*. 23-26.

Namioka, S., & Bruner, D.W. (1963). Serological studies on *Pasteurella multocida*. IV. Type distribution of the organisms on the basis of their capsule and O groups. *Cornell Vet. 53.* 41-53.

O'Toole, G., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol. 30*. 295–304.

Ofek, L., Hasty, D.L, & Doyle, R.J. (2003). Bacterial adhesion to animal cells and tissue. *ASM Press. Washington.*

Palomar, J., Leranoz, A. M. & Vinas, M. (1995). Serratia marcescens adherence : the effect of O-antigen presence. Microbios 81, 107-1 13

Pandit, K.K., Smith, J.E. (1993). Capsular hyaluronic acid in *Pasteurella multocida* type A and its counterpart in type D. *Res. Vet. Sci*. *54.* 20–24.

Pappenheimer, J.R. (2001). Role of pre-epithelial “unstirred” layers in absorption of nutrients from the human jejunum. *J. Membr. Biol. 179.* 185–204.

Paradis, S. E,. Dubreuil, D., Rioux, D., Gottschalk, M. & Jacques M. (1994). High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect Immu. 62.* 3311-3319.

Pasteur, L. (1880). Sur les maladies virulents et en particulier sur la maladie appelee vulgairement cholera del poules. *Comp.Rend.Acad.Sci*. *90.* 239, 952, 1030.

Peppler, M.S. (1984). Two physically and serologically distinct lipopolysaccharide profiles in strains of Bordetella pertussis and their phenotype variants. *Infect. Immun*. *43.* 224-232.

Perfumo, C., Mores, N., Armocida, A., Piffer, L., Massone, A., Itagaki, S. (1998). Histochemical and lectinhistochemical studies on nasal mucosa on pigs with or without respiratory diseases. *J Vet Med Sci. 60.* 1021-1023.

Pier, G.B., Grout, M., Tanweer, S., Zaidi, Olsen, J., Johnson, G., Yankaskas R,J., & Goldberg, B.J. (1996). Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science*. *271.* 5264 – 67.

Pier, G.B., Grout, M., Tanweer, S., Zaidi., Olsen, J., Johnson, G., Yankaskas, R.J., & Goldberg, B.J. (1996). Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science*. 271: 5264 – 67.

Pistole, T.G. (1981). Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substance. *Ann Rev Microblol. 35.* 85-112.

Pixley, R.A., De la Cadena R., Page, J.D, Kaufman, N., Wynshock, E.G., & Chang. (1993). The contact system contributes to hypotension but not disseminated intravascular coagulation in lethal bacteremia. *In vivo* use of a monoclonal anti-factor XII antibody to block contact activation in baboons. *J Clin Invest*. *91*. 6-8.

Pruimboom, I., Rimler, R., Ackermann, M. (1999) Enhanced adhesion of *Pasteurella multocida* to cultured turkey peripheral blood monocytes. *Infect immun. 67*. 1292-1296.

Raetz, C.R.H., & Whitceld, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. Annual Review of Biochemistry. 71. 635-700 Janssens, S. & Beyaert, R. (2003). Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev.* 16, 637-646.

Rasband, W. (1997–2004). ImageJ. Release 1.33o. Natl. Inst. Health, Bethesda, MD.

Retamal P. (2001). Epidemiología de las enfermedades respiratorias del cerdo. *Tecno Vet. 3*, 13-16.

Rietschel, E. T., Seydel, U., Zahringer, U., Schade, U. F., Brade, L., Loppnow, H., Feist, W., Wang, M. H., & Ulmer, A. J. (1991). Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity. *Infectious Disease Clinics of North America*. *5.* 753-779.

Rietschel, E. T., Westphal, O., Brade, H., Opal, S. M., Vogel, S. N., Morrison. & Marcel, D. C. (1999). History of Endotoxins. *Endotoxins in Health and Disease.* 1-30.

Rietschel, E., & Brade, H. (1992). Bacterial Endotoxins. *Sci. Am. 267.* 26-33.

Rietschel, E.T., & Cavaillon, J.M. (2002). The endotoxina. *J Endotoxin*. *8.*/14(2) 1-/12.

Rietschel, E.T., Brade, H., Holst, O., Brade, L., Müller-Loennies, S., & Mamat, U. (1996). Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol*; *216.* 39-81.

Rimler, R.B. (1990). Comparisons of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharides by SDS–PAGE to determine relationship between group B and E hemorrhagic septicemia strains and serologically related group A strains. *J. Clin. Microbiol. 28.* 654–659.

