



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**



**" DETERMINACION DE LAS PROTEINAS DE  
CHOQUE TERMICO DE Actinobacillus pleuropneumoniae  
SEROTIPO 1 "**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**ROSA MARIA AGUIRRE GUERRERO**

**ASESOR: M.C, ANDRES ROMERO ROJAS**



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 está 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo

" Determinación de las proteínas de choque térmico de  
Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1 "

que presenta la pasante: Rosa María Aguirre Guerrero  
con número de cuenta: 8629277-9 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga .

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 23 de octubre de 1995

PRESIDENTE M.en C. Andrés Romero Rojas

VOCAL M.en C. Victor M. Zendejas Buitrón

SECRETARIO M.en C. Stella Maris Reginensi Rivera

1er. SUPLENTE Q.F.B. René Damián Santos

2do. SUPLENTE Q.F.B. Marcela Hernández Vargas

**DEDICATORIA.**

Por permitirme vivir.  
Por darme fé, esperanza y amor.  
Por tenerme paciencia.  
Por lo que soy .....

**GRACIAS SEÑOR.**

A quien me dió todo sin esperar nada a cambio e inculcó en mí principios morales que son la base de formación de un ser humano..... A MI PADRE.

A quien sin conocerme ya me amaba, que guió mis primeros pasos y forjó en mí sentimientos maravillosos que me permitieron realizarme como mujer ..... A MI MADRE.

Como un pequeño tributo al amor desmedido y desinteresado que siempre he recibido de ellos, por creer en mí y apoyarme en los momentos decisivos de mi vida.

A MIS HERMANOS:

MAGDA

ANA

DAVID

De quienes siempre he aprendido algo  
y han colmado mi vida de alegría,  
amor y apoyo.

A MIS AMIGOS:

ADRIANA, LUCIA, GABY, ERNES, MATILDE, ELISA,  
EVA, HILDA Y JAVIER.

A quienes no solo agradezco todos esos gratos  
momentos que pasamos juntos, sino también, su  
leal y sincera amistad, me siento muy afortunada  
de tenerlos a mi lado y estoy segura que la  
amistad que un día iniciamos, ni el tiempo,  
ni la distancia podrán borrarla.

Con cariño a mi asesor de tesis:

M.C. Andrés Romero Rojas

Por su apoyo incondicional  
en las buenas y en las malas, por sus valiosos  
consejos, por su paciencia y confianza, pero sobre  
todo por brindarme su amistad desinteresada. MIL GRACIAS.

**A MIS ABUELITOS.**

Por sus consejos siempre prudentes  
y sensatos, por su ejemplo de  
rectitud y honestidad y por todo  
el cariño que nos han brindado siempre...

**MUCHAS GRACIAS**

**A MIS TIOS, A MIS PRIMOS Y A MIS PADRINOS:**

Porque han compartido los momentos  
gratos de mi vida, este trabajo es  
por y para ustedes. Gracias por  
estar siempre junto a mí.



**AGRADECIMIENTOS:**

Un sincero agradecimiento a:

**DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO**  
**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
**DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA**

Por las facilidades prestadas para el uso de material y equipo en la elaboración del presente trabajo.

**DRA. MIREYA DE LA GARZA**  
**LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR (CINVESTAV).**

Por sus valiosos comentarios en la revisión del trabajo experimental y teórico del proyecto.

**A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**DE COAUTITLAN.**

Porque se que la preparación que he recibido en sus aulas es la herencia mas valiosa que podré tener.

**AL H. JURADO:**

- \* M. en C. **ANDRES ROMERO ROJAS.**
- \* M. en C. **VICTOR M. ZENDEJAS BUITRON.**
- \* M. en C. **STELLA MARIS REGINENSI RIVERA.**
- \* Q.F.B. **RENE DAMIAN SANTOS.**
- \* Q.F.B. **MARCELA HERNANDEZ VARGAS.**

Por la atención tomada en la revisión  
y corrección del presente trabajo.

## INDICE

	Página
<b>1. INTRODUCCION.</b>	1
<b>1.1 Generalidades</b>	3
<b>1.2 Antecedentes</b>	4
<b>1.3 Características morfológicas y bioquímicas de <i>A. pleuropneumoniae</i></b>	5
<b>1.3.1 Características diferenciales</b>	8
<b>1.4 Factores de virulencia</b>	8
<b>1.4.1 Antígenos capsulares</b>	9
<b>1.5 PLEUROPNEUMONIA CONTAGIOSA PORCINA</b>	
<b>1.5.1 Morbilidad y mortalidad</b>	11
<b>1.5.2 Transmisión</b>	11
<b>1.5.3 Patogenia</b>	13
<b>1.5.4 Signos clínicos</b>	14
<b>1.5.5 Lesiones</b>	15
<b>1.5.6 Diagnóstico</b>	
<b>1.5.6.1 Diagnóstico bacteriológico</b>	17
<b>1.5.6.2 Serodiagnóstico</b>	19
<b>1.5.7 Vacunación</b>	19
<b>1.5.8 Control e inmunidad</b>	21
<b>1.6 PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO</b>	
<b>1.6.1 Antecedentes</b>	23
<b>1.6.2 Generalidades</b>	25
<b>1.6.3 Proteínas de choque y su respuesta al estrés</b>	26
<b>1.6.4 Las proteínas de estrés como blanco de la respuesta inmune</b>	28
<b>1.6.5 Inducción de las proteínas de choque térmico</b>	30

