



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Caracterización de adhesinas de
*Actinobacillus seminis***

Tesis para obtener el título de
Bióloga

Presenta:

Delil Andrea Chincoya Martínez

Director de Tesis

Dr. Sergio Vaca Pacheco



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Trabajo realizado con el apoyo de
DGAPA-UNAM, Proyecto PAPIIT
IN215616

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1 <i>Actinobacillus seminis</i> : agente etiológico de la epididimitis ovina.....	5
2.2 Adhesinas y su importancia durante la colonización y desarrollo infeccioso.....	6
2.3 Adhesinas no típicas.....	7
3. ANTECEDENTES.....	8
4. JUSTIFICACIÓN.....	9
5. OBJETIVOS.....	10
5.1 Objetivo general.....	10
5.2 Objetivos particulares.....	10
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
6.1 Cepa y condiciones de crecimiento.....	10
6.2 Obtención de proteínas de superficie bacteriana.....	11
6.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE).....	11
6.4 Western blot.....	11
6.5 Cromatografía de intercambio aniónico.....	12
6.6 Análisis MALDI-TOF.....	12
6.7 Microscopía electrónica de transmisión.....	12
7. RESULTADOS.....	13
8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....	21
9. CONCLUSIONES.....	23
10. PERSPECTIVAS.....	23
11. BIBLIOGRAFÍA.....	24

1. RESUMEN

La epididimitis ovina es una enfermedad infecciosa que ocasiona atrofas en los testículos y el epidídimo de carneros, provocando una disminución de su fertilidad y/o esterilidad, generando pérdidas económicas en el sector ganadero. Los mecanismos de virulencia expresados por *Actinobacillus seminis*, uno de los agentes etiológicos de la epididimitis ovina, son desconocidos, en particular lo relacionado con la adherencia, evento que es imprescindible para el establecimiento del organismo en el hospedero y la expresión de otros factores de virulencia suyos. Este trabajo tuvo como objetivo identificar posibles adhesinas de *A. seminis*. Para ello, la cepa de referencia de *A. seminis* ATCC 15768 fue crecida en diversos medios de cultivo con el fin de que expresara proteínas que pudiesen actuar como adhesinas. Las proteínas de la superficie bacteriana fueron liberadas mediante su paso por aguja de insulina y posteriormente concentradas por precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las muestras se separaron electroforéticamente y se les realizó Western Blot. Se identificaron 2 proteínas; de 25 y 37 kDa. Ambas son reconocidas por suero de borrego con epididimitis, lo que sugiere un potencial inmunogénico, y por sueros generados contra distintas adhesinas expresadas por otros microorganismos. De acuerdo al análisis MALDI-TOF, la proteína de 25 kDa, que fue purificada mediante cromatografía de intercambio aniónico, presenta identidad con fosfoglicerato mutasa (PGAM) de *Pasteurella multocida* mientras que la de 37 kDa guarda identidad con el factor de elongación termoinestable (EF-Tu) de *Actinobacillus suis*. Trabajos de investigación realizados con diversos microorganismos indican que ambas proteínas, consideradas típicamente citoplásmicas, son en realidad multifuncionales, y ubicuas, siendo la adhesión una de sus funciones cuando son expresadas en la superficie celular, por lo que podrían ejercer funciones adhesivas en *A. seminis*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. *Actinobacillus seminis*: agente etiológico de la epididimitis ovina

La epididimitis ovina es una enfermedad infecciosa causante de atrofas en los testículos y el epidídimo de carneros. La patología disminuye su fertilidad y, en casos más severos, provoca esterilidad (Gouletsou, 2015). La reducción de la eficiencia reproductiva de los sementales conduce a pérdidas económicas del sector pecuario, debido a que disminuye el número de corderos comercializados por año: el principal determinante de la rentabilidad de la industria ovina (Partida *et al.*, 2013).

Uno de los microorganismos que pueden ocasionar epididimitis ovina es *Actinobacillus seminis*, reportado por primera vez en 1960 (Baynes y Simmons, 1960). Se trata de un cocobacilo Gram-negativo de aproximadamente 4 μM de longitud, no móvil y no esporulado perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* (Al-Katib y Dennis, 2009). *A. seminis* no fermenta azúcares, no hidroliza urea y es oxidasa positivo (Scanlan *et al.*, 1989).

La mayoría de los autores coincide en que *A. seminis* es un microorganismo oportunista; forma parte de la microbiota normal de la cavidad prepucial, sin embargo, bajo condiciones favorables, puede ascender por el tracto genital ovino y colonizar sus partes más profundas, desencadenando procesos patológicos (Moustacas *et al.*, 2014).

La transmisión del microorganismo ocurre por vía venérea; sin embargo, debido a que *A. seminis* ha sido aislado de borregos sin apareamientos previos, la transmisión puede darse de forma no venérea. El mecanismo más aceptado, que explica una vía alterna de transmisión, sugiere que las ovejas infectadas actúan como intermediarias al contaminar a los corderos durante el parto (Burgess, 1982; Al-Katib y Dennis, 2009)

2.2. Adhesinas y su importancia durante la colonización y desarrollo infeccioso.

La patogenicidad de un microorganismo está determinada, inicialmente, por su capacidad de colonizar la superficie epitelial; de esta manera, la bacteria podrá obtener nutrientes tanto de las células epiteliales como del ambiente circundante, reproducirse, evadir al sistema inmune y expresar otros factores de virulencia (Arp, 1988 y Abraham *et al.*, 2015). Teóricamente, la inhabilitación de una bacteria patógena para unirse al tejido epitelial del hospedero es suficiente para convertirla en una cepa no virulenta (Klemm y Schembri, 2000).

Las adhesinas son responsables del reconocimiento y unión específica a los receptores del hospedero (Gerlach y Hensel, 2007). La mayoría de los patógenos bacterianos tiene la capacidad de expresar múltiples adhesinas de forma diferencial durante las etapas del desarrollo infeccioso (Klemm y Schembri, 2000). A continuación se exponen algunos eventos en los que las adhesinas desempeñan un papel fundamental.

Las adhesinas pueden participar en la evasión del sistema inmune: la entrada al fagocito es dirigida por la interacción de la célula con adhesinas bacterianas, como la hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* (Ishibashi *et al.*, 1994). Las bacterias han evolucionado mecanismos que evitan la acción degradadora de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, por lo que la fagocitosis no siempre conduce a la muerte bacteriana, sino que puede convertirse en un factor de virulencia más, permitiendo a la bacteria diseminarse a otros sitios y ocultarse de la acción del sistema inmune o de antibióticos (Kline *et al.*, 2009).