Rimler, R.B. (1994). Presumptive identification of *Pasteurella multocida serogrups* A, D and F by capsule depolymenzation with mucopolysaccharidases. *Vet. Rec. 134.* 191-192.

Rimler, R.B., & Rhoades, K.R,. (1989). *Pasteurella multocida*. San Diego, CA: *Academic Press.3.* 24-28.

Roantree, R. J. (1971). The relationship of lipopolysaccharide structure to bacterial virulence. In: Bacterial Endotoxins, S. Kadis, G. Weinbaum and S.J. Ajl. Eds, Academic Press, NewYork, London. 37.

Roberts, R. S. (1947). An immunological study of *Pasteurella septica*. *J.Comp.Pathol. 57*. 261-278.

Rodríguez, A.L., Reglero, A., & Luengo, J.M. (1987) Uptake of A'-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli* K-235. Biochemical characterization of the transport system. *Biochem. J. 246.* 287-294.

Rosenbusch, C.T., & Merchant, I.A. (1939). A Study of the Hemorrhagic Septicemia *Pasteurellae*. *J.Bacteriol*. *37.* 69-89.

Rosener, H., Grimmercke, H.D., Kninel, Y.A., & Shashkov, A.S. (1992). Hyaluronic acid and (1-4)-B-D- Xylan, extracellular polysaccharides *of Pasteurella multocida* strain 880. *Carbohydr Res*. 223. 329-333.

Ruffolo, C.G., Tennent, J.M., Milchalsky, W.P., & Adler, B. (1997). Identification, Purification, and Characterization of the Type 4 Fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Am Soc for Microbiol. 65.* 339-343.

Scharmann, W., Drzeniez, R., & Blobel, P. (1969). Neuraminidase of *Pasteurella multocida. Infect. Immun. 1.* 319-320.

Shenep, J.L. (1997). Septic shock. *Adv Ped Infect Dis*. *12.* 209-41.

Shi, W., Ngok, K., & Zusman, R. (1996). Cell density regulates cellular reversal frequency in Myxococcus xanthus. *Proc. Natl. Acad. Sci*. *93*:4142–46.

Simoni, S.F., Bosma, T.N., Harms, H., & Zehnder, A.J. (2000). Bivalent cations increase both the subpopulation of adhering bacteria and their adhesion efficiency in sand columns. Environ. *Sci. Technol*. *34.*1011-1017.

Smirnova MG, Birchall JP, Pearson JP. (2000). TNF-alpha in the regulation of MUC5AC secretion: some aspects of cytokine-induced mucin hypersecretion on the in vitro model. *Cytokine*.12:1732–1736.

Smirnova MG, Kiselev SL, Birchall JP, Pearson JP. (2001). Up-regulation of mucin secretion in HT29-MTX cells by the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6*. Eur Cytokine Netw .* 12:119 –125.

Smith, H.E., Damman, M., Van der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H.J., Stockhofe, N., & Smits, M.A,. (1999). Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun*. *67.* 1750–1756.

Snipes, K. P., Ghazikhanian, G. Y., & Hirsh, D. C. (1987). Fate of *Pasteurella multocida* in the blood vascular system of turkeys following intravenous inoculation: comparison of an encapsulated, virulent strain with its avirulent, acapsular variant. *Avian Dis. 31.* 254-259. 1987.

Snipes, K.P., & Hirsh, D,C. (1986). Association of complement sensitivity with virulence of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. *Avian Dis*. *30.* 500–504.

Stahel, A., Hoop, R., kuhnert, P., & Koruzak, B. (2009). Phenotipic and genetic characterization and related isolates from rabbits in Switzerland. *J. Vet. Diagn. Invest. 21*. 793-802

Strain, S.M., Fesik, S.W., & Armitage, I.M. (1983). Characterization of lipopolysaccharjde from a heptoseless mutant of *Escherichia coli* by carbon 13 nuclear magnetic resonance. *J. Biol. Chem. 258.* 2906-2910.

Straus, D.C., Jolley, W.L., & Purdy, C.W. (1996). Characterization of neuraminidases produced by various serotypes of *Pasteurella multocida. Infect. Immun. 54*:1446-1449.

Strauss, J., Burnham, N., & Camesano, T. (2009). Atomic force microscopy study of the role of LPS O-antigen on adhesion of E. coli. *J. Mol. Recognit. 22.* 347–355

Suffredini, A.F., Harpel, P.C., Parrillo, J.E. (1989). Promotion and subsequent inhibition of plasminogen activation after administration of intravenous endotoxin to normal subjects. *N Engl J Med*. *320.* 1165-72.

