



**EVALUACIÓN DE LA INOCUIDAD DE N-GLUCOSIL AMINOÁCIDOS SOBRE EL
EPITELIO RESPIRATORIO DE SEPTO NASAL DE CONEJO *EX VIVO***

YADIRA CONSUELO SOLANO FLÓREZ

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES –U.D.C.A

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS PECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

BOGOTA D.C.2018

Evaluación de la inocuidad de *N*-glucosil aminoácidos sobre el epitelio respiratorio de septo nasal de conejo *ex vivo*

YADIRA CONSUELO SOLANO FLÓREZ

Trabajo presentado como prerrequisito para obtener el título de profesional en Medicina Veterinaria

Directora

Carolina Gallego Lòpez

MV,MSc,PhD

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES-U.D.C.A

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS PECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

BOGOTA D.C.2018

Evaluación de la inocuidad de N-glucosil aminoácidos sobre el epitelio respiratorio de septo nasal de conejo *ex vivo*

Safety assessment of N-glucosyl amino acids on the respiratory epithelium of rabbit *ex vivo* nasal septum

Resumen

El objetivo de esta investigación se basa en determinar la inocuidad de cuatro diferentes N-glucosil aminoácidos con el fin de evaluar su viabilidad y potencial como alternativa terapéutica capaz de inhibir la adherencia de *Pasteurella multocida* al epitelio respiratorio de conejos. Se empleó un modelo *ex vivo* con fetos de conejo Nueva Zelanda que fueron conservados en Medio Esencial Mínimo Eagle Dulbecco (MEM) para aplicar posteriormente y de manera individual cuatro N-glucosil aminoácido (Leu, Lys, Phe y Asp). Se evaluaron siete cambios microscópicos diferentes en los septos nasales por medio de microscopia de luz convencional (cantidad de células epiteliales, cantidad de células caliciformes, muerte celular, pérdida de cilias, brechas intercelulares, vacuolización citoplasmática e infiltrado neutrofílico). Los hallazgos de esta investigación permiten concluir que los 4 N-glucosil aminoácidos empleados no indujeron cambios microscópicos estadísticamente significativos frente al control negativo, confirmando su inocuidad y posible candidatura como opción terapéutica para inhibir la adherencia bacteriana al epitelio respiratorio.

Palabras clave: *Pasteurella multocida*, N- glucosil aminoácidos, inocuidad, septos nasales, microscopia de luz, alternativa terapéutica.

Abstract

The objective of this research is based on determining the safety of four different N-glucosyl amino acids in order to assess its feasibility and potential as a therapeutic alternative to inhibit the adhesion of *Pasteurella multocida* to epithelium respiratory of rabbits. A former model living with fetuses of rabbit New Zealand which were kept in essential minimum Eagle Dulbecco (MEM) to apply later and on an individual basis four N - glucosyl aminoácido (Leu, Lys, Phe y Asp) was used. Seven different items in the nasal Septum by means of light microscopy (amount of epithelial cells, number of Goblet cells, cell death, loss of Cilia, intercellular gaps, cytoplasmic vacuolation and infiltrate were assessed Neutrophilic) findings from this research suggest that the 4 N - glucosyl used amino acids did not have statistically significant changes facing the negative control, confirming their safety and possible candidacy as a therapeutic option to inhibit bacterial adhesion to the respiratory epithelium.

Key words: *Pasteurella multocida*, N - glucosyl amino acids, food safety, nasal septum, alternative therapy, light microscopy, alternative therapy.

Tabla de contenido

1.Introducción	6
2.Objetivos	7
2.1.Objetivo general	7
2.2.Objetivos específicos	7
3.Impacto esperado	7
4.Antecedentes Bibliográficos	8
5.Metodología	10
6. Resultados	11
6.1. Células epiteliales ciliadas	12
6.2. Células caliciformes	13
6.3.Pérdida de ciliadas	14
6.4.Brechas intercelulares	15
6.5.Vacuolización intracitoplasmática	16
6.6.Infiltrado neutrófilo	17
6.7.Muerte celular	18
8. Discusión	19
9. Conclusiones	20
10. Referencias Bibliográficas	21

Índice de tablas:

Tabla 1. Diseño experimental para la exposición de septos nasales de feto de conejo a 4 diferentes N-glicosilaminoácidos.	9
---	---

Índice de gráficas

Gráfica 1. Porcentaje de células epiteliales ciliadas en septos nasales de feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos	12
Gráfica 2. Porcentaje de células caliciformes en septos nasales de feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos.	13
Gráfica 3. Porcentaje de pérdida de cilias en septos nasales de feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos	15
Gráfica 4. Porcentaje de brechas intercelulares en septos nasales de feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos	16
Gráfica 5. Porcentaje de células con vacuolización citoplasmática en septos nasales de feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos	17
Gráfica 6. Porcentaje de infiltración neutrofílica en septos nasales de feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos	18
Gráfica 7. Porcentaje de muerte celular en septos nasales de feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos	19

Índice de imágenes

Figura 1. Septo nasal de conejo. Regiones dorsal, central y ventral (flechas) teñidos con la técnica de H&E 40X.	11
Figura 2. Septo nasal de conejo. H&E 40x. Explante tratado con Asp, conteo de células epiteliales ciliadas (flechas)	13
Figura 3. Septo nasal de conejo. H&E 40x. Explante tratado con Lys, conteo de células caliciformes (flechas)	14
Figura 4. Septo nasal de conejo. H&E 40x. Explante tratado con Leu. Regiones con evidencia de pérdida de cilias (flechas)	15
Figura 5. Septo nasal de conejo. H&E 40x. Explante tratado con Leu. Regiones de brechas intercelulares (flechas)	16
Figura 6. Septo nasal de conejo. H&E 40x. Septo tratado con Phe. Vacuolización intracitoplasmática de las células epiteliales ciliadas (flechas)	17
Figura 7. Septo nasal de conejo. H&E 40x. Explante tratado con Asp. Infiltrado neutrofílico (flechas)	18
Figura 8. Septo nasal de conejo. H&E 40x. Explante tratado con Leu. Cuerpos apoptóticos (flecha)	19

1. Introducción

Las enfermedades respiratorias de origen bacteriano afectan de manera significativa a las especies domésticas pero, principalmente a las especies destinadas a producción generando grandes pérdidas económicas. La prevención y control de estas enfermedades se ha enfocado principalmente en atacar de manera directa al patógeno ocasionando su muerte o inhibiendo que se reproduzca de manera descontrolada dentro del hospedero. Por otra parte, las vacunas utilizadas actualmente son elaboradas con bacterias inactivadas a las que se les señalan problemas de reactividad debido probablemente al contenido de endotoxina; además, no proveen inmunidad de larga duración (Ataei et al., 2009). La baja capacidad inmunogénica podría deberse a la deficiente cantidad de anticuerpos opsonizantes puesto que dentro de las IgG inducidas por las proteínas de membrana externa (rPmOmpA) no se encuentran anticuerpos con estas propiedades que favorezcan la fagocitosis de *P. multocida* por los neutrófilos (Dabo, Confer, Montelongo, York, & Wyckoff, 2008).