Los patógenos intracelulares también pueden utilizar las adhesinas como invasinas y entrar a células no fagocíticas. Este evento le permite a un microorganismo evadir los sistemas defensivos del hospedero y le confiere la capacidad de traspasar barreras celulares, como el epitelio intestinal o la barrera hematoencefálica (Finlay y Cossart, 1997).

La expresión de otros factores de virulencia puede ser dependiente de procesos adhesivos (Abraham *et al.*, 2015). Por ejemplo, la activación de los mecanismos de captación de hierro en *Escherichia coli* requiere que la adhesina fimbrial PapG se encuentre unida a su receptor (Zhang y Normark, 1996).

2.3. Adhesinas no típicas.

Las fimbriae son las adhesinas mejor descritas, se trata de filamentos proteicos anclados a la membrana y compuestos por cientos o miles de subunidades que median la adhesión con los receptores en la célula huésped (Gerlach y Hensel, 2007). Sin embargo, en las últimas décadas se ha reunido evidencia sobre proteínas constitutivas, clásicamente citoplásmicas, que pueden ser expresadas en la superficie celular o liberadas al medio, y desempeñar múltiples funciones, incluyendo aquellas involucradas en la adhesión e interacción con los componentes de la matriz extracelular del hospedero. Dentro de este grupo de proteínas multifuncionales se encuentran enzimas metabólicas, particularmente las enzimas glucolíticas, y factores de elongación (Pancholi y Chhatwal, 2003, Henderson y Martin, 2011 y Balasubramanian *et al.*, 2008).

En cuanto a enzimas glucolíticas multifuncionales, se ha reportado, por ejemplo, que la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa de *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus* une plasmina y transferrina (Modun y Williams, 1999 y Modun *et al.*, 2000). La fosfoglicerato mutasa de *Mycoplasma pneumoniae* tiene la capacidad de unir plasminógeno (Gründel *et al.*, 2016), mientras que en *Streptococcus suis* además de unir plasminógeno interacciona con colágeno tipo I (Zhang *et al.*, 2014). La enolasa de *Streptococcus pneumoniae* desempeña un papel fundamental en la unión de plasminógeno por este microorganismo (Bergmann *et al.*, 2001).

En la década de 1970 se descubrió que el factor de elongación termoinestable (EF-Tu) podía desempeñar múltiples funciones (Beck *et al.*, 1978). Actualmente se sabe que EF-tu es expresado en la superficie celular de algunos microorganismos

e interactúa con componentes de la matriz extracelular. La proteína EF-Tu de *Streptococcus suis* interacciona con fibronectina y laminina (Li *et al.*, 2015), mientras que EF-Tu de *Mycobacterium avium* tiene la capacidad de adherirse a fibronectina, por lo que se le considera un factor relevante en la unión e internalización a la célula del huésped (Viale *et al.*, 2014).

La matriz extracelular está compuesta por proteínas fibrosas (colágeno y elastina) y glucoproteínas; como fibrinógeno, fibronectina, y laminina, con complejas interacciones entre sí, que a su vez participan en la señalización celular y la comunicación con células adyacentes (Kim *et al.*, 2011). La adhesión e interacción de proteínas bacterianas con componentes de matriz extracelular modifica la respuesta del hospedero y puede favorecer la invasión a la célula (Westerlund y Korhonen, 1993).

3. ANTECEDENTES

A continuación se mencionan algunos antecedentes relativos a posibles factores de virulencia reportados en *A. seminis*:

Healey *et al.*, demostraron en 1991 que la cepa de campo As8c de *A. seminis* tiene la capacidad de adherirse a células epiteliales y dicha adhesión puede ser inhibida pretratando las células bacterianas con antisuero generado contra la cepa. En este estudio no identificaron las proteínas que estuviesen involucradas en la adhesión de *A. seminis*.

Schaller *et al.*, encontraron en el 2000 que *A. seminis* no tiene genes que codifiquen para las toxinas RTX: Apx I, Apx II ni Apx III. Sin embargo, proteínas entre 80 y 100 kDa presentaron reacción cruzada con antisueros generados contra las toxinas Apx de *A. pleuropneumoniae*, lo que sugirió la presencia de otros tipos de toxinas RTX en *A. seminis*.

Núñez del Arco *et al.*, reportaron en 2006 la presencia de una proteína de 75 kDa inmunogénica y aparentemente específica de *A. seminis*, dado que no es reconocida por antisueros generados contra células completas de otras bacterias causantes de epididimitis ovina (*Brucella ovis*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* y *Pasteurella multocida*). Dicha proteína se aisló de membrana externa y microvesículas liberadas al medio.

De la Cruz, identificó en 2015 una metaloproteasa de peso variable (75-100 kDa) con capacidad de degradar IgG y fibrinógeno, que fue inhibida por EDTA. Su actividad proteolítica disminuyó a partir de 60° C y se inhibió completamente a los 70° C; su pH óptimo se encontró entre 6 y 7. Fue reconocida por un antisuero generado contra proteasa de *A. pleuropneumoniae*.

4. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de los posibles factores de virulencia de *A. seminis* es escaso, en particular aquellos involucrados en la adhesión a las células del huésped; suceso fundamental para el establecimiento del organismo y el desarrollo del proceso patológico. Esta tesis tuvo como objetivo determinar la presencia de proteínas involucradas en la adhesión de *A. seminis*.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general:

- Caracterizar proteínas con funciones adhesivas en *A. seminis*.

5.2. Objetivos particulares:

- Identificar proteínas inmunogénicas de *A. seminis* que sean reconocidas por antisueros generados contra adhesinas de otros microorganismos.
- Analizar mediante MALDI-TOF las posibles adhesinas de *A. seminis*.
- Purificar las posibles adhesinas de *A. seminis*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepa y condiciones de crecimiento.

Se utilizó *A. seminis* ATCC 15768 cultivado en agar sangre (5% de sangre de ovino), caldo Infusión de cerebro y corazón (BHI), BHI suplementado con 1% de sangre de carnero y caldo soya tripticaseína (TSB). Las placas y el cultivo en caldo se incubaron a 37°C durante 72 h. Para la observación de adhesinas al microscopio electrónico se utilizó la cepa de campo A4.