Takeyama, K., Jung, B., Shim., J.J. (2001). Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. *Am. J. Physiol. 280.* 165–72.

Tang, H.B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B.H., Goldberg, J.B., & Prince, A. (1996). Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect. Immun*. *64.* 37-43.

Tannock, G.W. (1990). The microecology of lactobacilli inhabiitin the gastrointestinal tract. *Advances in Microbial Ecology*. *11*. 147-171.

Tatum, F.M., Yersin, A.G., & Briggs, R.E. (2005). Construction and virulence of *Pasteurella multocida fhab2* mutant in turkeys. *Microb Pathog. 39*: 9-17.

Thomas, R., Brook, T. (2004). Oligosaccharide receptor mimics inhibit Legionella pneumophila attachment to human respiratory epithelial cells. Microbial Patho. 83–92.

Topley, W.W., & Wilson, G.S. (1929). The Principles of Bacterology and Immunity.Edward Arnold & Co.*London. 488.* 53-58.

Trevisan, V. (1887). Sul micrococco della rabbia e sulla possibilita di riconoscere durante il periodo d'incubazione, dall'esame del sangue della persona morsicata, se ha constratta I'infezione rabbica. Rend.R.1st.*Lomb.Sci.Let*. *20*. 88-94.

Triandafillu, K., Balazs, D.J., Aronsson, B.-O., Descouts, P, Tu Quoc, C., Van Delden, H.J., Mathieu, M., & Harms, H. (2003). Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* strains to untreated and oxygen-plasma treated poly(vinyl chloride) (PVC) from endotracheal intubation devices*. Biomaterials*. 24. 1507-1518.

Ward, M.J., & Zusman, D.R. (1997) Regulation of directed motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol*. *24.* 885–93.

Watson, A.A., Alm, R.A., Mattick, J.S. (1996). Identification of a gene, pilF, required for type 4 fimbrial biogenesis and twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene. 180.* 49–56.

Weber, D. J., Wolfson, J. S., Swartz, M. N., & Hooper, D.C. (1984). *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore). 63.* 133-154.

Weckesser, J., & Mayer, H. (1988). Different lipid A types in lipopolysaccharjdes of phototrophic and related nonphototrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Rey. 54* 143-154.

Westphal, 0., Westphal, U., & Sommer, Th. (1978)The historyof pyrogen research. In *Microbiology -1977* (Schlessinger, D., ed). *Am Soc for Microbiol.* 221-238.

Westphal, O., & Jann. (1965). Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water further applications of trhis procedure. *Methodos Carbohydr Chem*. *5.* 83-91.

Wexler, D., Braverman, I., & Amar, M. (2006). Histology of the nasal septal swell body. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. *134*. 596-600.

White, D.L., Jolley, W.L., Purdy, C.W., & Straus, D.C. (1995). Extracellular neuraminidase production of *Pasteurella multocida. Infect. Immun. 63:*1703-1709.

Williams, V., & Fletcher, M. (1996). *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl. Environ. Microbiol. 62.* 100–104.

Wolpert, J.S., & Albersheim, P. (1976). Host-symbiont interactions. I. The lectins of legumes interact with the O-antigen-containing lipopolysaccharides of their symbiont Rhizobia. *Biochem Biophys Res Commun. 70.* 729-737.

Yanagihara., K., Seki. M., & Chen, P.W. (2001). Lipopolysaccharide induces mucus cell metaplasias in mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. *24.* 66-73.

Yuan, H., Perry, C., Huang, C., Kanai, E.I., Carreira, R.S., Glembotski, C.C., & Gottlieb, A. (2009). LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol 296..* 470–479.

Zahringer, U., Knirel, Y.A., Lindner, B., Helbig, J.H., Sonesson, A., Marre, R., & Rietschel, E.T. (1995). The lipopolysaccharide of Legionella pneumophila serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance. *Genes to Therapy*. 113–39.

A. Anexo: Mantenimiento de la bacteria sistema Cryobank® (Copan diagnostics)

- De una placa que contenga un cultivo fresco de no más de 18 horas se toma una muestra y se disuelve en el medio que contiene el tubo cryobank.

- Agitar hasta incorporar completamente la muestra en el medio invirtiendo el tubo de esta manera las bacterias se adhieran a las perlas.