En una amplia variedad de especies sometidas a producción intensiva *P. multocida* juega un papel muy importante como causa de enfermedad y de pérdidas económicas (Dagleish et al., 2010; Dziva et al., 2008); aunque a estos microorganismos se les considera parte de la microbiota de las vías aéreas superiores de los conejos y de otras especies animales, condiciones que generan estrés tales como el hacinamiento, cambios de temperatura o diferentes condiciones ambientales, etc. parecen favorecer su proliferación exagerada y agresividad (virulencia) por mecanismos que aún no están completamente entendidos (Jordan & Roe, 2004). En conejos, *P. multocida* causa distintas patologías entre las que se encuentran desórdenes respiratorios, septicemia, abscesos subcutáneos, celulitis, mastitis e infecciones genitales (Lennox & Kelleher, 2009).

Entre las principales características de patogenicidad de todo agente infeccioso encontramos la capacidad de unión a las superficies epiteliales del hospedero, en el caso de *P. multocida* al epitelio respiratorio utiliza su LPS como otra adhesina más junto con las fimbrias, pilis, hemaglutinina filamentosa y cápsula según lo describe Dziva (Dziva et al., 2008) para unirse a las células del hospedero. Es por esto que con el objeto de prevenir o controlar la infección causada por esta bacteria surge la inquietud sobre si es posible prevenir la adhesión de este microorganismo por medio de sustancias que no lo agredan directamente como las vacunas y los antibióticos comúnmente utilizados, buscando así, una relación más ecológica con este patógeno y evitando de esta forma que su genoma no se vea obligado a reforzar o mejorar sus mecanismos de virulencia.

En el caso de la infección con *P. multocida* igual que otros microorganismos Gram negativos, el problema no se reduce solamente a su presencia y proliferación descontrolada sino que cuentan con diversos factores de virulencia que favorecen la infección y agravan la enfermedad; es el caso del LPS, quizás el más importante y conocido por sus efectos endotóxicos en los hospederos (Harper, Cox, Adler, & Boyce,

2011). De otra parte, una de las principales características de patogenicidad de todo agente infeccioso es su capacidad de unión a las superficies epiteliales del hospedero, en el caso de *P. multocida* se sugiere que puede utilizar su LPS como otra adhesina más junto con las fimbrias, pilis, hemaglutinina filamentosa y cápsula según lo describe (Gallego et al; 2017)

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

Determinar la inocuidad de los N-glucosilaminoácidos en epitelio nasal de septo de feto de conejo *ex vivo*.

2.2 Objetivos específicos:

- Evaluar los cambios microscópicos y macroscópicos de las células del epitelio del septo nasal de conejo después de la exposición a N-glucosilaminoácidos.
- Establecer un precedente la inocuidad de N-glucosilaminoácidos para favorecer la continuidad en investigaciones con respecto a la inhibición de la adherencia de *P. multocida* al epitelio respiratorio
- Proponer el uso de N-glucosilaminoácidos como una alternativa terapéutica para la prevención de la enfermedad respiratoria.

3. Impacto esperado

El propósito de este proyecto se basa en investigar sustancias alternativas para la prevención y el control de las enfermedades infecciosas que no destruyan a los patógenos, sino que entren en contacto con la primera línea de defensa del hospedero que a su vez es una vía de ingreso imprescindible para los patógenos en su ruta hacia las infecciones sistémicas. En esta ubicación los patógenos son más vulnerables, y por lo tanto su detención es más eficaz. Es por esto que demostrar la inocuidad de los N-glucosil aminoácidos sobre el epitelio respiratorio de septo nasal favorecerá el estudio de los mismos como alternativa terapéutica para prevenir de manera eficaz las enfermedades respiratorias de origen bacteriano mediante estrategias ecológicas. De resultar efectivos estos resultados, significaría un importante cambio conceptual en la comprensión y manejo de ciertas infecciones bacterianas hoy en crisis por cuenta de la resistencia a los antibióticos y el fracaso de

algunas vacunas. Eventualmente también tendría impacto en la lucha contra infecciones virales.

4. Antecedentes bibliográficos

Recientes indicios experimentales (Gallego, 2017) demostraron que la incubación previa de *P. multocida* con GlcNAc, AmeGlc y GalNAc inhibió la adherencia de la bacteria al epitelio respiratorio de conejos, igualmente evitó la expresión de signos clínicos, cambios macroscópicos y microscópicos (estadísticamente significativos) en los septos nasales y pulmones de conejos expuesto experimentalmente a la mezcla del microorganismo con los azúcares individuales o a la mezcla de los tres azúcares, con lo cual podrían convertirse en un método de prevención y, eventualmente, de tratamiento ecológico, económico, seguro y efectivo para la infección con *P. multocida* en conejos.

Las bacterias tienen diferentes factores de virulencia, pero la capacidad de formar biopelículas hace que su erradicación sea una tarea difícil, y en la práctica diaria se evidencia como causa de muchas infecciones por ejemplo *Pasteurella multocida* causal de neumonías, el biofilm se formará cuando la bacteria detecte determinados parámetros ambientales, aumento o disminución de disponibilidad, cambios de osmolaridad, el pH, la temperatura, tensión de oxígeno lo que influye a que cambie de forma planctónica a un estado de biofilm, donde poco a poco puede colonizar superficies, con el fin de adherirse y posicionarse en diversas superficies. Este nuevo estadio actúa como una armadura lo que le brinda muchos beneficios a esta comunidad bacteriana que se ha formado siendo resistente a los mecanismos de defensa del hospedador y una respuesta inmune escasa, puesto que se encuentran aisladas por un exopolisacárido, brindándoles resistencia al uso de antibióticos, resistiendo, a diferencia de las bacterias que viven de forma planctónica (Lane et al., 2010).