<b>2. HIPOTESIS</b>	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>4. MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>4.1 Material biológico</b>	<b>33</b>
4.1.1 Cepas	33
4.1.2 Sueros	33
<b>4.2 Reactivos</b>	
4.2.1 Soluciones preparadas	35
<b>4.3 Medios de cultivo</b>	<b>35</b>
<b>4.4 Pruebas bioquímicas para la identificación del microorganismo</b>	
4.4.1 Tinción de Gram	36
4.4.2 Prueba de satelitismo	36
4.4.3 Prueba de CAMP	36
4.4.4 Prueba de Ureasa	36
<b>4.5 Inducción de la expresión de las proteínas de choque térmico</b>	<b>37</b>
<b>4.6 Obtención de los extractos membranales</b>	<b>38</b>
<b>4.7 Cuantificación de proteínas</b>	<b>38</b>
4.7.1 Preparación del reactivo de Bradford	39
4.7.2 Preparación de los estándares de proteína	39
<b>4.8 Solubilización de los extractos membranales</b>	<b>40</b>
<b>4.9 Electroforesis</b>	<b>40</b>
4.9.1 Gel de separación	40
4.9.2 Gel de condensación	40
4.9.3 Corrimiento de las muestras	40
4.9.4 Tinción de los gels de poliacrilamida-SDS	41
4.9.5 Curva patrón de movilidad relativa	42
4.9.6 Cálculo del coeficiente de movilidad relativa de las proteínas (Rf)	43

<b>4.10 Electrotransferencia</b>	<b>44</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Pruebas bioquímicas</b>	<b>46</b>
<b>5.2 Obtención de los extractos membranales</b>	<b>47</b>
5.2.1 Lisado de las bacterias	47
5.2.2 Separación de las membranas	47
5.2.3 Análisis del extracto membranal	47
<b>5.3 Electroforesis</b>	<b>53</b>
<b>5.4 Electrotransferencia</b>	<b>54</b>
<b>6. DISCUSION.</b>	<b>61</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>69</b>
<b>9. APENDICE</b>	<b>76</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

<b>TABLAS:</b>	<b>Página</b>
I. Características bioquímicas de <i>A. pleuropneumoniae</i>	7
II. Características diferenciales de <i>A. pleuropneumoniae</i>	8
III. Protocolo de inmunización para la obtención de sueros hiperinmunes	34
IV. Tiempo de incubación de la cosecha de <i>A. pleuropneumoniae</i>	37
V. Preparación de los estándares para la curva de calibración (Met. Bradford)	39
VI. Resultados de las pruebas bioquímicas de <i>A. pleuropneumoniae</i>	46
VII. Valores de la curva patrón para la cuantificación de proteínas de las muestras incubadas a 39 °C	48
VIII. Valores de la curva patrón para la cuantificación de proteínas de las muestras incubadas a 42 °C	49
IX. Valores de la curva patrón para la cuantificación de proteínas de las muestras incubadas a 50 °C	50
X. Contenido proteico de los extractos membranales de <i>A. pleuropneumoniae</i> incubado a 39 °C	51
XI. Contenido proteico de los extractos membranales de <i>A. pleuropneumoniae</i> incubado a 42 °C	52
XII. Contenido proteico de los extractos membranales de <i>A. pleuropneumoniae</i> incubado a 50 °C	53
XIII. Proteínas patrón empleadas para el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas de membrana de <i>A. pleuropneumoniae</i> (39 °C)	54

XIV. Proteínas patrón empleadas para el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas de membrana de <i>A. pleuropneumoniae</i> (42 °C)	55
XV. Proteínas patrón empleadas para el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas de membrana de <i>A. pleuropneumoniae</i> (50 °C)	56
XVI. Pesos moleculares de las proteínas de membrana de <i>A. pleuropneumoniae</i> (39 °C)	58
XVII. Pesos moleculares de las proteínas de membrana de <i>A. pleuropneumoniae</i> (42 °C)	59
XVIII. Pesos moleculares de las proteínas de membrana de <i>A. pleuropneumoniae</i> (50 °C)	60
XIX. Producción porcina mundial	61

## FIGURAS

1.- Curva patrón para la cuantificación de proteínas de las muestras incubadas a 39 °C	48a
2.- Curva patrón para la cuantificación de proteínas de las muestras incubadas a 42 °C	49a
3.- Curva patrón para la cuantificación de proteínas de las muestras incubadas a 50 °C	50a
4.- Curva patrón para la determinación del peso molecular de las proteínas del extracto membranal de las muestras incubadas a 39 °C	54a
5.- Curva patrón para la determinación del peso molecular de las proteínas del extracto membranal de las muestras incubadas a 42 °C	55a

- 6.- Curva patrón para la determinación del peso molecular de las proteínas del extracto membranal de las muestras incubadas a 50 °C 56a
- 7.- Patrón electroforético del extracto membranal de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 (A temperatura de choque de 39 °C) 58a
- 8.- Patrón electroforético del extracto membranal de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 (A temperatura de choque de 42 °C) 59a
- 9.- Patrón electroforético del extracto membranal de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 (A temperatura de choque de 50 °C) 60a
- 10.- Transferencia del patrón electroforético de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 a papel de nitrocelulosa 60b



## **1. INTRODUCCION**

*Actinobacillus pleuropneumoniae*, agente etiológico de la pleuropneumonía contagiosa porcina, fue caracterizado por primera vez en 1960, se trata de una pequeña bacteria cocobacilar, gram negativa, la cual requiere para su crecimiento de factor V (NAD), aunque se ha aislado también la serovariedad 2, independiente de NAD. Presenta varios factores de virulencia como su cápsula, la cual constituye la estructura externa de la bacteria y determina el serotipo específico, una hemolisina estable al calor, la cual ha sido reportada como letal para cerdos jóvenes, así como citocida y antifagocítica para macrófagos pulmonares del cerdo y una proteína con actividad hemolítica además de ser citotóxica para neutrófilos.<sup>33</sup>

Este microorganismo puede cultivarse en medios como agar chocolate o agar BHI complementados con factor V, crece a una temperatura de 37 °C en un lapso de 18-24 horas.<sup>33,36</sup>