- Con una pipeta estéril remover del tubo el medio de cultivo.

- Refrigerar el tubo que contiene las perlas a -70ºC.

Para recuperar la bacteria:

- Pasar una de las perlas sobre la superficie de una placa que contenga medio de cultivo BHI con o sin sangre.

B. Anexo: Extracción y purificación del LPS por método fenol – agua caliente (Westphal y Jann, 1965)

- Siembra masiva de la bacteria en cajas de petri con agar BHI a 37 ºC por 24 horas.
- Recolección de la masa bacteriana realizando una suspensión con 5 ml solución salina fisiológica estéril (SSF) y timerosal al 0.1% (p/v) por caja de petri y refrigerando a 4 ºC por 24 horas para inactivar y preservar las estructuras bacterianas.
- Centrifugación de la suspensión a 4000-7000 rpm por 50 minutos y 3 lavado con solución salina fisiológica estéril (SSF).
- El sedimento bacteriano obtenido se re-suspende en 40 ml de agua destilada precalentadda a 68 ºC y se le adiciona 40 ml de fenol al 90%.
- Mantenimiento de la nueva solución a 68 ºC en baño maría con agitación constante por 30 minutos.
- Refrigeración a 4 ºC por 24 horas.
- Centrifugación a 4000-7000 rpm por 60 minutos (separación de las fases acuosa, interfase, fenólica y precipitado).
- Recolección estéril de la fase acuosa (donde se encuentra el LPS).
- Centrifugación de las tres fases restantes (interfase, fenólica y precipitado) a 4000-7000 rpm por 60 minutos para una nueva extracción de la fase acuosa.
- A las dos fases acuosas se les adiciona etanol al 95% en una proporción de 1:10 (LPS:etanol).
- Refrigeración a - 20 ºC por 18 horas.
- Centrifugación a 4000-7000 rpm por 60 minutos.
- Re-suspensión del precipitado en agua destilada estéril.

- Diálisis por 48 horas con agua destilada fría con cambios constantes de ésta para eliminar los residuos de fenol.
- Centrifugación a 3500 rpm por 30 minutos.
- Re-suspensión del extracto en agua destilada estéril.
- Mantenimiento del extracto de LPS a – 20 ºC hasta su utilización.
- Aplicación de 100mg/ml de proteinasa K (sigma ®)
- Centrifugación a 32.000 rpm/3h.
- Re-suspensión del extracto en agua destilada estéril.

C. Anexo: Cuantificación del LPS (Tsai, 1999)

- En una placa de microelisa o caja multipozos se adicionan 50 µl de la dilución del LPS patrón y las diluciones a cuantificar hasta el pozo 12, (50 µl por pozo).
- Adición y mezcla de 50 µl de $NaIO_4$ 32 mM por pozo.
- Incubación a temperatura ambiente por 25 minutos.
- Adición y mezcla de 50 µl de reactivo de Purpald 136 mM (preparado en NaOH 2N) por pozo.
- Incubación a temperatura ambiente por 20 minutos.
- Adición y Mezcal de 50 µl de $NaIO_4$ 64 mM por pozo.
- Incubación a temperatura ambiente por 20 minutos.
- Medición de la absorbancia a través del lector de placa a 595 nm.