La inhibición de la adhesión de los patógenos en las primeras fases post-exposición puede prevenir la infección y la enfermedad al interferir con los mecanismos de patogenicidad en los que se requieren interacciones proteína-carbohidrato; en ese sentido, glicanos solubles propios del hospedero pueden bloquear la adherencia inicial o competir por sitios de adherencia con los patógenos (microorganismos o toxinas) a las células del hospedero, de esta manera se elimina el patógeno sin destruirlo. Los microorganismos son menos propensos a desarrollar resistencia a esta clase de moléculas porque en muchos casos la unión a glicanos hace parte de su estrategia patogénica. De otro lado, aunque la secuencia de aminoácidos de las proteínas que actúan como ligandos para los carbohidratos receptores pueden cambiar, la función debe ser preservada, consecuentemente, los medicamentos basados en carbohidratos sufren menos resistencia como consecuencia de cambios fenotípicos o genotípicos como ocurre con las vacunas o con las terapias con anticuerpos monoclonales (Kulkarni et al., 2010; Sattin & Bernardi, 2016).

Jaramillo et al., (Jaramillo et al., 2000) describieron una proteína de 68 kD con propiedades de adhesina de *Mannheimia haemolytica* A1, una pariente cercana de *Pasteurella*, ésta fue inhibida mediante el uso de GlcNAc y NeuNAc en células epiteliales de tráquea *in vitro*. Por otra parte, es posible que el ácido hialurónico presente en el serotipo capsular A de *P. multocida* contribuya a la unión del microorganismo a lectinas propias del epitelio (Jacques & Foiry, 1987; Pistole, 1981). Con todo, Jacques et al., (Jacques & Foiry, 1987) y Hatfaludi et al., (Hatfaludi et al., 2010) sostienen que a pesar de que *P. multocida* posee diferentes estructuras de unión a las células del epitelio respiratorio, el LPS y la fimbria tipo IV serían los principales mediadores de dicha adhesión actuando como ligandos CHO y lectina respectivamente.

Por otra parte, en cuanto al uso de lectinas como inhibidores de adherencia, experimentos *in vitro* con explantes de septo nasal de feto de conejo, demostraron que las lectinas LCA, WGA, RCA120, ECL, SBA, DSL, Con A y GSL II inhibieron significativamente la adhesión de *P. multocida* al epitelio respiratorio; estas lectinas poseen especificidad para unión a carbohidratos entre los que están Man/Glc, GlcNAc, Neu5Ac y Gal/GalNAc (Carrillo, Martinez, Patiño, & Iregui, 2015).

Otros estudios *in vitro* han investigado el efecto de glicoconjugados en la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* a células epiteliales del tracto respiratorio, entre ellos, la heparina, el dextrán y el dextrán sulfato en diferentes grados bloquearon la adherencia de *P. aeruginosa* y algunos mono, di- y tri- sacáridos como GalNAc _ 1–4Gal, GalNAc _ 1–3Gal, Gal _ 1–4GlcNAc and Gal _ 1–3GlcNAc igualmente fueron buenos inhibidores de la adherencia de *P. aeruginosa*, de *Burkholderia cenocepacia* y *Legionella pneumophila*. De manera similar, altas dosis de dextrán administradas en aerosol inhibieron la infección de ratones con *P. aeruginosa* (Bavington & Page, 2005).

Gallego (2017) demostró que los azúcares GlcNAc, AMeGlc y AMeMan utilizados de forma individual inhibieron de forma significativa la adherencia de *P. multocida* A UN001 al epitelio respiratorio de los conejos *in vivo* y con ello la disminución de la presentación e intensidad de signos clínicos, las lesiones macroscópicas y microscópicas en septos nasales y pulmones; aún más, se comprobó que la mezcla de estos 3 azúcares igualmente inhibió de manera significativa la adhesión de *P. multocida* A UN001 al mismo epitelio, así como las consecuencias clínicas y morfológicas inducidas por este patógeno en comparación no solo con el control positivo sino frente a los anteriores azúcares administrados individualmente.

Los carbohidratos intervienen como transmisores de información en todos “los rincones” de la biología. El conocimiento de los mecanismos de síntesis y degradación de estos compuestos es de gran importancia para comprender, diagnosticar y tratar enfermedades. Cuando se habla de carbohidratos se debe hablar necesariamente de lectinas ya que estas son definidas como proteínas que reconocen y se unen a carbohidratos que protruyen de complejos formados por glicolípidos o glicoproteínas. La interacción entre las lectinas con un carbohidrato, es altamente específica, comparable con la interacción antígeno-anticuerpo o enzima-sustrato. Las lectinas

endógenas median procesos biológicos tales como reconocimiento celular, interacciones entre las células y la matriz extracelular, fertilización, desarrollo embrionario, crecimiento celular, migración y adhesión celular, apoptosis, inmunomodulación e inflamación, interacciones hospedero-patógeno, homeostasis e inducción mitogénica. Adam (2003)

Las glicoproteínas son el resultado de la glicosilación de las cadenas peptídicas y actualmente se incluye también en este grupo a los proteoglicanos, glicoconjugados que poseen características diferentes a las de otras glicoproteínas. Existen glicoproteínas que poseen el mismo polipéptido y distintos glicanos y a estos se los denomina glicofomas (Dennis et al., 1999, Taylor & Drickamer 2003).

5. Metodología

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de histopatología de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, debido a la naturaleza del proyecto se obtuvo la verificación por parte del comité de bioética.

Para obtener septos nasales de feto de conejo, se empleó la técnica descrita por (Gallego. 2013), concisamente, se emplearon hembras con 26 días de gestación a las cuales se les practicó cesárea en condiciones de completa asepsia y previa anestesia (xilazina, 5mg/Kg y ketamina, 35mg/kg). Una vez extraídos, los fetos fueron sacrificados con el método de sección medular, se despejaron el cráneo y el rostro, se realizaron cortes transversales secuenciales de la nariz, se retiraron los cornetes y se aisló el septo nasal para obtener tres explantes de aproximadamente 2 mm de grosor.

Los septos se lavaron dos veces en medio esencial mínimo Eagle Dulbecco (MEM) alto en glucosa y después fueron sometidos a diferentes tratamientos de acuerdo a un protocolo previamente definido. En resumen, Durante el transcurso del experimento los explantes se mantuvieron a 37°C en cajas de petri de 50 mm de ancho por 20 mm de alto, en cámara húmeda con una atmósfera de CO₂ al 5%; una vez concluido cada experimento, los explantes se sumergieron en formalina bufferada al 10% (Gallego, Middleton, Martínez, Romero, & Iregui, 2013) (Tabla 1).

Se establecieron 4 tratamientos (leu,lys,phe,asp) y un control negativo distribuidos en un diseño completamente aleatorizado con 4 repeticiones, a partir del cual se procesó y analizó el efecto que ellos tuvieron sobre las variables : cantidad de células epiteliales ciliadas, cantidad de células caliciformes, muerte celular, pérdida de cilias, brechas intercelulares, vacuolización citoplasmática e infiltrado neutrofílico

Tabla 1. Diseño experimental para la exposición de septos nasales de feto de conejo a 4 diferentes N-glucosilaminoácidos.