6.2. Obtención de proteínas de superficie bacteriana.

Se siguió el protocolo de Salgado *et al.*, 2012 con modificaciones. A partir de los cultivos en agar o caldo, las bacterias se cosecharon y se resuspendieron en PBS (formulación) 1X. La suspensión bacteriana se pasó tres veces por una aguja de insulina para desprender las proteínas de superficie. La muestra se centrifugó a 5000 rpm por 30 minutos para separar las células bacterianas y, cuando el sobrenadante estuvo transparente, se precipitó con polietilenglicol (PEG) 8000 al 6% o se realizó una precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 20, 50 y 75 % de saturación (para ello al sobrenadante se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se mantuvo a 4° C durante 24 h para que precipitaran las proteínas). Posteriormente se centrifugo a 14000 rpm por 5 minutos para recuperar las proteínas precipitadas. Al sobrenadante se le agregó la cantidad suficiente de sal para alcanzar la siguiente concentración. Las pastillas resultantes se resuspendieron en PBS 1X.

6.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE).

La muestra proteica se preparó con buffer de muestra 6X y 2-mercaptoetanol (6%), posteriormente se separó mediante electroforesis en gel SDS PAGE al 12 o 15 %. El gel se tiñó con Azul de Coomassie R-250 (Jiménez *et al.*, 2008).

6.4. Western blot.

Las proteínas separadas por electroforesis SDS PAGE 15% se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante una hora a 300mA (Núñez *et al.*, 2006), posteriormente se expusieron a distintos antisueros: anti-*A. seminis* (suero de conejos inmunizados), suero BE (suero de borregos con signos clínicos de epididimitis), anti-Hemaglutinina de *Gallibacterium anatis* (anti-HA) (Montes García *et al.*, 2016), anti->15 kDa de *G. anatis* y anti 37 kDa de *G. anatis* (Salgado Lucio *et al.*, 2012), anti-LpFA de *Escherichia coli* y anti-BFP de *E. coli*, así como fibrinógeno biotinilado. Como anticuerpos secundarios se emplearon IgG anti-conejo, anti-borrego o anti-rata (dependiendo del animal en que fue generado el

anticuerpo primario) marcados con peroxidasa; o avidina peroxidada para reconocer la biotina unida a fibrinógeno.

6.5. Cromatografía de intercambio aniónico.

Se adoptó la metodología propuesta por Montes *et al.*, 2016 con modificaciones. Se utilizó una columna de DEAE celulosa, la cual se equilibró con PBS urea 2 M. Posteriormente se agregó la muestra suspendida en el mismo buffer y se lavó la fracción no unida a la resina con 5 volúmenes de PBS urea 2 M. La elución se realizó con 10 ml de las soluciones: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M de NaCl disuelto en PBS urea 2 M. Se colectaron las fracciones, se precipitaron con dos volúmenes de metanol y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 minutos. El patrón proteico fue visualizado en un gel SDS PAGE 12 %.

6.6. Análisis MALDI-TOF.

Para determinar la identidad de las posibles adhesinas expresadas por *A. seminis*, las proteínas de interés fueron sometidas a digestión enzimática y analizadas por espectrometría de masas de acuerdo a como se describió previamente (Negrete Abascal *et al.*, 2009).

6.7. Microscopia electrónica de transmisión

Las células bacterianas del aislado de campo A4 fueron colocadas en rejillas de cobre y teñidas con ácido fosfotúngstico al 1% para ser observadas al microscopio electrónico de transmisión (Negrete *et al.*, 2003).

7. RESULTADOS

El patrón de las proteínas de superficie bacteriana de *A. seminis* es dependiente del medio donde crece la bacteria (Figura 1). La suplementación de los medios con sangre favorece la expresión de proteínas, sin embargo, también constituye una fuente de contaminación que dificulta la identificación y purificación de proteínas de interés. Por ejemplo, la proteína de 13 kDa, que es muy abundante en muestras provenientes de cultivo en agar sangre (Figura 1, AS) al ser analizada por MALDI-TOF resultó ser un fragmento de hemoglobina. Por lo tanto, los experimentos fueron realizados en caldos sin sangre.

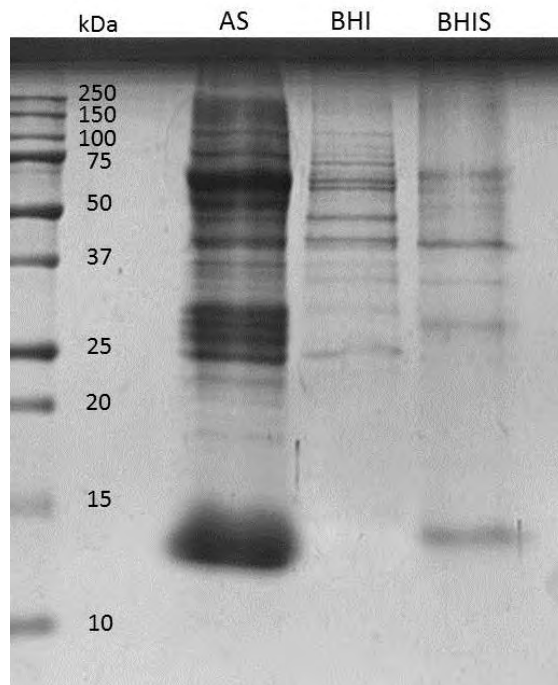


FIGURA 1. SDS-PAGE al 15% donde se muestran las proteínas de superficie bacteriana de *A. seminis* cultivado en diferentes medios: Agar sangre (AS), Infusión Cerebro Corazón (BHI) e Infusión Cerebro corazón suplementada con sangre (BHIS). Precipitación con PEG al 6%.

En la figura 2 se observan los patrones proteicos correspondientes a la precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En las 3 fracciones es posible observar una proteína de 25 kDa, que es más abundante en el precipitado con 20 % de saturación.