La pleuroneumonía produce en cerdos susceptibles una elevada mortalidad y pérdidas económicas, debido a una pobre conversión alimenticia en los porcinos infectados crónicamente. Esta enfermedad representa en la actualidad el problema más severo de la industria porcícola nacional.<sup>33</sup>

En México, la enfermedad estaba originalmente circunscrita a la zona del Bajío y de Tlaxcala, pero actualmente se ha diseminado por todo el país.<sup>39</sup>

La propagación de la pleuroneumonía contagiosa porcina es difícil de controlar debido a que no existe un método que determine con exactitud si el cerdo está o no infectado. Los cultivos bacteriológicos detectan algunas infecciones pero no la

totalidad. Las pruebas serológicas presentan aún algunos inconvenientes debido a la presencia de diferentes serotipos en las pjaras infectadas.<sup>33</sup>

En el presente trabajo se pretende identificar algunas de las proteínas de choque que son expresadas por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, específicamente las del serotipo 1 ya que se ha especulado mucho acerca de la importancia de estas proteínas como factores de virulencia o factores de protección de la bacteria. Hasta la fecha no se ha determinado la presencia de estas proteínas en el *Actinobacillus pleuropneumoniae*, las cuales por la sintomatología de la enfermedad causada por este microorganismo (pleuroneumonía con fiebres muy elevadas) deben ser producidas y participar en la defensa de la bacteria contra la respuesta del huésped.

La identificación, la caracterización y el aislamiento de estas proteínas, permitirán la creación de un nuevo tipo de inmunógeno que participe en la erradicación de esta enfermedad en cerdos contagiados y la prevención de la misma en cerdos sanos, así como nuevos métodos de diagnóstico de la enfermedad.

## **1.1 GENERALIDADES.**

La neumonía en el cerdo representa uno de los más graves problemas infecciosos de esta especie animal. Típicamente, entre el 30 y 60% de los cerdos de abasto presentan alguna lesión neumónica <sup>39</sup>. El costo de esta enfermedad para la industria porcícola es enorme debido al carácter crónico que usualmente presenta, lo que ocasiona importantes pérdidas por deficientes ganancias de peso y retraso en el crecimiento. Se ha calculado que por cada 10% de tejido pulmonar afectado, el cerdo sufre un retraso en su crecimiento (medido por su ganancia media diaria) del 5% <sup>43</sup>. Aunado a la pérdida económica debido a la pérdida de peso y crecimiento del animal, se suman las enormes pérdidas indirectas por consumo de medicamentos y vacunas así como la excesiva permanencia de los cerdos en corrales de finalización. Es obvio que una enfermedad que causa pérdidas tan cuantiosas haya sido sujeto de intensa investigación por varios años, lo curioso es que aún no se conozcan muchas de las facetas de este problema.

La urgente necesidad de comprender mejor este problema se centra en conocer más sobre:

- 1) Resistencia e inmunidad del aparato respiratorio del cerdo.
- 2) Transmisión
- 3) Etiología
- 4) Patogenia
- 5) Inmunidad específica conferida por biológicos <sup>43</sup>.

## 1.2 ANTECEDENTES.

En 1963, Olander aisló una bacteria de un cerdo con neumonía la cual requería el factor V (NAD) para su crecimiento y que producía una marcada hemólisis en agar sangre por lo que se le denominó *Haemophilus parahemolyticus*, primera descripción realizada en California E.U. Ese mismo año, en Argentina se investigó un brote de pleuroneumonía del tipo agudo en cerdos, y al agente causal se le denominó *Haemophilus pleuropneumoniae* (Pittman 1953, Shope 1964).<sup>33</sup>

La importancia de la enfermedad fue evidente en los años setentas cuando hubo bastantes reportes de brotes y se realizaron investigaciones extensivas en Europa, como las de Nicolet (1968), Little y Harding (1971), Gunnarson y cols. (1978). En Australia por Myrlea y cols. (1974), en Taiwan por Hsu y cols. (1976), en Japón por Chang y cols. (1978), en Estados Unidos por Cole (1978) y en Canada por Sanford y Jospson (1981). Después de una serie de estudios realizados a todas estas bacterias se concluyó que se trataba del mismo microorganismo. <sup>46,51</sup>

En la actualidad se ha reclasificado esta bacteria colocándola dentro del género *Actinobacillus*. Esta última proposición se basó en el hecho de que tanto las biovariedades factor V dependiente (biovar 1), como la biovariedad factor V independiente (biovar 2) de *Haemophilus pleuropneumoniae*, presentan una mayor similitud fenotípica y un mayor porcentaje de hibridización de DNA con *Actinobacillus lignieressi* que con *Haemophilus influenzae*. Así mismo los patrones de movilidad electroforética de las proteínas de membrana externa que presenta *H. pleuropneumoniae* guardan una mayor similitud con los presentados

por algunas especies del género *Actinobacillus* como *Actinobacillus suis* y con *Pasteurella haemolytica* que con los patrones observados para *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus parasuis*. Debido a esto, la clasificación actual de este microorganismo es *Actinobacillus pleuropneumoniae*.<sup>7,35,41,50</sup>

### 1.3 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y BIOQUIMICAS DEL Actinobacillus pleuropneumoniae<sup>1</sup>

El agente causal de la pleuropneumonia contagiosa porcina es *Actinobacillus pleuropneumoniae* que se caracteriza por ser:

- Bacilo gram negativo
- Inmóvil
- No esporulado
- Capsulado
- Presenta pleomorfismo
- Se puede encontrar en pares o cadenas
- Requiere para su crecimiento del factor V (Nicotinamida Adenin Dinucleótido).
- En medios enriquecidos forma colonias pequeñas en forma de "gota de rocío" (pequeñas, translúcidas, lisas, convexas, brillantes y de aspecto húmedo).
- Crece bien a una temperatura entre 25 - 45 °C, siendo la óptima de 37 °C y a pH cercano a la neutralidad.
- Es ureasa y porfirina positivas.