	MEM control negativo	Leu	Lys	Asp	Phe
Técnica	H&E	H&E	H&E	H&E	H&E
Nº de explantes	3	3	3	3	3
Dosis	0	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
Tiempo de	2h	2h	2h	2h	2h

exposición					
------------	--	--	--	--	--

Los tejidos fueron procesados bajo la técnica de H&E y evaluados de manera ciega por el investigador en microscopio de luz con objetivo de 40X. En septo nasal se observaron 6 campos en total: 2 de la región dorsal, 2 de la región central y 2 de la región ventral del tejido. Se evaluó la cantidad de células epiteliales ciliadas, cantidad de células caliciformes, muerte celular, pérdida de cilias, brechas intercelulares, vacuolización citoplasmática e infiltrado neutrofílico. Se hizo conteo de cada una de las lesiones en cada campo y se calculó el promedio de cada lesión.(Figura 1)

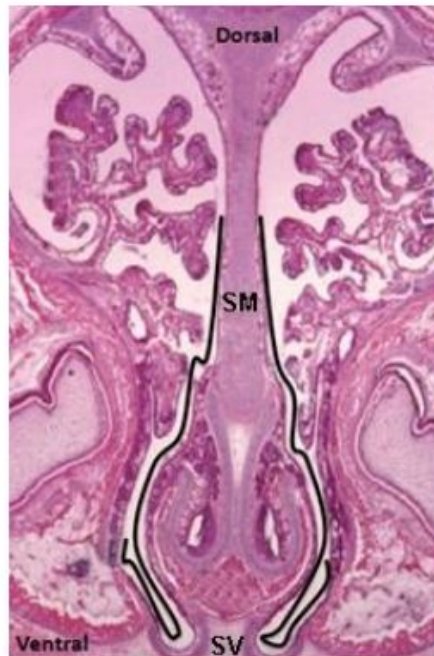


Figura 1. Septo nasal de conejo. Regiones dorsal, central y ventral teñidos con la técnica de H&E 400X.

Las evaluaciones sobre estas variables fueron analizadas a través del lenguaje de programación R (R Core Team, 2018) y particularmente con la librería Agricolae (de Mendiburu, F. 2017). Los resultados se sometieron a análisis de la varianza para determinar significancia, y la comparación de medias se determinó por la prueba de Diferencia Honesta Significativa o prueba de comparación de Tukey.

6. Resultados

Los septos tratados con N-glucosil aminoácidos individuales (Leu, Lys, Phe y Asp) presentaron cambios microscópicos en el epitelio respiratorio, entre los cuales se encuentran: cantidad de células epiteliales ciliadas, cantidad de células caliciformes, vacuolización intracitoplasmática, infiltrado neutrofílico, brechas intercelulares, pérdida de cilias y muerte celular, sin embargo, cabe resaltar que durante el análisis estadístico se encontró que no existen diferencias significativas en los valores de estos hallazgos al compararlos con los obtenidos en el control negativo durante el diseño experimental.

6.1 Células epiteliales ciliadas ciliadas:

El porcentaje de células epiteliales ciliadas en el grupo control negativo fue de 91% mientras que en los grupos expuestos a los azúcares se obtuvieron los siguientes porcentajes:

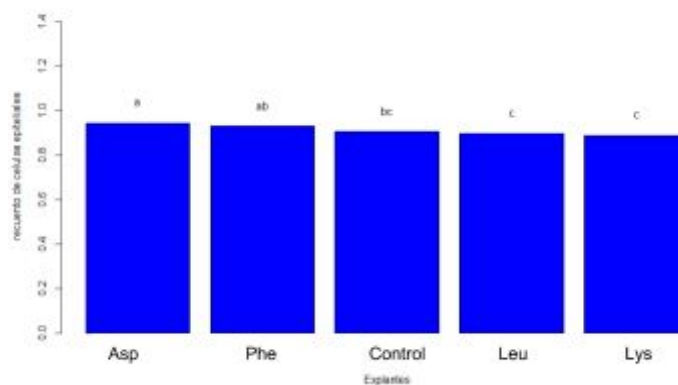
Leu: 90%

Lys: 89%

Phe: 93%

Asp: 94%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos experimentales (gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentaje de células epiteliales ciliadas en septos nasales de feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos

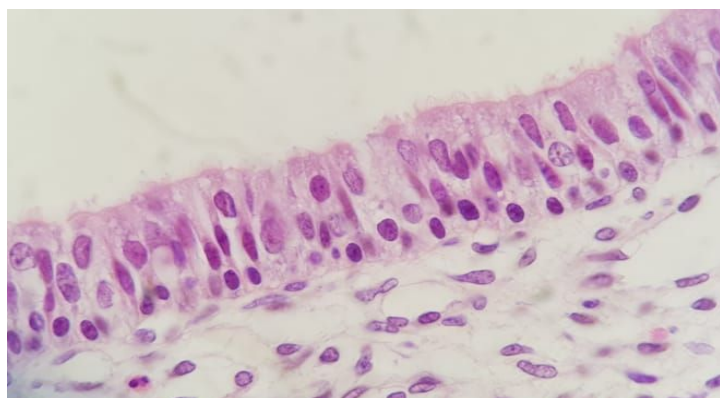


Figura 1. Septo nasal de conejo. H&E 400x. Explante tratado con Lys, conteo general de

células epiteliales ciliadas (flechas)

6.2 Células caliciformes:

El porcentaje de células caliciformes en el grupo control negativo fue de 9% mientras que en los grupos expuestos a los azúcares se obtuvieron los siguientes porcentajes:

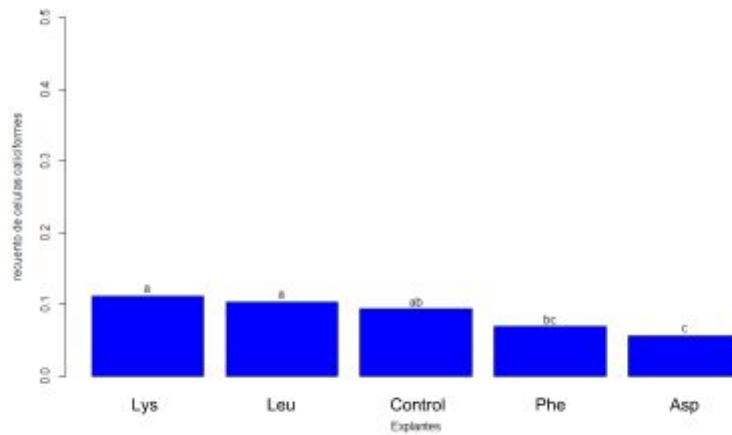
Leu: 10%

Lys: 11%

Phe: 7%

Asp: 6%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos experimentales (Gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentaje de células caliciformes en septos nasales de feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos.