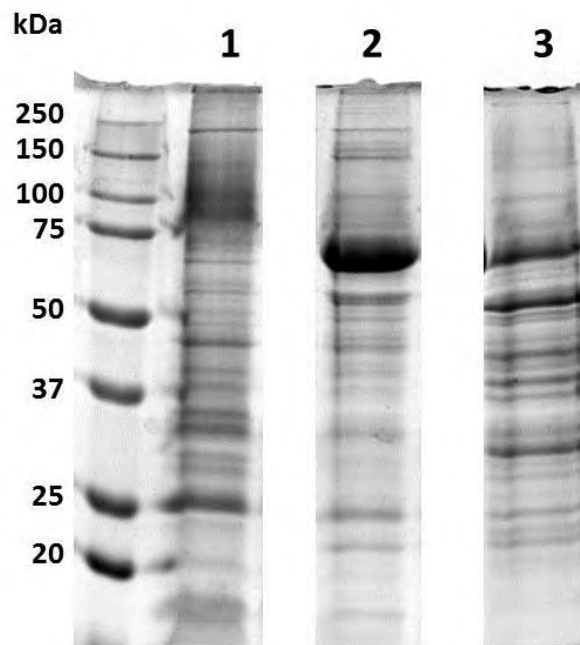


FIGURA 2. SDS-PAGE 12%. Proteínas de superficie de *A. seminis* provenientes de caldo BHI (cultivo de 48 h en agitación), precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 20 (carril 1), 50 (carril 2) y 75% (carril 3) de saturación.

Se utilizaron distintos antisueros para identificar aquellas proteínas antigénicas que pudiesen estar relacionadas con adhesinas expresadas por otros microorganismos. Una banda de 25 kDa, proveniente de bacterias crecidas en caldos BHI (cultivo estático de 72 h) (Figura 3) y TSB (Figura 4) fue reconocida por suero BE, anti-*A. seminis*, anti-37 kDa y anti-BFP. Mientras que una proteína de 37 kDa, obtenida de cultivos en caldo TSB (cultivo estático de 72 h), tuvo reconocimiento con suero BE, anti->15 kDa, anti-LpFA, anti-HA y anti-BFP (Figura 4).

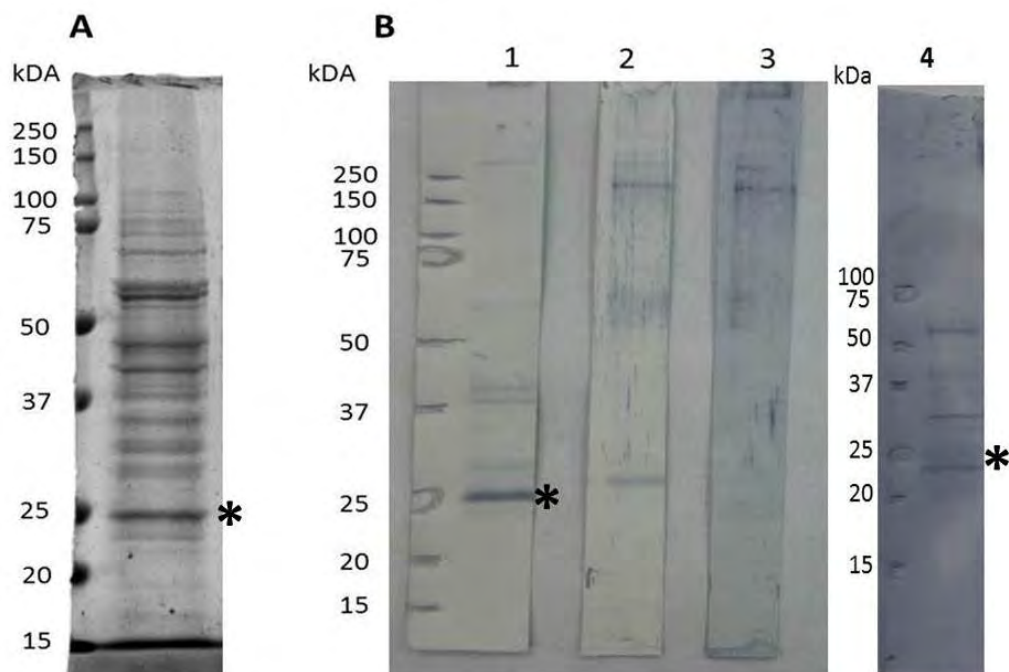


FIGURA 3. SDS-PAGE 12% y Western Blot. A: proteínas de superficie bacteriana de *A. seminis* crecido en caldo BHI, precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 20% de saturación. B: inmunoreconocimiento con distintos antisueros: anti-*A. seminis* (1), anti-15kDa (2), reconocimiento con fibrinógeno biotinilado (3) y suero-BE (4).

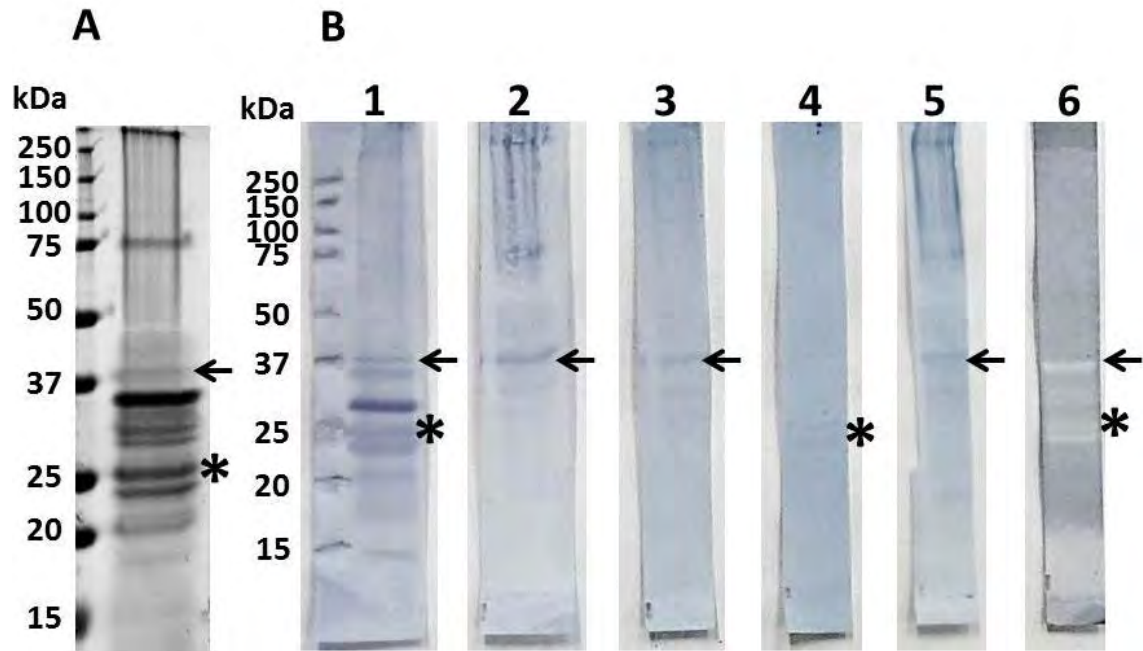


FIGURA 4. A: SDS-PAGE 12 % Proteínas de superficie de *A. seminis* provenientes de cultivo en caldo TSB y precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% de saturación. B: Western Blot utilizando suero BE (1), anti->15 kDa (2), anti-LpFA (3), anti-37 kDa (4), anti-HA (5) y anti-BFP (6). Proteína de 25 kDa indicada con asteriscos, banda de 37 kDa marcada con flechas.