- Es CAMP positivo debido a que existe sinergismo entre una cohemolisina de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y la toxina  $\beta$  de *Staphylococcus aureus*.
- Crece bien en agar Columbia, agar infusión cerebro corazón (BHI), agar chocolate y agar sangre complementados con extracto de levadura o NAD al 0.01%. Se ha reportado el uso de otros medios de cultivo que dan resultados satisfactorios.

Algunas características bioquímicas y diferenciales de *A. pleuropneumoniae*, respecto a otros *Haemophilus*, se muestran en las tablas I y II respectivamente.

**Tabla I. Características bioquímicas de *Actinobacillus pleuroneumoniae*.<sup>1</sup>**

PRUEBA	RESULTADO
Factor V	+
Factor X	-
Catalasa	D
Nitratos	+
Oxidasa	D
Urea	+
Indol	-
Citrato	-
Voges-Proskauer (VP)	-
Rojo de metilo	-
Hemolisina $\beta$	+
Lactosa	-
Ribosa	-
Xilosa	+
Arabinosa	-
Dulcitol	-
Inositol	-
Dextrosa	+
Fructuosa	+
Maltosa	L
Manitol	L
Fosfatasa alcalina	+
CAMP	+

Factor V = NAD  
 Factor X = Hemina  
 L = Ligero  
 D = Dudoso

**TABLA II. CARACTERISTICAS DIFERENCIALES. <sup>43</sup>**

CARACTERISTICAS. Dependencia a:	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Actinobacillus parasuis</i>	<i>Actinobacillus suis</i>
Factor V (NAD)	+	+	+
Factor X (Hemina)	-	-	-
Ureasa	+	-	-
Porfirina	+	+	-
Necesidad de suero	-	+	+

#### 1.4 FACTORES DE VIRULENCIA.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* presenta una variedad de factores de virulencia entre los cuales se encuentran algunas hemolisinas de pesos moleculares variados que comprenden desde los 27 a los 107 kilodaltones (KDa). La hemolisina de 104 Kd ha sido sujeta a estudios por su toxicidad en cultivos celulares. Esta hemolisina es estable al calor y ha sido reportada como letal para cerdos jóvenes, así como citocida y antifagocítica para los macrófagos pulmonares del cerdo. La hemolisina de 27 Kd ha presentado un efecto sinérgico con la toxina B de *Staphylococcus* a la cual se le atribuye el efecto CAMP positivo. <sup>40</sup>

Otro factor importante de virulencia de *A. pleuropneumoniae* es su cápsula, la cual ha sido purificada por precipitación del sobrenadante del cultivo con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Cetavlon) seguido por la extracción con cloruro de sodio y fenol pasando finalmente por una cromatografía de columna. <sup>20</sup>



En estudios realizados sobre la virulencia de la cápsula, se observó que una cepa con una densa cápsula adherente fué mas virulenta que una cepa deficiente de cápsula, además de ser antifagocítica e inhibir la actividad bactericida de los anticuerpos y el complemento. En la cápsula se encuentran los antígenos de superficie responsables de la existencia de diferentes serotipos.<sup>20</sup> *Actinobacillus pleuropneumoniae* presenta tambien el lipopolisacárido el cual tiene una actividad biológica semejante a la de otras bacterias gram negativas e induce una reacción positiva en las reacciones dérmicas de Schwartzman, respuestas pirógenicas, mortalidad de embriones de pollo y respuestas blastogénicas de los linfocitos de sangre periférica.<sup>29</sup>

Además se ha demostrado que el sobrenadante del cultivo de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, contiene una proteína lábil al calor con actividad hemolítica y que además es citotóxica para los neutrófilos.

#### **1.4.1 Antígenos capsulares.**

En la literatura se demuestra la existencia de 12 serotipos diferentes de *Actinobacillus pleuropneumoniae* los cuales varían únicamente por cambios en la estructura del polisacárido capsular por sustitución de un azúcar por otro, la cápsula está constituida principalmente por glucosa, galactosa N-acetil glucosamina y N-acetil galactosamina, aunque se encuentran presentes azúcares poco usuales como el ácido 3-deoxi-d manno- 2 octolosónico presente en el serotipo 5.<sup>20</sup>

Los serotipos 1,2 y 3 fueron propuestos por Nicolet (1971) con base en sus estudios de aglutinación cruzada en los cuales definió estos tres serotipos basándose en sus antígenos de tipo específico asociados a la cápsula.<sup>36,38</sup>

Posteriormente Gunnarson (1977) descubre los serotipos 4 y 5 con lo que se amplía la clasificación, Nielsen (1974) propuso la existencia del serotipo 6 y Rosendal (1982) la existencia del serotipo 7, Nielsen (1984) propone la caracterización del serotipo 8 y él mismo reporta haber encontrado los serotipos 10,11 y 12.<sup>36,38</sup>

Este microorganismo está ampliamente distribuido a nivel mundial, pero los serotipos varían en su distribución de un país a otro y la virulencia de cada serotipo es variable también, ya que mientras que en un país, por ejemplo Australia, encuentran la prevalencia de los serotipos 1 y 7, en Brasil se encuentran los serotipos 1,3,4 y 5, siendo los más patógenos el 1 y el 5 respectivamente.<sup>7</sup>

En México, se han realizado diversos estudios acerca de la prevalencia de algún serotipo específico, en 1988 Ciprian y cols. realizaron un estudio con animales de abasto reportando solo la presencia del serotipo 1.<sup>7</sup>

Así mismo, Díaz y cols. (1989) realizaron un estudio en las principales zonas porcícolas del país, encontrando una elevada prevalencia del serotipo 1 en la mayoría de las zonas, pero además detectaron la presencia de los serotipos 2,3,4,5,6,7, y 8, los cuales se encuentran distribuidos en menor proporción.<sup>7</sup>