D. Anexo: Doble marcación enzimática Peroxidasa – fosfatasa alcalina indirecta (Meyer and Walker, 1987; Montero, 1997).

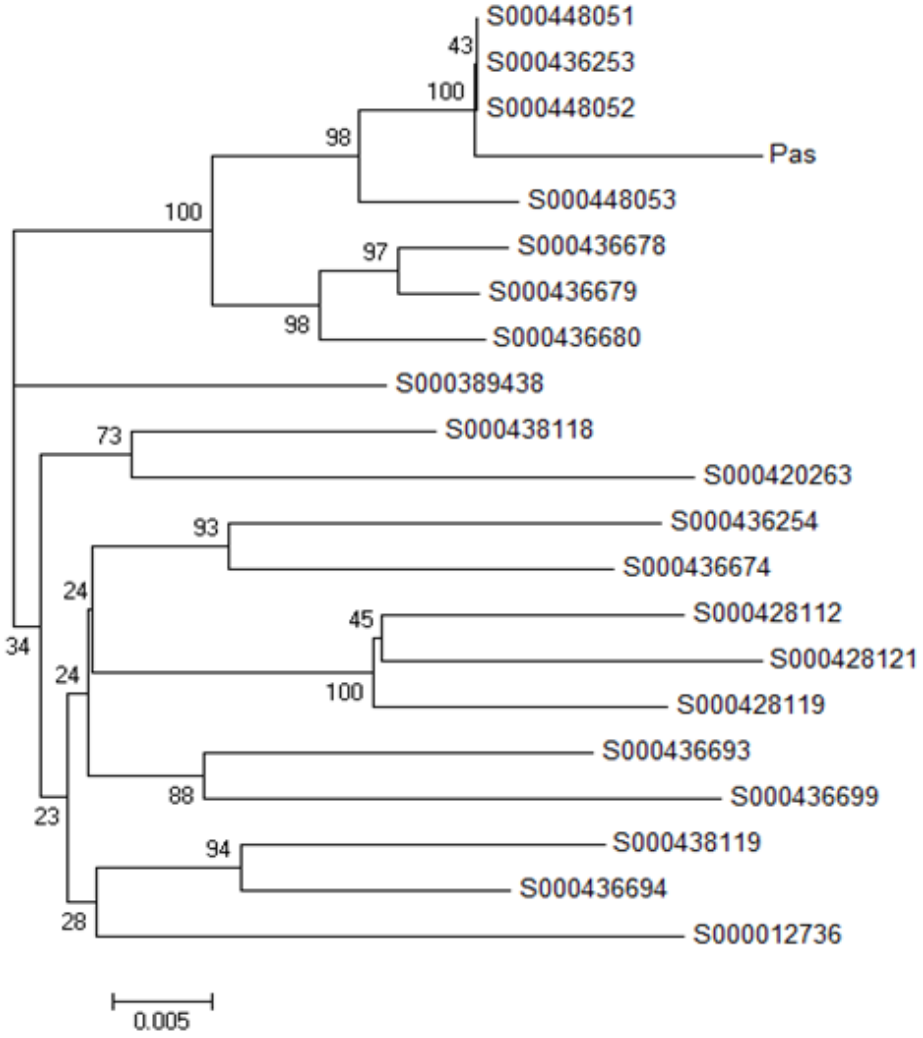
- Obtención de cortes de 3-4 µm de grosor en micrótomo
- Calentamiento de láminas a 60 ºC por 4 horas
- Desparafinización de las láminas con 3 cambios de xilol de 15 min cada uno.
- Hidratación de láminas en concentraciones descendentes de etanol (98% - 90% - 70%) por 10 minutos cada uno.
- Hidratación de láminas en agua destilada por 10 minutos.
- Bloqueo de la peroxidasa endógena con 4 ml de peróxido de hidrógeno al 30%.
- Lavado con TBST por 5 min en agitación constante
- Bloqueo de sitios inespecíficos con leche descremada al 5% en TBST por 30 min.
- Dos lavados con TBST por 5 min en agitación constante.
- Secar completamente las láminas a temperatura ambiente antes de la aplicación del primer antisuero.
- Incubación del primer antisuero en cámara húmeda por 1 h a 37ºC.
- 2 lavados con TBST por 5 min en agitación constante.
- Secar completamente las láminas a temperatura ambiente
- Aplicación del conjugado (Proteina G recombinante peroxidasa) disuelta en TBST-leche.
- Incubación del conjugado por 1 h en cámara húmeda a 37ºC
- 2 lavados con TBST
- Aplicación de la solución reveladora (0.09 g de diamenobenzidina en 150 ml de THCL y 300 µl de peróxido de hidrogeno) por 10 min.
- Lavado por 5 min en agua corriente.

- Secar completamente las láminas a temperatura ambiente.
- Aplicación del conjugado de lectina LPA-Fosfata sobre las secciones de tejido a una concentración de 500 µg/ml.
- Incubación por 60 minutos de las láminas en cámara húmeda a 37 ºC.
- Realizar tres lavados de las láminas con Tris Buffered Saline (*TBS*) (sumergir y retirar).
- Secar las láminas a temperatura ambiente.
- Preparar la solución reveladora.

* Fosfato naftol	20 mg
* Dimetilformamida	200 µl
* Amortiguador TRIS pH 8,7	100 ml
* Fast red	40 mg
* Cloruro de magnesio	4 µg

- Calentar la solución anterior a 60º por 30 minutos para disolver los cristales del Fast red.
- Pasar por papel filtro la solución reveladora antes de usar.
- Dejar temperar la solución a temperatura ambiente antes de usar.
- Incubar las láminas con la solución reveladora en cámara húmeda por 1-2 horas.
- Lavar con agua destilada.
- Tinción de contraste con Hematoxilina
- Lavar en agua destilada y cubrir con medio de montaje.