Utilizando una columna de DEAE-celulosa se realizó una cromatografía de intercambio aniónico de las proteínas de superficie bacteriana provenientes de un cultivo de *A. seminis* en caldo TSB (Figura 5).

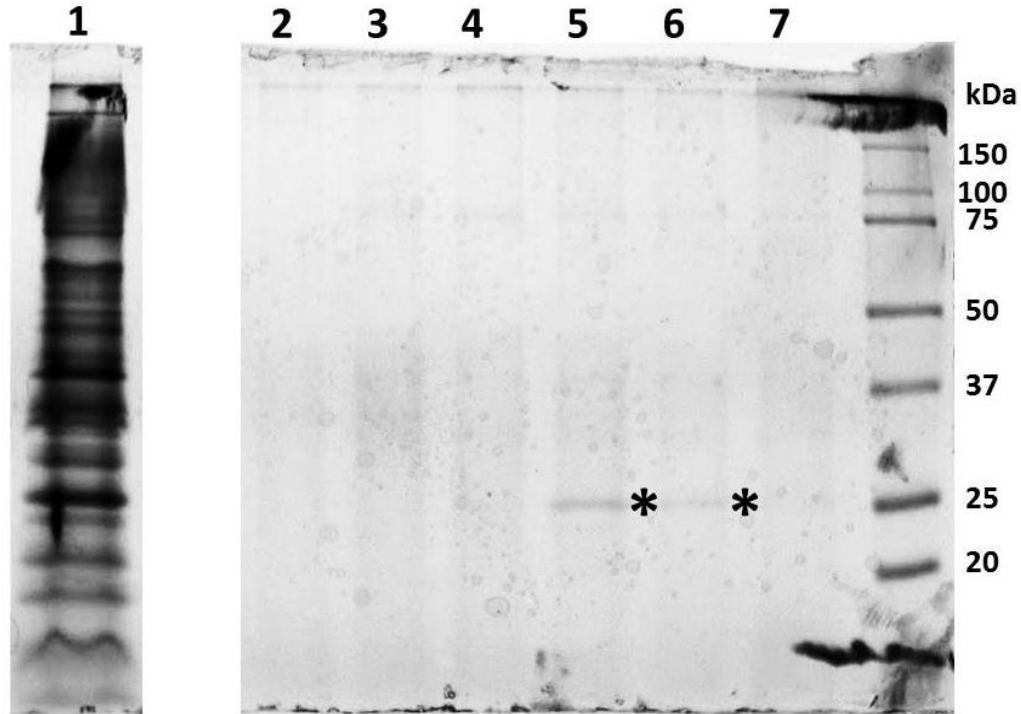


FIGURA 5. SDS –PAGE 12%. Proteínas de membrana purificadas por cromatografía de DEAE celulosa. Muestra aplicada a la columna (1). Fracciones eluidas con NaCl: 0.1 M (2), 0.2 M (3), 0.4 M (4), 0.6 M (5), 0.8 M (6) y 1 M (7). Proteína de 25 kDa marcada con asteriscos.

En dos de las fracciones eluidas con NaCl de la columna (0.6 y 0.8 M) se obtuvo la proteína de 25 kDa purificada (Figura 5); ambas fracciones fueron concentradas, al introducirlas en membranas de diálisis colocadas sobre sacarosa, para posteriormente realizar un inmunoreconocimiento. La banda fue reconocida por suero BE, anti-*A.seminis* de conejo, anti-BFP (Figura 6).

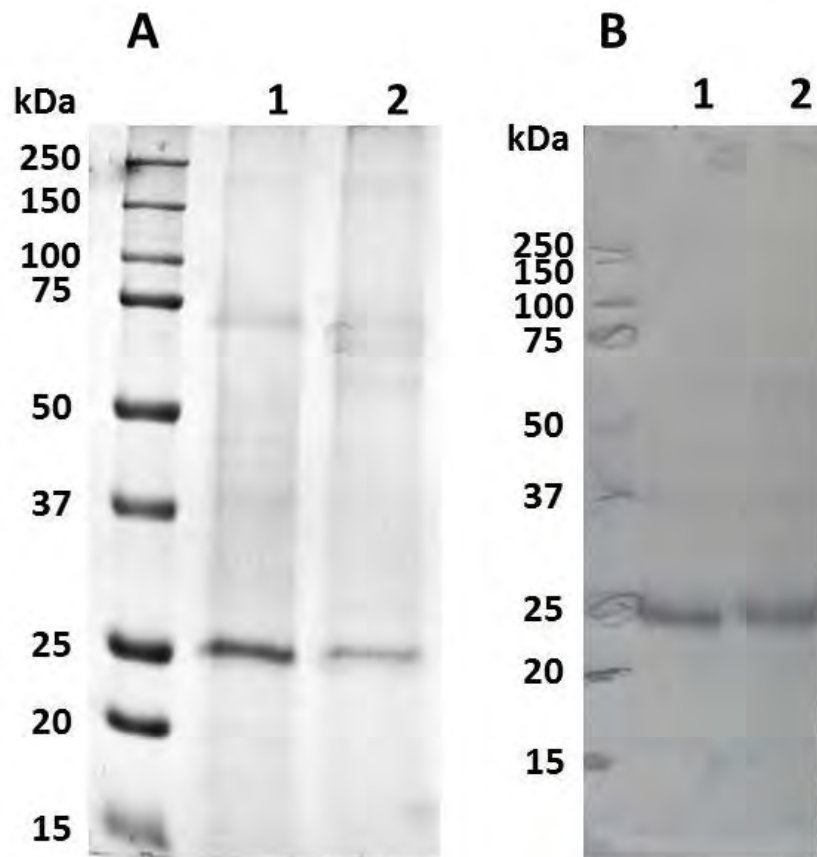


FIGURA 6. A: SDS –PAGE 12%. Proteína de 25 kDa purificada por cromatografía DEAE celulosa, muestras provenientes de elusión con NaCl 0.6 M (carril 1) y 0.8 M (carril 2). B: inmunoreconocimiento de la proteína purificada utilizando suero anti-*A. seminis*.