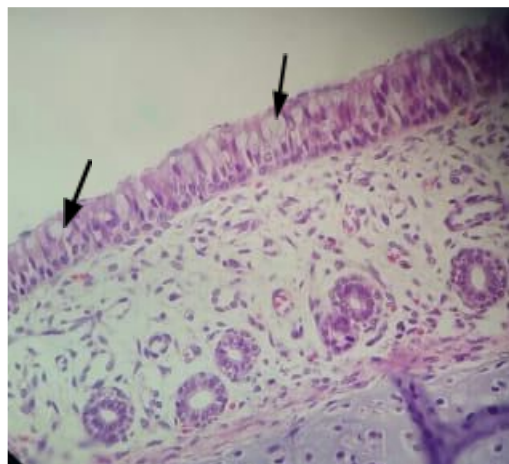


Figura 3. Septo nasal de conejo. H&E 400x. Explante tratado con Lys, conteo de células

caliciformes (flechas)

6.3 Pérdida de cilias:

El porcentaje de pérdida de cilias en el grupo control negativo fue de 2% mientras que en los grupos expuestos a los azúcares se obtuvieron los siguientes porcentajes:

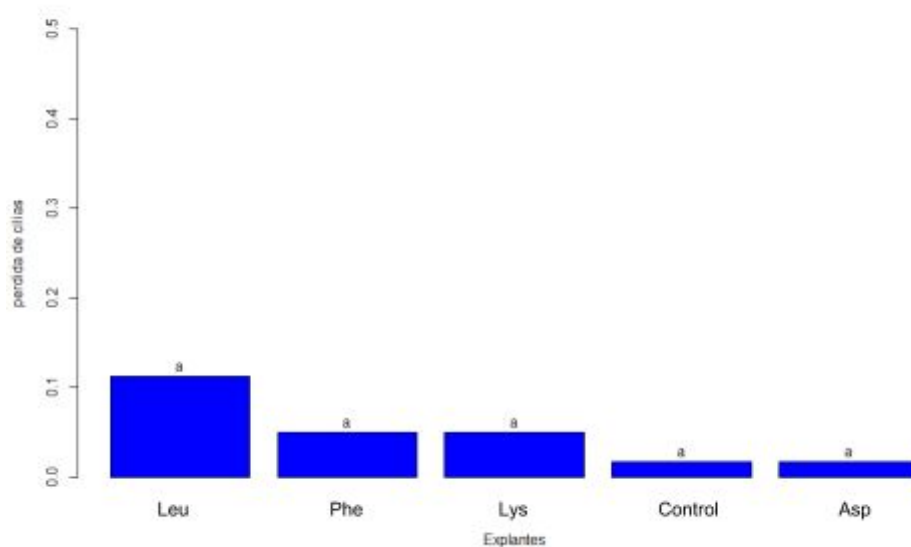
Leu: 11%

Lys: 5%

Phe: 5%

Asp: 2%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos experimentales (gráfica 3).



Gráfica 3. Porcentaje de pérdida de cilias en septos nasales de feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos



Figura 4. Septo nasal de conejo. H&E 400x. Explante tratado con Leu. Regiones con evidencia de pérdida de cilias (flechas)

6.4 Brechas intercelulares:

El porcentaje de brechas intercelulares en el grupo control negativo fue de 5% mientras que en los grupos expuestos a los azúcares se obtuvieron los siguientes porcentajes:

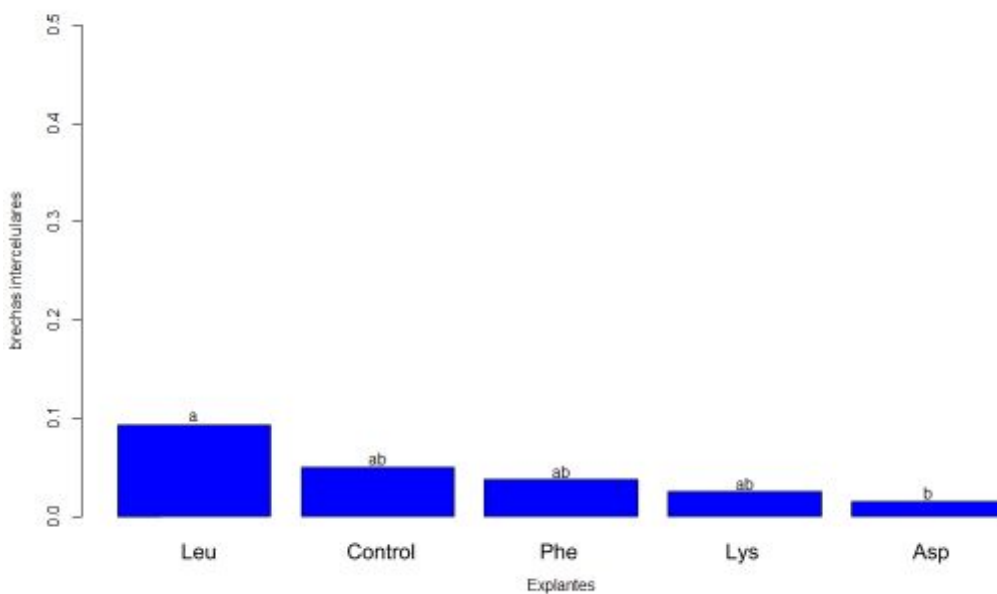
Leu: 9%

Lys: 3%

Phe: 6%

Asp: 2%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos experimentales (gráfica 4).



Gráfica 4. Porcentaje de brechas intercelulares en septos nasales de feto de conejo

tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos

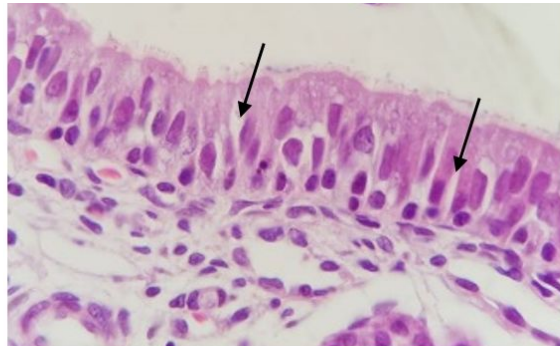


Figura 5. Septo nasal de conejo. H&E 400x. Explante tratado con Leu. Regiones de brechas intercelulares (flechas)

6.5 Vacuolización intracitoplasmática:

El porcentaje de vacuolización intracitoplasmática de las células epiteliales ciliadas en el grupo control negativo fue de 13% mientras que en los grupos expuestos a los azúcares se obtuvieron los siguientes porcentajes:

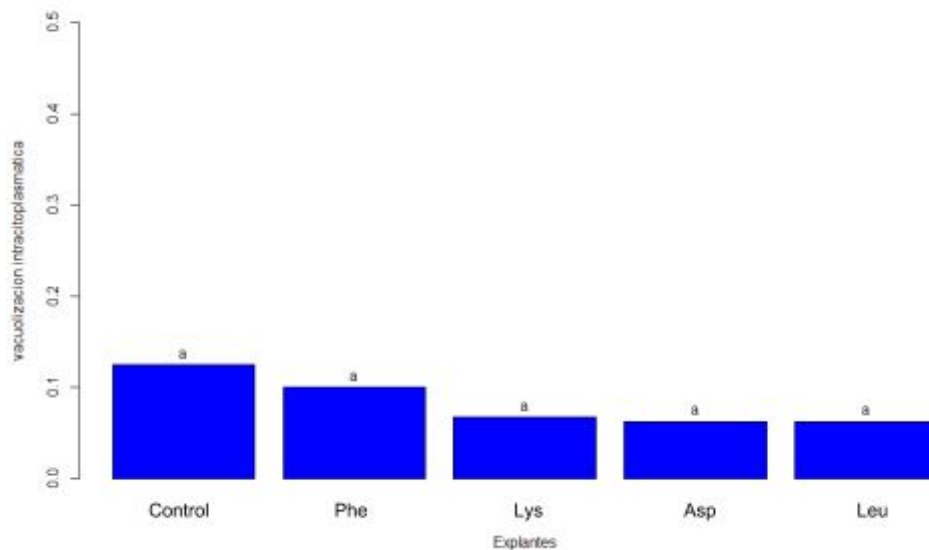
Leu: 6%

Lys: 7%

Phe: 10%

Asp: 6%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos experimentales (gráfica 5).



Gráfica 5. Porcentaje de células con vacuolización citoplasmática en septos nasales de

feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosil aminoácidos

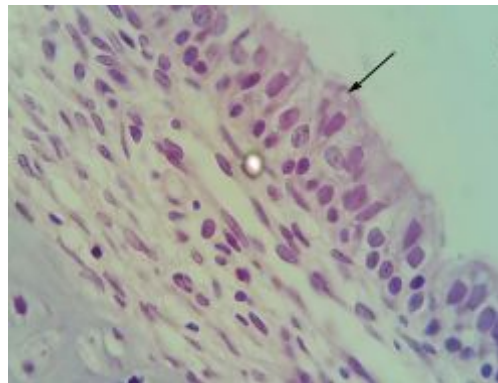


Figura 6. Septo nasal de conejo. H&E 400x. Septo tratado con Phe. Vacuolización intracitoplasmática de las células epiteliales ciliadas (flechas)

6.6 Infiltrado neutrofílico:

El promedio de neutrófilos en el grupo control negativo fue de 4 mientras que en los grupos expuestos a los azúcares se obtuvieron los siguientes promedios:

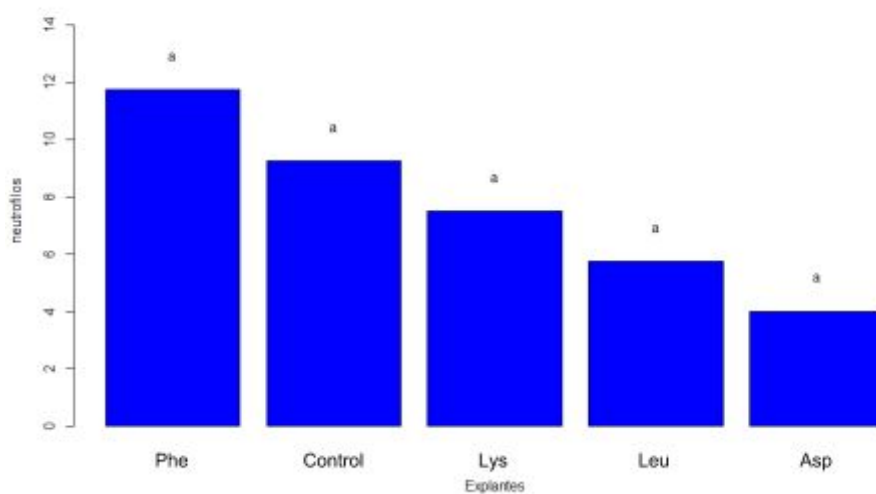
Leu: 5,7

Lys : 7,5

Phe: 9,25

Asp: 11,5

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos experimentales (gráfica 6).



Gráfica 6. Porcentaje de infiltración neutrofílica en septos nasales de feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos

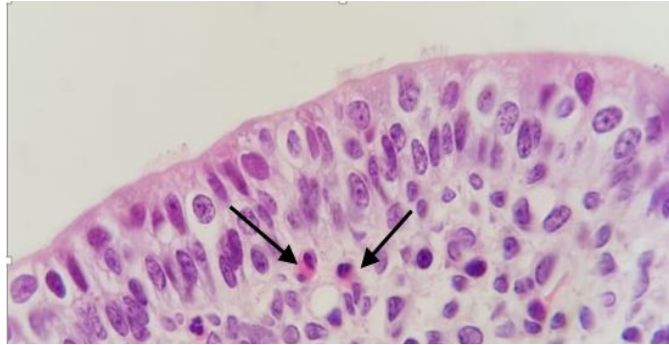


Figura 7. Septo nasal de conejo. H&E 400x. Septo tratado con Asp. Infiltrado neutrofilico (flechas)

6.7 Muerte Celular:

El porcentaje de muerte celular en el grupo control negativo (S13) fue de 1% mientras que en los grupos expuestos a los azúcares se obtuvieron los siguientes porcentajes:

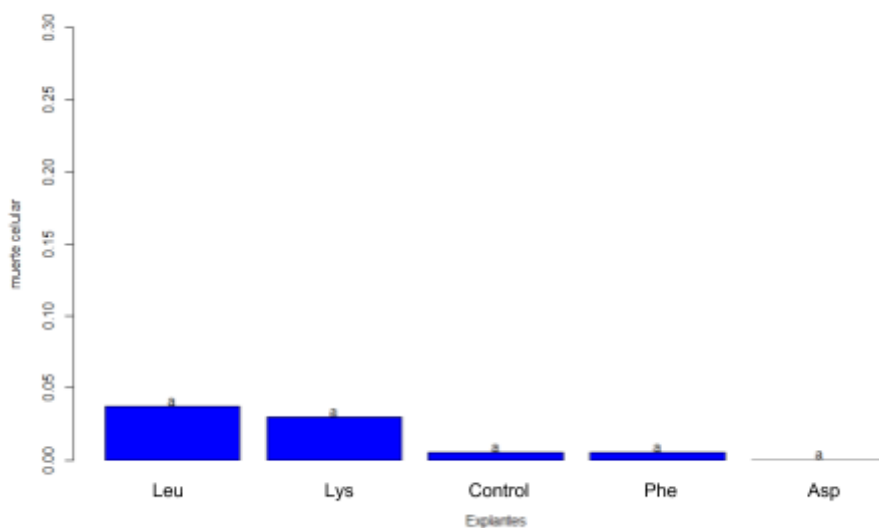
Leu (S7): 4%

Lys (S9): 3%

Phe (S19): 1%

Asp (S24): 0%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos experimentales (gráfica 7).