## **1.5 PLEURONEUMONIA CONTAGIOSA PORCINA.**

### **1.5.1 MORBILIDAD Y MORTALIDAD.**

En los brotes mexicanos la evaluación de la morbilidad, se ha caracterizado por los siguientes hechos:

- a) Varía según la edad de los animales.
- b) La mayoría de los brotes detectados han sido en animales de 30 a 50 kg. de peso.
- c) Puede alcanzar en el lote afectado hasta el 80%, en tanto que la mortalidad aún en presencia de tratamiento puede ser hasta del 35%.
- d) Ocasionalmente se difunde a animales adultos.<sup>43</sup>

### **1.5.2 TRANSMISION.**

Debido a que las partículas suspendidas en el aire están cubiertas por una capa de agua (en forma de microgotas) se ha pensado en controlar la transmisión de la neumonía controlando la humedad ambiental. En teoría, si la humedad es elevada, las microgotas tenderán a ser de mayor tamaño, quedando atrapadas en las regiones traqueobronquiales, reduciéndose así la posibilidad de infección. Sin embargo, se han realizado algunos experimentos que no apoyan esta hipótesis. Los resultados obtenidos demuestran que las variaciones en el tamaño de las microgotas son mínimas, aún cuando la humedad relativa en la cámara varía del 30 al 95%.<sup>57</sup>

En realidad, cuando un cerdo estornuda y expelle microgotas infecciosas suceden varias cosas:

- 1) Las microgotas se deshidratan rápidamente (en menos de 10 segundos) aún en ambientes saturados de humedad. Esto restringe la variación de tamaño (las que median de 5 a 50  $\mu\text{m}$  ahora medirán de 3 a 10  $\mu\text{m}$ ).
- 2) Al ser inspiradas por otro cerdo, las microgotas se rehidratan en el árbol respiratorio. Como las partículas pequeñas se rehidratan más que las grandes, el tamaño se restringe aún más (de 3-10  $\mu$  pasarán a 6-12  $\mu$ ). De esta manera vemos que, independientemente de la dispersión original del aerosol y de la humedad ambiental, las partículas inspiradas por el cerdo susceptible tenderán a presentar tamaños grandes que son menos infecciosos. De estas observaciones podemos concluir que los animales no desarrollan neumonía en forma directa al inspirar un aerosol infectado sino que la manera más probable de transmisión debe entonces ocurrir por contacto directo entre animales o por estornudos muy cercanos que son inspirados antes de que puedan deshidratarse. En estas condiciones, los cerdos susceptibles reciben una dosis infecciosa de bacterias que probablemente se establecen primero en la nariz y posteriormente infectan el pulmón al ser inspiradas. De esta manera, la dinámica de infección dentro de la pira puede ser muy rápida si los cerdos están en contacto, estableciéndose una población de animales con el árbol respiratorio superior colonizado con bacterias.<sup>33</sup>

El *Actinobacillus pleuropneumoniae* produce neumonía cuando logra introducirse hasta el alveolo. En el alveolo la bacteria puede resistir la fagocitosis

merced a su cápsula, y después destruye al macrófago al secretar una poderosa toxina citocida. A diferencia de la toxina de *Pasteurella*, la de *Actinobacillus* es capaz de inactivar rápidamente a los macrófagos en cultivo.<sup>41</sup>

### 1.5.3 PATOGENIA.

Se sugiere que la enfermedad se presenta cuando el microorganismo escapa de los mecanismos de defensa del tracto respiratorio superior y llega a nivel alveolar donde, dependiendo de su habilidad el *A. pleuropneumoniae* podrá establecerse y multiplicarse por su virulencia asociada a uno o varios factores que parecen ser, la presencia de cápsula, endotoxinas y/o exotoxinas, y de la falta de una respuesta inmune adecuada por parte del hospedero.<sup>38,47</sup>

*A. pleuropneumoniae* resulta citotóxico para los macrófagos alveolares del cerdo y las células mononucleares de sangre periférica. La citotoxina de esta bacteria es estable a altas temperaturas (100 °C /15 min.) y puede ser neutralizada con sueros de cerdos con infección crónica; se encuentra en la pared bacteriana y puede producir trombosis vascular y exudación de flujo edematoso y hemorrágico, sin embargo, el hecho de que las bacterinas que confieren mayor protección son las que tienen cápsula y no toxoide, demuestra que la toxina no es el único factor de patogenia involucrado.<sup>44</sup>

En algunos estudios se ha propuesto que parte del daño sufrido en el tejido pulmonar, puede deberse a la liberación de enzimas y sustancias tóxicas a partir de neutrófilos que aparecen en la zona afectada en las primeras horas de la infección por *A. pleuropneumoniae*.<sup>53</sup>

Aquellas bacterias que son ingeridas por los fagocitos, no son muertas y siguen reproduciéndose internamente hasta causar la muerte inicialmente al fagocito y posteriormente al hospedero.<sup>53</sup>

#### **1.5.4 SIGNOS CLINICOS.**

La enfermedad puede ser hiperaguda, aguda o crónica. En piaras completamente susceptibles a la pleuroneumonía tiene un inicio repentino extendiéndose rápidamente y afectando a cerdos de todas las edades, incluyendo animales de cría.

En la pleuroneumonía porcina, los signos clínicos varían desde una septicemia sobreaguda con dramáticas manifestaciones de asfixia, hasta una tos crónica.

**a) Neumonía hemorrágica sobreaguda.** Esta causa una muerte repentina de los animales, con hemorragias nasales, temperatura elevada (41 - 42 °C), cianosis en la piel del abdomen y orejas y hemorragias por nariz y hocico.