Las proteínas de 25 y 37 kDa fueron analizadas por MALDI-TOF, encontrándose que la primera presenta identidad con fosfoglicerato mutasa (PGAM) de *Pasteurella multocida* (Figura 7). Mientras que la proteína de 37 kDa guarda identidad con el factor de elongación termoinestable (EF-Tu) de *Actinobacillus suis*. (Figura 8).

```
MELVFIRHGFSEWNAKNLFTGWRDVNLTERGIEEASAGKKL
LEAGFEFDIAFTSVLTRAIKTCNIVLEESNQLWIPOVKNWR
LNERHYGALQGLDKKATAEQYGDEQVHIWRRSYDISPPDL
PQDPHSAHNDRRY AHLPSDVVPDAENLKITLERVLPFWEDQ
IAPALLAGKRVLVTAHGNSLRALAKHIEGISDADIMDLEIP
TGQPLVYKLDDNLKVVEKYYL
```

FIGURA 7. Secuencias de péptidos de la proteína de 25 kDa (en rojo) identificados por MALDI-TOF que presentan identidad con PGAM de *P. multocida*.

```
MSKEKFERTKPHVNVGTIGHVDHGKTTLTAAITTVLAKHFGGAARAFDQIDNAPEEKA
RGITINTSHVEYDTETRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVVAATDGPMPQT
REHILLGRQVGVPIIIVFLNKCDMVDDEELLELVEMEVRELLSQYDFPGDDTPIVRGS
ALQALNGVAEWEKILELANHLDTYIPEPERAIDKPFLLPIEDVFSISGRGTVVTGRV
ERGI IKS GEEVEIVGIKETTKTTVTGVEMFRKLLDEGRAGENVGALLRGTKREEIERG
QVLAKPGTITPHTDFESEVYVLSKEEGGRHTPFFKGYRPQFYFRTTDVTGTIELPEGV
EMVMPGDNIKMTVSLIHPIAMDEGLRFAIREGGRTVGAGVVAKI IK
```

FIGURA 8. Secuencias peptídicas de la proteína de 37 kDa (indicadas con rojo) identificadas por MALDI-TOF que presentan identidad con EF-Tu de *Actinobacillus suis*.

En la figura 9 se muestra la imagen obtenida mediante microscopía electrónica de la superficie de *A. seminis* A4. Se pueden observar filamentos proteicos que corresponden a adhesinas fimbriales que, sin embargo, no pudieron ser caracterizadas mediante las metodologías empleadas.

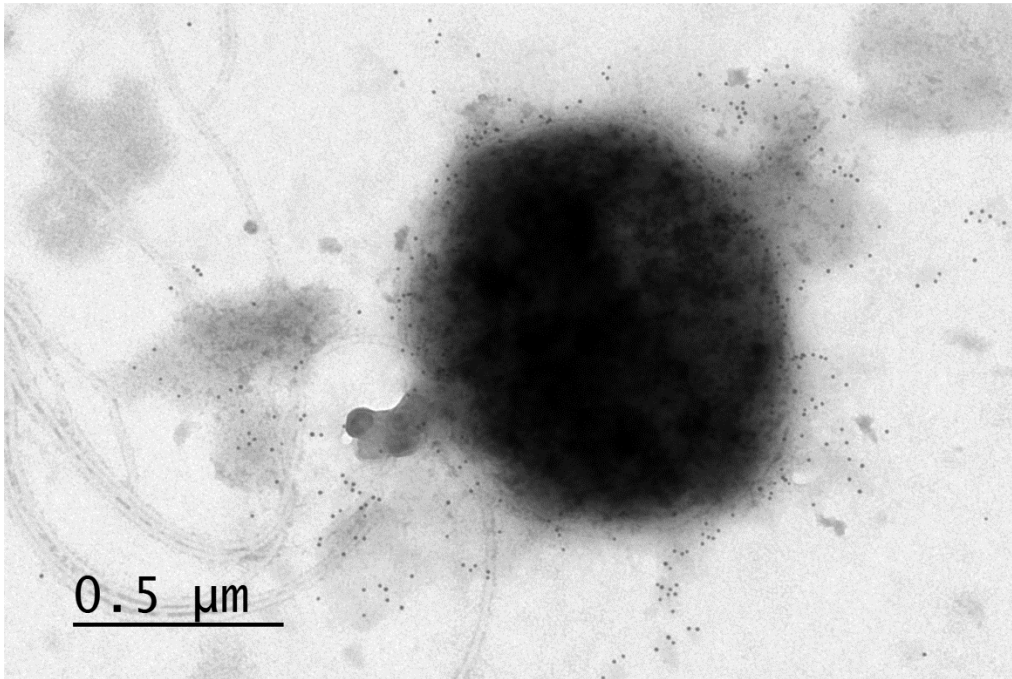


Figura 9. *A. seminis* observado mediante microscopía electrónica de transmisión, teñido con ácido fosfotúngstico y marcado con oro coloidal con un anticuerpo anti-exopolisacarido de *A. seminis*.

8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Las adhesinas constituyen un factor de virulencia trascendental durante la colonización bacteriana, así como en el desarrollo de la enfermedad (Arp, 1988). Frecuentemente la unión de las bacterias a los tejidos del huésped está mediada por adhesinas de naturaleza diversa; como adhesinas fimbriales (Klemm y Schembr, 2000), moléculas de adhesión multivalentes (Krachler *et al.*, 2011) proteínas de membrana (Rollauer *et al.*, 2015) o proteínas con función y localización típicamente citoplásmicas (Granato *et al.*, 2004, Dhanani y Bagchi, 2013, Viale *et al.*, 2014 y Kinnby *et al.*, 2008).