E. Anexo: Árbol de distribución de distancias para *P. multocida* y secuencia Consenso entre los oligos 27-F y 1942-R para la muestra *P. multocida*

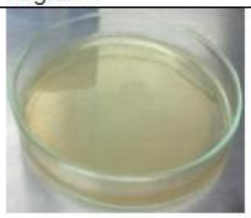
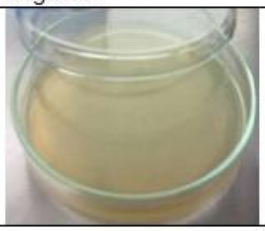
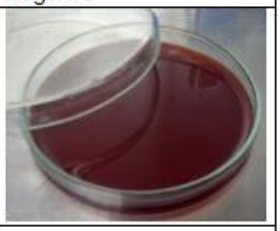
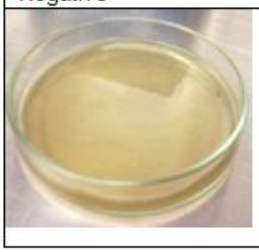
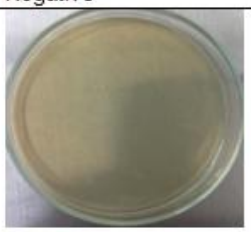
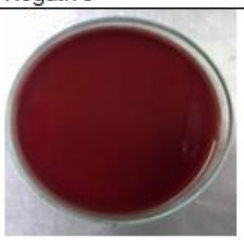


La secuencia S000448052 corresponde a *Pasteurella multocida subespecie multocida.*

F. Anexo: Secuencia Consenso entre los oligos 27-F y 1942-R para la muestra *P. multocida*

CTTCTACGTGTTAGTCGAACGGTAGCAGGAAGAAAGCTTGCTTTCTTTGCTGACG
AGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACT
GTGGGAAACTGCAGCTAATACCGCGTATTCTCTGAGGAGGAAAGGGTGGGACCT
TAGGGCCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTA
AAGGCCTACCAAGCCTGCGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACT
GGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCG
CAATGGGGGGAACCCTGACGCAGCCATGCCGCGTGAATGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGTTCTTTCGGTAATGAGGAAGGGATGTTGTTAAATAGATAGCATCATTG
ACGTTAATTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGKAATACSG
ARGGTGGGAGCRTTAATCGGAATAACTGGGCGTAAAGGGCACGCAGGCGGACTT
TTAAGTGAGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAACTGCATTTCAGACTGGG
AGTCTAGAGTACTTTAGGGAGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATGTGGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAGCCCYTTGGGAATGTACTGACGC
TCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCT
GTAAACGCTGTCGATTTGGGGATTGGGCTATATGCTTGGTGCCCGAAGCTAACGT
GATAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA
ACCTTACCTACTCTTGACATCCTAAGAAGAGCTCAGAGATGAGCTTGTGCCTTCGG
GAACTTAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCGGTCGG
GAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGCATACAGA
GGGCAGCGAGAGTTCGAGCTTGAGCGAATCTCAGAAAGTGCATCTAAGTCCGGA
TTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAG
AATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG
GAGTGGTTTGTACCAGAAGTAGATAGCTTAACTCTTCGCGAGGGCGTTAAGTATA
TTACCGT

G. Anexo: Tabla de registro prueba de esterilidad del LPS

Día 1		Día 2	
BHI sin sangre	BHI con sangre ovina al 5%	BHI sin sangre	BHI con sangre ovina al 5%
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Día 3		**Día 4**	
BHI sin sangre	BHI con sangre ovina al 5%	BHI sin sangre	BHI con sangre ovina al 5%
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
			
Día 5		**Día 6**	
BHI sin sangre	BHI con sangre ovina al 5%	BHI sin sangre	BHI con sangre ovina al 5%
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
			

H. Anexo: Número de pixeles de *P. multocida* y de LPS de *P. multocida* para cada una de las repeticiones de los tratamientos.