**b) Pleuroneumonía crónica.** Se caracteriza por la presencia de anorexia, dificultad respiratoria caracterizada por respiración diafragmática rápida, tos y retraso en el desarrollo.

Las lesiones que se observan con mayor frecuencia son: pericarditis, hemorragias en miocardio, infarto rojo en algunos lóbulos del pulmón, friabilidad en algunas zonas infartadas, hidrotórax con líquido sanguinolento, fibrosis en pulmón y pleura.

La transmisión mas común es por contacto directo de nariz a nariz, pero el cerdo puede no ser el único transmisor.<sup>33</sup>

### 1.5.5 LESIONES.

Las lesiones causadas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* han sido comparadas con lesiones observadas en choques endotóxicos. Estas lesiones estan generalmente confinadas al toráx y son características en casos agudos en que un diagnóstico presuntivo puede ser hecho sobre examen postmortem. En enfermedades hiperagudas la cavidad torácica contiene grandes cantidades de líquido serosanguinolento con pedazos de fibrina entre los pulmones y la pared torácica, los pulmones están muy duros, con edema y congestión, teniendo una apariencia púrpura oscura; hay consolidación extensiva en todos los lóbulos afectados, particularmente el aspecto dorsal de los lóbulos apicales y cardiacos y principalmente los lóbulos diafragmáticos, como distinción de la neumonía enzoótica que principalmente afecta los lobulos anteriores.<sup>b7</sup>

Los lóbulos consolidados están frecuentemente levantados sobre el tejido causando una elevación de la pleura, la pleuritis es diseminada especialmente sobre los lóbulos afectados. En casos crónicos, la pleura puede ser desprendida en una placa delgada verde amarillenta. Los lóbulos pueden estar claramente delimitados por un edema extensivo y una fibrosis del tejido afectado. En los casos crónicos, hay una pleuritis organizada con adherencias de fibrina en la pleura parietal haciendo difícil la remoción pulmonar de la cavidad torácica.<sup>b7</sup>

Las lesiones neumónicas están delimitadas por fibrosis, que pueden ser abscesos caseosos de más de 10 centímetros de diámetro, particularmente en los lóbulos diafragmáticos. Una pericarditis generalmente acompaña a esta pleuritis extensiva y pueden causar falla cardíaca, la cual está asociada a hepatomegalia y esplenomegalia. Los cerdos infectados que han sobrevivido a la enfermedad, presentan pleuritis extensiva, pericarditis y hepatización lobular, particularmente en los lóbulos diafragmáticos.

Las principales lesiones macroscópicas son pericarditis, hidropericardio, hidrotórax de líquido sanguinolento, hemorragia en miocardio, adherencias pleurales, infarto en los lóbulos pulmonares diafragmáticos y friabilidad de la zona infartada.

Entre los hallazgos histopatológicos encontramos zona de infarto, edema vascular, infiltración peribronquial y perivascular de células mononucleares linfocitos y macrófagos y hemorragia en alveolos.<sup>33,43</sup>

### **1.5.6 DIAGNOSTICO.**

Existen cuatro métodos de diagnóstico para la detección de la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en cerdo, estos son:

- a) Los signos y el curso de la enfermedad en cerdos individuales y en grupo.
- b) Hallazgos post-mortem.
- c) Aislamiento de la bacteria en el tracto respiratorio.
- d) Serología.



En cuanto a este último, las técnicas que han sido usadas hasta ahora para la detección de *A. pleuropneumoniae* como causante de neumonía son: aglutinación, aglutinación en tubo, aglutinación con 2-mercaptoetanol, inmunodifusión, precipitación en tubos capilares, extracción capsular, fluorescencia directa e indirecta, coaglutinación, ELISA y fijación de complemento.<sup>57</sup>

La prueba de ELISA se propone como un sistema de diagnóstico serológico de elevada especificidad y sensibilidad y es adecuado para la serología de rutina de diagnóstico en infecciones de cerdos por *A. pleuropneumoniae*. La técnica tiene gran reproducibilidad y capacidad con la ventaja de que puede ser adaptada a sistemas automatizados.<sup>57</sup>

La importancia de las pruebas serológicas se incrementa por la falta de una vacuna que evite la infección confiablemente<sup>33</sup>. El diagnóstico definitivo de la PCP debe ser oportuno y rápido y es esencial identificar los diferentes serotipos prevalentes en el país con el fin de elaborar los biológicos adecuados para el diagnóstico y la inmunización de los animales.<sup>43</sup>

#### 1.5.6.1 Diagnóstico bacteriológico.

El diagnóstico bacteriológico para determinar las infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae* es difícil, ya que los métodos de cultivo de rutina no proporcionan resultados satisfactorios (cuando se toman muestras de animales infectados crónicamente los aislamientos no siempre son exitosos).<sup>33</sup>

Otro problema que se presenta en casos crónicos o animales portadores es que se emplea tejido pulmonar para intentar el aislamiento de la bacteria; se han

realizado estudios en los cuales aparte del tejido pulmonar utilizaron otros tejidos considerados de rutina para el aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, los tejidos que se emplearon fueron mucosa nasal anterior, cornetes posteriores, tonsilas faringneas, tráquea, bronquios pulmonares, nódulos linfoides y bazo y se aisló *A. pleuropneumoniae* por lo menos de uno de los tejidos empleados como muestra.<sup>57</sup>

Actualmente se ha desarrollado una técnica de aislamiento por diluciones para favorecer el crecimiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y disminuir la contaminación por otras bacterias como *P. multocida*. Esta técnica se desarrolla de la siguiente manera: el pulmón a trabajar se esteriliza por la parte exterior con una espátula al rojo vivo, posteriormente se toma un gramo de tejido pulmonar y se coloca en un tubo con medio de cultivo líquido complementado con NAD y se agita vigorosamente, de este tubo se realizan diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ , se incuban por 12 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y de la dilución mas alta que presente desarrollo bacteriano se siembra en agar sangre con cepa nodriza.<sup>39</sup>