Gráfica 7. Porcentaje de muerte celular en septos nasales de feto de conejo tratados con cuatro diferentes N glucosilaminocidos

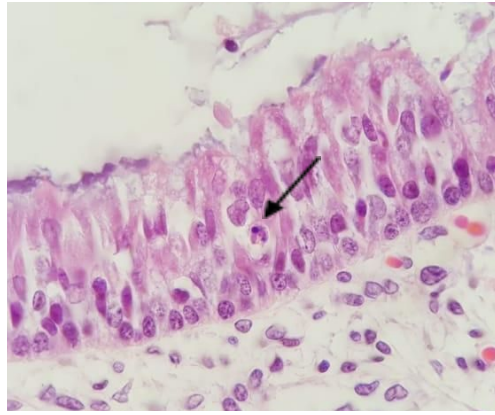


Figura 8. Septo nasal de conejo. H&E 40x. Explante tratado con Leu. Evidencia de muerte celular de una célula epitelial ciliada (flecha)

7. Discusión

Partiendo de que el concepto de inocuidad es entendido como la incapacidad de hacer daño, este estudio confirma la hipótesis central del proyecto en la cual es posible usar estrategias ecológicas para la inhibición de la adherencia bacteriana sobre el epitelio respiratorio empleando sustancias inocuas (N-glucosil aminoácidos) para el hospedero, los patógenos y el ambiente. En este sentido, los glicoconjugados entre aminoácidos e hidratos de carbono pueden ser una interesante aproximación al desarrollo de agentes terapéuticos que permiten inhibir la adherencia bacteriana. Los aminoácidos de glucosil son el glicoconjugante más pequeño y los bloques básicos para glicoconjugados complejos (Pinzón et al., 2017) . De esta forma, se sientan las bases para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas y/o preventivas de las infecciones respiratorias de origen bacteriano y posiblemente viral.

Adicionalmente, cabe resaltar la clasificación de los parámetros de severidad realizada previamente por Romero, en la cual estableció indicadores específicos para cada ítem evaluado que los determinaban como ausente, leve, moderado y severo (Romero, 2012); de acuerdo a esta, se puede afirmar que los datos obtenidos en este estudio para el control negativo presentan hallazgos microscópicos de tipo leve, y a su vez, estos concuerdan con los reportados en estudios previos (Gallego, 2013), esto soporta el análisis de datos en el cual los cuatro tratamientos no demostraron la existencia de diferencias estadísticamente significativas al compararlas con el control negativo, así mismo, cabe mencionar que algunos de los cambios presentados como la pérdida de cilias pueden ser consecuencia de la manipulación del tejido durante el desarrollo del proceso experimental. Por estas razones, se afirma la inocuidad de los N- glucosil aminoácidos sobre el epitelio respiratorio y la posibilidad de su posterior uso sobre este.

Por otra parte se plantea indagar si los N-glucosil aminoácidos estudiados podrían inhibir otros mecanismos de patogenicidad bacteriana como la formación de

biopelículas en experimentación *in vitro* con cultivos bacterianos de *P. multocida* y en cocultivo con *B. bronchiseptica* dado su conocido sinergismo. Estudios previos del grupo de investigación en Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia sugieren una interacción entre *P. multocida* y *B. bronchiseptica* en la cual la señalización celular, posiblemente mediada por moléculas similares a homoserin lactonas, juega un papel fundamental no solo en la adaptación de las bacterias al microambiente de la fosa nasal sino que también puede regular la expresión de algunas moléculas determinantes de virulencia.

Glorioso et al., (1982) en un modelo *in vitro* de monocapas de cultivos de células HeLa y células paraqueratóticas faríngeas habían logrado la inhibición de la adhesión de *P. multocida* A obtenida de conejos a los dos tipos celulares mediante N-acetyl-D-glucosamina, esto llevó a estos autores a sugerir que existen moléculas tipo lectinas sobre la superficie bacteriana, específicamente en las fimbrias, que actuarían como ligandos de la unión a carbohidratos con la configuración NacGlu sobre ambas superficies epiteliales del hospedero (Ruffolo et al., 1997); este papel se le ha atribuido específicamente a la fimbria tipo IV (Hatfaludi et al., 2010; Jacques, 1996). Los hallazgos de Glorioso et al. (1982) coinciden con los de esta investigación, lo que permite proponer que los N-glucosil aminoácidos (Leu, Lys, Phe y Asp) podrían lograr con efectividad inhibir la adherencia de *P. multocida* al epitelio respiratorio.

(Bavington & Page, 2005). Ha descrito en estudios *in vitro* con *Pseudomonas aeruginosa* en los que se encontró que azúcares como la heparina, el dextrán y el dextrán sulfato inhibieron la adherencia de este microorganismo a células epiteliales ciliadas de la línea A549 del tracto respiratorio; con *Burkholderia cenocepacia* y *Legionella pneumophila* se obtuvieron resultados similares utilizando mono-, di- y trisacáridos como GalNAc _ 1-4Gal, GalNAc _ 1-3Gal, Gal _ 1-4GlcNAc and Gal _ 1-3GlcNAc Se propone entonces, que en el modelo *ex vivo*, los N-glucosyl aminoácidos empleados tienen la capacidad de reducir las lesiones microscópicas y que muy probablemente actuarían como receptores homólogos solubles que se unen a la bacteria, bloqueando la adherencia a las células del hospedero

8. Conclusiones

En este estudio se demostró que los septos de conejo tratados de manera individual con cuatro N-glucosil aminoácidos (Leu, Lys, Phe y Asp) no presentaron cambios morfológicos significativos en comparación con el control negativo, inhibiendo casi por completo los mecanismos del epitelio respiratorio ante una potencial injuria.