Las proteínas de 25 y 37 kDa de *A. seminis* son reconocidas por antisueros generados contra otras adhesinas (Figuras 3 y 4): sueros contra la pilina BFP de *E. coli* reconocen ambas proteínas, mientras que anti-LpFA, también de *E. coli*, reconoce aquella de 37 kDa. Un antisuero generado contra la hemaglutinina filamentosa de *G. anatis*, y otro contra un fragmento de ella (anti->15 kDa) reconocen a la proteína de 37 kDa. Estos inmunoreconocimientos sugieren que ambas proteínas presentan dominios similares a las adhesinas contra las que fueron generados los antisueros ensayados.

El suero de borrego con epididimitis reconoce a las proteínas de 25 y 37 kDa (Figuras 3 y 4), indicando que ambas proteínas son expresadas por *A. seminis* durante el desarrollo de la enfermedad. Lo que sugiere que se trata de inmunogenos potenciales y requerirían más estudios.

Se purificó la proteína de 25 kDa mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna de DEAE-celulosa (Figura 5). La proteína se obtuvo en las fracciones eluidas con NaCl 0.6 y 0.8 M, que tras ser concentradas, permitieron visualizar la banda de interés y algunas otras proteínas presentes en menor cantidad. El suero de conejos inmunizados contra *A. seminis* reconoció la proteína de 25 kDa (Figura 6).

Los fragmentos identificados de la proteína de 25 kDa, por análisis MALDI-TOF, mostraron identidad con PGAM (Figura 7). Se ha documentado que enzimas glucolíticas pueden localizarse en la superficie celular, desempeñando diversas funciones, incluyendo aquellas involucradas en la adhesión (Kinnby *et al.*, 2008). PGAM de *Mycoplasma pneumoniae* tiene la capacidad de unir plasminógeno (Gründel *et al.*, 2016), mientras que en *Streptococcus suis* interactúa con plasminógeno y colágeno tipo I (Zhang *et al.*, 2014).

De acuerdo al análisis MALDI-TOF la proteína de 37 kDa presenta identidad con el factor de elongación termo inestable (EF-Tu) de *A. suis* (Figura 8).

Se ha reportado que las proteínas EF-Tu pueden desempeñar múltiples funciones, siendo una de ellas la adhesión a los componentes de la matriz extracelular del hospedero. Por ejemplo, EF-Tu de *Acinetobacter baumannii* y de *Mycobacterium avium* tiene la capacidad de adherirse a fibronectina (Dallo *et al.*, 2012; Viale *et al.*, 2014). Y en *Streptococcus suis*, interactúa con fibronectina y laminina (Li *et al.*, 2015).

La matriz extracelular está compuesta por múltiples moléculas que participan en la señalización celular y la comunicación con células adyacentes (Kim *et al.*, 2011). La adhesión e interacción de proteínas bacterianas con componentes de matriz extracelular puede modificar la respuesta del hospedero (Westerlund y Korhonen, 1993) y provocar la reorganización del citoesqueleto y la consecuente debilitación de las uniones intercelulares (Stones y Krachler, 2015).

Las proteínas de 25 y 37 kDa no reaccionaron con el único componente de matriz extracelular ensayado en los inmunoreconocimientos: fibrinógeno, aunque proteínas de peso mayor a 150 kDa sí lo hicieron (figura 3). Sería útil probar otros elementos de matriz extracelular y averiguar si son reconocidos por las 2 proteínas identificadas.

Además de las proteínas de 25 y 37 kDa ya mencionadas; de acuerdo a los resultados del Western Blot, *A. seminis* expresa diversas proteínas con potencial adhesivo: proteínas con peso entre 25- 37 kDa son reconocidas por anti->15 kDa, anti-LpFA y anti-BFP (figura 4), mientras que proteínas de alto peso (superior a

150 kDa) reaccionan con anti->15 kDa y fibrinógeno (figura 3). Además, aunque ninguna de las proteínas identificadas corresponde a adhesinas fimbriales, conforme a lo observado en la figura 9, *A. seminis* también expresa *fimbriae*. Lo anterior evidencia la diversidad de elementos involucrados en la adhesión y la consecuente importancia de este evento para *A. seminis*.

9. CONCLUSIONES.

- Se purificó e identificó una proteína de 25 kDa que tiene identidad con PGAM de *Pasteurella multocida* y es reconocida por anti-*A.seminis*, suero BE, anti-37 kDa y anti-BFP.
- Una proteína de 37 kDa guarda identidad con EF-Tu de *Actinobacillus suis* y muestra reconocimiento con anti-*A.seminis*, suero BE, anti-HA, anti->15 kDa y anti-LpFA
- De acuerdo con la bibliografía, ambas proteínas pueden desempeñar funciones adhesivas.

10. PERSPECTIVAS.

- Generar antisueros contra las proteínas de 25 y 37 kDa.
- Realizar ensayos de adhesión de *A. seminis* a células epiteliales y comprobar si la adhesión disminuye mediante el pretratamiento de las células bacterianas con los antisueros generados.

11. BIBLIOGRAFÍA.

- Abraham, S.N., N. Sharon, I. Ofek y J.D. Schwartzman. 2015. Adhesion and Colonization. En: M Sussman (Ed.), *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier Ltd, U.S.A. Pp 409-421.
- Al-Katib, W.A. y S.M. Dennis. 2009. Ovine genital actinobacillosis: A review. *N Z Vet J.* 57(6): 352-358.
- Arp, L.H. 1988. Bacterial infection of mucosal surfaces: an overview of cellular and molecular mechanisms. En: J.A. Roth (Ed.), *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Pp 3-27.
- Balasubramanian, S., T.R., Kannan, y J.B. Baseman. 2008. The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor Tu interacts with fibronectin. *Infect Immun.* 76(7): 3116–3123.
- Baynes, I.D. y G.C. Simmons. 1960. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis* n. sp. *Aust Vet J.* 36:454-459.
- Beck, B.D., P.G. Arscott y A. Jacobson. 1978. Novel properties of bacterial elongation factor Tu. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75(3): 1250–1254.
- Bergmann, S., M. Rohde, G.S. Chhatwal y S. Hammerschmidt. 2001. Alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol.* 40: 1273-1287.
- Burgess, G.W. 1982. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet Microbiol.* 7:551–75.
- Dallo S.F., B. Zhang, J. Denno, S. Hong, A. Tsai y W. Haskins. 2012. Association of *Acinetobacter baumannii* EF-Tu with cell surface, outer membrane vesicles, and fibronectin. *ScientificWorldJournal*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3362023>.