Tratamiento / Repetición / explante	**Control negativo** (número de pixeles)		***P. multocida*** (número de pixeles)		**LPS + *P. multocida* Simultáneamente** (número de pixeles)	
	Cantidad estimada de bacteria	Cantidad estimada de LPS	Cantidad estimada de bacteria	Cantidad estimada de LPS	Cantidad estimada de bacteria	Cantidad estimada de LPS
1	0	0	59902	1250	1024062	2080074
2	0	0	59869	1237	1023997	2080012
3	0	0	59904	1248	1024020	2080086
4	0	0	59906	1247	1024015	2080099
5	0	0	59899	1251	1024084	2080071
6	0	0	59900	1247	1024040	2080006
7	0	0	59903	1249	1024072	2079841

Tratamiento / Repetición / explante	**LPS y 30 minutos después *P. multocida*** (número de pixeles)		***P. multocida* y 30 minutos después LPS** (número de pixeles)	
	Cantidad estimada de bacteria	Cantidad estimada de LPS	Cantidad estimada de bacteria	Cantidad estimada de LPS
1	1023177	2079867	634104	31590
2	1020041	2079869	634098	31582
3	1020070	2079851	634091	31584
4	1020011	2079865	634082	31579
5	1020023	2079899	634091	31592
6	1020043	2078991	634089	31588
7	1020007	2079888	634093	31590

I. Anexo: Resultados estadísticos SAS Pixeles *Pasteurella multocida*

Sistema SAS

Obs	muestra	tratamiento	pixelespm
1	1	1	0
2	2	1	0
3	3	1	0
4	4	1	0
5	5	1	0
6	6	1	0
7	7	1	0
8	1	2	59902
9	2	2	59869
10	3	2	59904
11	4	2	59906
12	5	2	59899
13	6	2	59900
14	7	2	59903
15	1	3	1024062
16	2	3	1023997
17	3	3	1024020
18	4	3	1024015
19	5	3	1024084
20	6	3	1024040
21	7	3	1024072
22	1	4	1023177
23	2	4	1020041
24	3	4	1020070
25	4	4	1020011
26	5	4	1020023
27	6	4	1020043
28	7	4	1020007
29	1	5	634104
30	2	5	634098
31	3	5	634091
32	4	5	634082
33	5	5	634091
34	6	5	634089
35	7	5	634093

Sistema SAS

Sistema SAS
Procedimiento GLM

Variable dependiente: pixelespm pixelespm

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	6.9706972E12	1.7426743E12	6160983	**<.0001**
Error	30	8485696.574	282856.55247		
Total correcto	34	6.9707057E12			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	pixelespm Media
0.999999	0.097104	531.8426	547702.7

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
tratamiento	4	6.9706972E12	1.7426743E12	6160983	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
tratamiento	4	6.9706972E12	1.7426743E12	6160983	<.0001

Procedimiento GLM

Test de Levene para homogeneidad de la varianza pixelespm
ANOVA de las desviaciones cuadradas de las medias de grupo

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
tratamiento	4	8.211E12	2.053E12	1.44	**0.2450**
Error	30	4.275E13	1.425E12		

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para pixelespm

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.01
Error de grados de libertad	30
Error de cuadrado medio	282856.6
Valor crítico del rango estudentizado	5.04761
Diferencia significativa mínima	1014.7

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento		Media	Número de observaciones	tratamiento
	A	1024041.4	7	3
	B	1020481.7	7	4
	C	634092.6	7	5
	D	59897.6	7	2
	E	0.0	7	1

Procedimiento UNIVARIATE
Variable: rpixelespm

Shapiro-Wilk #11 X 0.382546 Pr < W <0.0001

Procedimiento GLM

Observación	Observado	Predichos	Residual
1	0.000	-0.000	0.000
2	0.000	-0.000	0.000
3	0.000	-0.000	0.000
4	0.000	-0.000	0.000
5	0.000	-0.000	0.000
6	0.000	-0.000	0.000
7	0.000	-0.000	0.000
8	59902.000	59897.571	4.429
9	59869.000	59897.571	-28.571
10	59904.000	59897.571	6.429
11	59906.000	59897.571	8.429
12	59899.000	59897.571	1.429
13	59900.000	59897.571	2.429
14	59903.000	59897.571	5.429
15	1024062.000	1024041.429	20.571
16	1023997.000	1024041.429	-44.429
17	1024020.000	1024041.429	-21.429
18	1024015.000	1024041.429	-26.429
19	1024084.000	1024041.429	42.571
20	1024040.000	1024041.429	-1.429
21	1024072.000	1024041.429	30.571
22	1023177.000	1020481.714	2695.286
23	1020041.000	1020481.714	-440.714
24	1020070.000	1020481.714	-411.714
25	1020011.000	1020481.714	-470.714
26	1020023.000	1020481.714	-458.714
27	1020043.000	1020481.714	-438.714
28	1020007.000	1020481.714	-474.714
29	634104.000	634092.571	11.429
30	634098.000	634092.571	5.429
31	634091.000	634092.571	-1.571
32	634082.000	634092.571	-10.571
33	634091.000	634092.571	-1.571
34	634089.000	634092.571	-3.571
35	634093.000	634092.571	0.429