La ausencia de diferencias estadísticamente significativas con respecto a los ítems evaluados entre el grupo control y los septos expuestos a los N-glucosil aminoácidos de manera individual abren una nueva puerta y confirma su inocuidad en el epitelio respiratorio dando paso a una nueva fase donde se propone explorar más sistemáticamente las propiedades preventivas directas (aplicación directa a los conejos previa a la exposición a los mismos microorganismos) y terapéuticas de estas

sustancias que además alarguen su vida media en un medio tan altamente dinámico como las vías de conducción aérea y la potencialidad de su uso una vez la infección y la enfermedad respiratoria está en su fase clínica. Determinando de esta manera la dosis adecuada para cada caso.

Es posible que la instilación nasal e intratraqueal de la mezcla de estos N-glucosyl aminoácidos tenga efectos preventivos frente a la bacteria. Estudios posteriores deberán apuntar al desarrollo de glicoconjugados más estables con efecto más prolongado y de aplicación inmediata a los animales, que además de evaluar su capacidad preventiva de forma directa frente al patógeno se pueda indagar también por un posible efecto terapéutico en la infección por *P. multocida*.

9. Referencias bibliográficas

Abraham, S. N., Bishop, B. L., Sharon, N., & Ofek, I. (2005). Adhesion of bacteria to mucosal surfaces. *Mucosal Immunology, Two-Volume Set*, 35-48.

Adam, E. C., Holgate, S. T., Fildew, C. J., & Lackie, P. M. (2003). Role of carbohydrates in repair of human respiratory epithelium using an in vitro model. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 33(10), 1398–404. Retrieved from

Alberts B, Dennis B, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 3 ed. Publishing. New York. 1994.

Al-Haddawi, M. H., Jasni, S., Israf, D. A., Zamri-Saad, M., Mutalib, A. R., & Sheikh-Omar, A. R. (2001). Ultrastructural pathology of nasal and tracheal mucosa of rabbits experimentally infected with *Pasteurella multocida* serotype D:1. *Research in Veterinary Science*, 70(3), 191–197.

Ataei, S., Burchmore, R., Christopher Hodgson, J., Finucane, A., Parton, R., & Coote, J. G. (2009). Identification of immunogenic proteins associated with protection against haemorrhagic septicaemia after vaccination of calves with a live-attenuated *aroA* derivative of *Pasteurella multocida* B:2. *Research in Veterinary Science*, 87(2), 207–210.

Bavington C, Page C. Stopping Bacterial Adhesion: A Novel Approach to treating Infections. *Respiration*. 2005; 72:335-344.

Botero L.; Iregui C. (1999). Caracterización de la interrelación entre la *Pasteurella multocida* y la *Bordetella bronchiseptica* con células epiteliales de la cavidad nasal y nasofaríngea durante el síndrome de neumonía enzootica de los conejos. *Revista de Medicina Veterinaria Y Zootecnia*, 21–30.

Carrillo, M. P., Martinez, N. M., Patiño, M. D. P., & Iregui, C. A. (2015). Inhibition of *Pasteurella multocida* adhesion to rabbit respiratory epithelium using lectins. *Veterinary Medicine International*, 2015.

Dabo, S. M., Confer, A., Montelongo, M., York, P., & Wyckoff, J. H. (2008). Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant OmpA induces strong but non-protective and deleterious Th2-type immune response in mice. *Vaccine*, 26(34), 4345–4351.

Dagleish, M. P., Finlayson, J., Bayne, C., MacDonald, S., Sales, J., & Hodgson, J. C. (2010). Characterization and time course of pulmonary lesions in calves after intratracheal infection with *Pasteurella multocida* A:3. *Journal of Comparative Pathology*, 142(2–3), 157–169.

Dennis JW, Granovsky M. and Warren C.E. Glycoprotein, glycosilation and cancer progression. *Biochem. Bioph. Acta* 1473, 21-34, 1999

Dziva, F., Muhairwa, A. P., Bisgaard, M., & Christensen, H. (2008). Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 128(1–2), 1–22.

Esquinas, P., Botero, L., Patiño, M. D. P., Gallego, C., & Iregui, C. (2013). Ultrastructural comparison of the nasal epithelia of healthy and naturally affected rabbits with *Pasteurella multocida* A. *Veterinary Medicine International*, 2013

Gallego, C., Romero, S., Esquinas, P., Patiño, P., Martínez, N., & Iregui, C. (2017). Assessment of *Pasteurella multocida* A Lipopolysaccharide, as an Adhesin in an In Vitro Model of Rabbit Respiratory Epithelium, 2017.

Gallego, C., Middleton, A. M., Martínez, N., Romero, S., & Iregui, C. (2013). Interaction of *Bordetella bronchiseptica* and its lipopolysaccharide with in vitro culture of respiratory nasal epithelium. *Veterinary Medicine international*, 2013.

Glorioso, J., Jones, G., Rush, H., Pentler, L., Darif, C. and Coward, J. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal Cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. *Infect Immun*: 35: 1103-1109, 1982.

Harper, M., Cox, A. D., Adler, B., & Boyce, J. D. (2011). *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide: The long and the short of it. *Veterinary Microbiology*, 153(1–2), 109–115.

Hatfaludi, T., Al-Hasani, K., Boyce, J. D., & Adler, B. (2010). Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 144(1–2), 1–17.

Jacques, M. (1996). Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends in Microbiology*, 4(10), 408–410.

Jordan, R. W., & Roe, J. M. (2004). An experimental mouse model of progressive atrophic rhinitis of swine. *Veterinary Microbiology*, 103(3), 201–207.

- Jaramillo, J., Díaz, F., Hernández, P., Debray, H., Trigo, F., Mendoza, G. y Zenteno, E. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiology* 10:31-37. 2000.
- Kulkarni, A. ., Weiss, A. ., & Iyer, S. (2010). Glycan-Based High-Affinity Ligands for Toxins and Pathogen Receptors. *Medicinal Research Reviews*, 30(2), 327–393
- Lane, J. A., Mehra, R. K., Carrington, S. D., & Hickey, R. M. (2010). The food glycome: A source of protection against pathogen colonization in the gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1–2), 1–13.
- Lennox, A. M., & Kelleher, S. (2009). Bacterial and Parasitic Diseases of Rabbits. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 12(3), 519–530.
- Mendiburu (2017). *agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-8. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Pinzón, S., Fierro, R., Iregui, C., Rivera, Z., & Javier García. (2017). Novel Synthesis of unprotected N-glucosyl amino acids. *Molecules*, 22, 1–11.
- Pistole, T. (1981). Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances. *Annual Review of Microbiology*, 35, 85–111.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Romero, C. S. (2010). Exposición simultánea y secuencial al lipopolisacárido de *Pasteurella multocida* y a la bacteria en cultivos de fosa nasal de conejo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
- Ruffolo, C. G., Tennent, J. M., Michalski, W. P., & Adler, B. (1997). Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*, 65(1), 339–343