- De la Cruz, M.A. 2015. Caracterización de proteasas de *Actinobacillus seminis*. Tesis de licenciatura. México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. 34 p.
- Finlay, B.B. y P. Cossart. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276:718–725.
- Gerlach, R.G. y M. Hensel. 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol.* 297: 401-15.
- Gouletsou, P.G. 2015. Microbial diseases of the genital system of rams or bucks. *Vet Microbiol.* 181(1-2):130-135.
- Gründel, A., M. Pfeiffer, E. Jacobs y R. Dumke. 2016. Network of Surface-Displayed Glycolytic Enzymes in *Mycoplasma pneumoniae* and Their Interactions with Human Plasminogen. *Infect Immun.* 84(3):666-676.
- Healey, M.C., H.H. Hwang, Y.Y. Elsner y A.V. Johnston. 1991. A model for demonstrating the adhesion of *Actinobacillus seminis* to epithelial cells. *Canadian J Veter Res* 55:121–127.
- Henderson, B. y A. Martin. 2011. Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect Immun.* 79(9):3476-3491.
- Ishibashi, Y., S. Claus y D.A. Relman. 1994. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* 180:1225–1233.
- Jimenez-Pacheco, A., A. Nuñez-del Arco y E. Salas-Tellez. 2008. Microvesicles of *Actinobacillus seminis* show proteolytic activity. *J Anim Vet Adv.* 7(5): 616-619.
- Kim, S.H., J. Turnbull y S. Guimond. 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol.* 209: 139-151

- Kinnby, B., N.A. Booth y G. Svensäter. 2008. Plasminogen binding by oral streptococci from dental plaque and inflammatory lesions. *Microbiol.* 154:924-931.
- Klemm, P. y M.A. Schembr. 2000. Bacterial adhesins: function and structure. *Int J Med Microbiol.* 290(1): 27-35.
- Kline, K.A., S. Falker, S. Dahlberg, S. Normark y B. Henriques-Normark. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe.* 5:580–592.
- Krachler, A.M., H. Ham y K. Orth. 2011. Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by Gram-negative pathogens. *Proc Natl.* 108: 11614–11619.
- Li, Q., H. Liu, D. Du, Y. Yu, C. Ma, F. Jiao, H. Yao, C. Lu y W. Zhang. 2015. Identification of Novel Laminin- and Fibronectin-binding Proteins by Far-Western Blot: Capturing the Adhesins of *Streptococcus suis* Type 2. *Front Cell Infect Microbiol.* 5(82):1-11.
- Modun, B., J. Morrissey y P. Williams. 2000. The staphylococcal transferrin receptor: a glycolytic enzyme with novel functions. *Trends Microbiol.* 8: 231-237.
- Modun, B. y P. Williams. 1999. The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun.* 67: 1086-1092.
- Montes-García, J.F., S. Vaca, C. Vazquez-Cruz, E. Soriano-Vargas, F. Aguilar-Romero, P.J. Blackall y E. Negrete-Abascal. 2016. Identification of a hemagglutinin from *Gallibacterium anatis*. *Curr. Microbiol.* 72(4): 450-456.
- Moustacas, V.S., T.M.A. Silva, L.F. Costa, C.A. Carvalho, R.L. Santos y T.A. Paixão. 2014. Clinical and Pathological Changes in Rams

Experimentally Infected with *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni*. ScientificWorldJournal. 2014:1-10.

- Negrete-Abascal, E., A. Chantes-Guerra, V.A. Serrano, V.R. Tenorio, C. Vázquez-Cruz, E. Zenteno, y S. Vaca-Pacheco. 2009. Expression of proteins from *Avibacterium paragallinarum* grown under iron restriction conditions. Avian Pathol. 38: 209-213.
- Negrete-Abascal, E., M.E. Reyes, R.M. García, S. Vaca, J.A. Giron, O. García, E. Zenteno y M. de la Garza. 2003. Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J Bacteriol. 185(2): 664-668.
- Núñez-del Arco, A., E. Salas-Téllez, M. de la Garza, E. Díaz-Aparicio y V. Tenorio-Gutiérrez. 2006. Identification of an immunogenic protein of *Actinobacillus seminis* that is present in microvesicles. Can J Vet Res. 70(1): 43–49.
- Pancholi, V. y GS. Chhatwal. 2003. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. Int J Med Microbiol 293:391-401.
- Partida, J.A., D. Braña, H. Jiménez, F.G. Ríos y G. Buendía. 2013. *Producción de Carne Ovina*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 116 p.
- Rollauer, S.E., M.A. Soorshjani, N. Noinaj y S.K. Buchanan. 2015. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 370: 20150023.
- Salgado Lucio, M.L., S. Vaca, C. Vázquez, E. Zenteno, I. Rea, V.M. Pérez-Márquez y E. Negrete-Abascal. 2012. Adhesion of *Gallibacterium anatis* to chicken oropharyngeal epithelial cells and the identification of putative fimbriae. Adv Microbiol. 2(4):505-510
- Scanlan, C.M., M.C. Healey, A.R. Torres y A.V. Johnston. 1989. Cultural and biochemical characterization of *Actinobacillus* and *Actinobacillus*-like species from ram lambs with epididymitis. J Vet Diagn Invest. 4: 288–294.

- Schaller, A., P. Kuhnert, V. A. de la Puente, J. Nicolet y J. Frey. 2000. Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. *Vet Microbiol.* 74:365-376.
- Stones, H.D. y A.M. Krachler. 2015. Fatal attraction: how bacterial adhesins affect host signaling and what we can learn from them. *Int J Mol Sci.* 16: 2626-2640.
- Viale, M.N., G. Echeverria-Valencia, P. Romasanta, M.L. Mon, M.F., E. Malchiodi, M.I. Romano, A.K. Gioffré y M.Santangelo. 2014. Description of a Novel Adhesin of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis*. *Biomed Res Int.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/729618>.
- Westerlund, B. y T.K. Korhonen. 1993. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 9: 687- 694
- Zhang, H., J. Zheng, L. Yi, Y. Li, Z. Ma, H. Fan y C. Lu. 2014. The Identification of Six Novel Proteins with Fibronectin or Collagen Type I Binding Activity from *Streptococcus suis* Serotype 2. *J Microbiol.* 52(11):963-969.
- Zhang J.P. y S. Normark. 1996. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science*; 273:1234-1236.