Suma de residuales	0.000
Suma de residuales cuadrados	8485696.571
Suma de residuales cuadrados - SS de error	-0.003
Autocorrelación de primer orden	-0.013
Durbin-Watson D	2.026

Sistema SAS

Obs	muestra	tratamiento	pixeleslps
1	1	1	0
2	2	1	0
3	3	1	0
4	4	1	0
5	5	1	0
6	6	1	0
7	7	1	0
8	1	2	1250
9	2	2	1237
10	3	2	1248
11	4	2	1247
12	5	2	1251
13	6	2	1247
14	7	2	1249
15	1	3	2080074
16	2	3	2080012
17	3	3	2080086
18	4	3	2080099
19	5	3	2080071
20	6	3	2080006
21	7	3	2079841
22	1	4	2079867
23	2	4	2079869
24	3	4	2079851
25	4	4	2079865
26	5	4	2079899
27	6	4	2079891
28	7	4	2079888
29	1	5	31590
30	2	5	31582
31	3	5	31584
32	4	5	31579
33	5	5	31592
34	6	5	31588
35	7	5	31590

Sistema SAS

Procedimiento GLM

Variable dependiente: pixeleslps pixeleslps

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	3.5963111E13	8.9907778E12	Infin	**<.0001**
Error	30	0	0		
Total correcto	34	3.5963111E13			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	pixeleslps Media
1.000000	0	0	838547.2

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
tratamiento	4	3.5963111E13	8.9907778E12	Infin	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
tratamiento	4	3.5963111E13	8.9907778E12	Infin	<.0001

Procedimiento GLM

Observación	Observado	Predichos	Residual
1	0.000	-0.000	0.000
2	0.000	-0.000	0.000
3	0.000	-0.000	0.000
4	0.000	-0.000	0.000
5	0.000	-0.000	0.000
6	0.000	-0.000	0.000
7	0.000	-0.000	0.000
8	1250.000	1247.000	3.000
9	1237.000	1247.000	-10.000
10	1248.000	1247.000	1.000
11	1247.000	1247.000	-0.000
12	1251.000	1247.000	4.000
13	1247.000	1247.000	-0.000
14	1249.000	1247.000	2.000
15	2080074.000	2080027.000	47.000
16	2080012.000	2080027.000	-15.000
17	2080086.000	2080027.000	59.000
18	2080099.000	2080027.000	72.000
19	2080071.000	2080027.000	44.000
20	2080006.000	2080027.000	-21.000
21	2079841.000	2080027.000	-186.000
22	2079867.000	2079875.714	-8.714
23	2079869.000	2079875.714	-6.714
24	2079851.000	2079875.714	-24.714
25	2079865.000	2079875.714	-10.714
26	2079899.000	2079875.714	23.286
27	2079891.000	2079875.714	15.286
28	2079888.000	2079875.714	12.286
29	31590.000	31586.429	3.571
30	31582.000	31586.429	-4.429
31	31584.000	31586.429	-2.429
32	31579.000	31586.429	-7.429
33	31592.000	31586.429	5.571
34	31588.000	31586.429	1.571
35	31590.000	31586.429	3.571

Suma de residuales	0.00000
Suma de residuales cuadrados	50115.14286
Suma de residuales cuadrados - SS de error	50115.14286
Autocorrelación de primer orden	0.22540
Durbin-Watson D	1.54894

Test de Levene para homogeneidad de la varianza pixeleslps
ANOVA de las desviaciones cuadradas de las medias de grupo

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
tratamiento	4	2.5883E8	64706898	2.12	**0.1027**
Error	30	9.1494E8	30498078		

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para pixeleslps

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.01
Error de grados de libertad	30
Error de cuadrado medio	0
Valor crítico del rango estudentizado	5.04761
Diferencia significativa mínima	0

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	tratamiento
A	2080027	7	3
B	2079876	7	4
C	31586	7	5
D	1247	7	2
E	0	7	1

Procedimiento UNIVARIATE
Variable: rpixelelps

Shapiro-Wilk #11 X 0.608825 Pr < W <0.0001