Dentro de las dificultades que se presentan para el aislamiento de *A. pleuropneumoniae* es el contar con un medio adecuado para el primoaislamiento. En este aspecto se han desarrollado un medio selectivo para el aislamiento de *A. pleuropneumoniae* el cual contiene inhibidores de otros microorganismos.<sup>27</sup>

El envío adecuado de las muestras es importante para tener un resultado confiable. Se ha estudiado la viabilidad de *Actinobacillus pleuropneumoniae* bajo diferentes condiciones de almacenamiento consideraron cuatro condiciones de preservación: a  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $-6^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  y observaron que cuando las muestras eran

almacenadas a 4 y 20 °C solo recuperaban *A. pleuropneumoniae* en medio selectivos por lo que un buen manejo de las muestras empleadas para el diagnóstico bacteriológico, es muy importante para proporcionar un resultado adecuado.<sup>28</sup>

### **1.5.6.2 Serodiagnóstico.**

El serodiagnóstico proporciona la manera más fácil de localizar a los animales crónicamente enfermos; la exclusión de tales animales portadores, con la introducción de animales seronegativos que se sometan a cuarentena y a los cuales se les realice un par de pruebas serológicas con intervalos de aproximadamente tres semanas, puede resultar un factor de control importante.<sup>29</sup>

### **1.5.7 VACUNACION.**

La mayoría de las bacterinas preparadas contra patógenos pulmonares han dado resultados pobres. Existen múltiples razones para esto, y seguramente quedan algunas por aclarar.

- a) Las bacterinas parenterales estimulan poca IgG en sitios alveolares.
- b) Los adyuvantes usados son poco inmunoestimulantes.
- c) Las bacterias utilizadas no son de los serotipos correspondientes.
- d) Se utilizan demasiados antígenos diferentes en la misma vacuna.
- e) Las bacterias usadas no expresan en forma óptima los antígenos protectores.<sup>43</sup>

La inmunización contra *A pleuropneumoniae* ha sido centro de muchas controversias. No hay duda que las bacterinas preparadas con cultivos de seis horas (que son capsulados) y adyuvante de hidróxido de aluminio, previenen la mortalidad. Sin embargo, estas bacterinas no estimulan protección contra la infección. Los cerdos vacunados desarrollan lesiones pulmonares y transmiten la infección a otros animales. Dependiendo del porcentaje de mortalidad en la piara, este tipo de vacunación puede resultar costeable o no, pero es importante estar concientes de que no representa una solución del problema a largo plazo. <sup>33,35,39</sup>

La utilización de adyuvantes oleosos en vez de geles resulta en una protección mucho mas eficaz contra *A. pleuropneumoniae*; en estos casos los animales vacunados no desarrollan lesiones y probablemente no transmiten la enfermedad. Sin embargo, desarrollan una lesión granulomatosa en el sitio de inyección que puede diseminarse a tejidos linfoides. En muchos países esto causa decomiso en el matadero por sospecha de tuberculosis. Este tipo de vacunas son demasiado irritantes para ser utilizadas de rutina en la actualidad. Sin embargo, representan un futuro interesante de inmunización si se logran eliminar las reacciones secundarias.

Por último, cabe mencionar que la vacunación contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* puede resultar en efectos secundarios indeseables. Algunas observaciones de campo sugieren que un porcentaje de los animales vacunados en granjas infectadas sufren un recrudescimiento de su estado clínico; el fenómeno parece ser debido a que, con la opsonización, ocurre un aumento importante en el número de microorganismos ingeridos por el macrófago, si este macrófago no

ha sido activado por inmunidad celular (esto es, si la vacuna estimula preferentemente inmunidad humoral) esto resulta en la rápida muerte del macrófago, debido a las toxinas producidas por los *Actinobacillus* fagocitados.<sup>39</sup>

### 1.5.8 CONTROL E INMUNIDAD.

Para el control y la prevención de la pleuroneumonía contagiosa porcina, deben tomarse en cuenta varios factores, entre ellos la inmunidad de los animales de la granja.

Se ha observado que los animales que sobreviven después de un brote natural por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, desarrollan inmunidad especie-específica ante el microorganismo y adquieren resistencia a la enfermedad. De esta forma la población porcina de la granja adquiere cierto grado de inmunidad.<sup>39</sup>

Las cerdas que han sido expuestas a este microorganismo, proporcionan a sus lechones inmunidad pasiva que los mantiene protegidos durante las primeras 3 a 4 semanas de vida. Debido a esto, se pueden observar brotes en grupos de lechones de entre 3 a 6 semanas de edad. Posiblemente sea en la unidad de engorda en donde se presentan con más frecuencia los brotes agudos, debido al mezclado de animales infectados crónicamente que actúan como portadores. A este nivel es difícil el establecimiento de inmunidad del grupo debido principalmente al continuo movimiento de cerdos con introducción de nuevos animales.<sup>39</sup>

**Por otra parte, el manejo en la granja es de suma importancia para el control de la neumonía:**

- 1. Evitando áreas o unidades con sobrepoblación.**
- 2. Disminuyendo el mezclado de animales con los de otras granjas.**
- 3. Implementando un método controlado de movimiento de animales.**

**El uso de bardas de concreto sólidas, que no permitan un contacto directo entre animales de corrales vecinos y un ambiente con higiene, temperatura y humedad adecuadas en la explotación, ayudará a mejorar el control de las neumonías.** <sup>33,35,39</sup>

## PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO.

### 1.13 Antecedentes.

El hombre ha estudiado grandemente los efectos del calor sobre él mismo y otros seres vivos, pero los estudios de la respuesta al choque térmico en sí, empiezan en 1962, con la publicación de un pequeño artículo en el cual se describía una nueva clase de elementos en los cromosomas de la glándula salival de la mosca de la fruta, *Drosophila busckii*, los elementos fueron inducidos por calor. En la siguiente década, la respuesta fue estudiada unicamente a nivel citológico pero se hicieron muchas observaciones importantes, entre las que destacaban las siguientes:

- a) Estos elementos son inducidos por muchos otros tratamientos de estrés.
- b) Son producidos en pocos minutos.
- c) Estan asociados con la síntesis de RNA.
- d) Se encuentran en otras especies de *Drosophila* y en diferentes tejidos.<sup>9,10</sup>

En 1973, Tissieres y Mitchel iniciaron el análisis molecular de la respuesta al reportar que la inducción de estos elementos coincide con la síntesis de un pequeño número de nuevas proteínas.<sup>2</sup>

No fué sino hasta 1978-1979 que los investigadores, trabajando con otros organismos, descubrieron que el calor y muchos otros tipos de estrés podrían inducir la síntesis de proteínas similares en cultivos de células de ave, en levaduras y en *Tetrahymena*. En los años siguientes, respuestas similares han sido reportadas en una extraordinaria variedad de organismos, las investigaciones de

la estructura y regulación genética en esos organismos son desarrolladas rápidamente, ahora se sabe que algunos genes después del choque térmico conservan no solamente sus secuencias codificadoras de proteínas sino también la regulación de las secuencias de las mismas.<sup>10,11</sup>

Desafortunadamente con respecto a su función, las investigaciones no han sido tan exitosas. La ubicuidad de la respuesta y la extraordinaria conservación de algunos de estos genes demuestran su importancia, es por esto que recientemente se ha prestado mucha atención para determinar que es lo que hacen estas proteínas. Hay evidencias, aunque no totalmente claras, de que estas proteínas dan protección contra los efectos tóxicos del estrés. Sin embargo los mecanismos de protección específicos no están completamente descritos.<sup>30</sup>



## **1.14 GENERALIDADES.**

Las células procariontes y eucariontes responden potencialmente a estímulos dañinos (tales como temperatura elevada), incrementando la síntesis de una familia de proteínas colectivamente conocidas como proteínas de estrés.<sup>4</sup> La mayoría de las proteínas de estrés (también conocidas como proteínas de choque) están entre las mayormente conservadas y abundantes en la naturaleza, estas han demostrado encontrarse entre los antígenos dominantes reconocidos por la respuesta inmune de entre un amplio espectro de patógenos.<sup>9</sup> Reportes recientes indican que la respuesta inmune contra las proteínas de choque puede presentar elevada reactividad cruzada y puede incluir reactividad contra ellas mismas. Algunos de estos reportes muestran que existe una actividad autoinmune contra las proteínas de estrés en artritis.<sup>15,55</sup> Otros sugieren que individuos sanos pueden tener la capacidad para responder a determinadas proteínas de estrés del mismo individuo de una forma que podría ayudar a eliminar sus propias células infectadas, transformadas o estresadas de alguna otra forma.<sup>24</sup>

## **1.15 LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE Y SU RESPUESTA AL ESTRÉS.**

De una a dos docenas de proteínas son inducidas en respuesta a diferentes tensiones, incluyendo choque térmico, disminución de nutrientes, inflamación, fiebre, irradiación, infección viral, transformación maligna, exposición a agentes oxidantes, iones de metales pesados, etanol y anoxia.<sup>18</sup> La mayoría de los estudios de estas proteínas son con respecto a choque térmico, en el cual, un incremento brusco en la temperatura induce el incremento en la síntesis de proteínas de estrés (HSP)<sup>17,34</sup>

Las proteínas de choque térmico hsp 90, hsp 70 y hsp 60, se encuentran en todos los procariontes y eucariontes. Son proteínas muy conservadas pues se ha encontrado que las hsp 70 tienen casi la mitad de los residuos de aminoácidos idénticos y muchos de los residuos restantes son similares. Las hsp 60 y hsp 90 son similares en su constitución.<sup>17</sup>

La mayoría de las proteínas de estrés están presentes en concentraciones de bajas a moderadas en células que no han sido sometidas a alguna tensión, pero estas tienden a acumularse en niveles elevados en células estresadas.<sup>34</sup>

El ejemplo más notable de esto, es la hsp 60 de *E. coli*, la cual cuenta con 1.6% de proteínas celulares bajo condiciones normales de crecimiento y puede acumular hasta el 15% de proteínas después de un choque térmico.<sup>3,32</sup>

En los eucariontes las hsp 60, hsp 70 y hsp 90 no se acumulan a esos niveles extremos, su rango va desde no detectable a moderadamente abundante, dependiendo del organismo y el incremento después del choque.

Las proteínas de choque tienen un papel vital en la célula libre de estrés. Las

hsp 60, 70 y 90 parecen estar involucradas en el ensamble y desensamble de las proteínas complejas, y miembros de la familia hsp 70 son importantes para la traslocación de ciertas proteínas a través de membranas intracelulares, cada una de estas proteínas de estrés parecen interactuar con muchas proteínas diferentes. Por ejemplo, se ha visto que la hsp 90 interactúa con receptores de hormonas esteroideas y con virus y cinasas celulares. Miembros de las familias hsp 70 unen al DNA replicado.<sup>16,17</sup> La hsp 60 de las plantas, interactúa con RUBISCO, la cual fija el CO<sub>2</sub> en los cloroplastos y quizá sea la proteína mas abundante en la biosfera. Otras interacciones han sido descritas, y probablemente, otras aún no han sido descubiertas.<sup>16</sup>

Las proteínas de choque térmico y otras proteínas de estrés, están ciertamente involucradas en la protección de la célula de un deterioro por efecto del calor u otras tensiones. Por ejemplo, la mayoría de las hipótesis proponen que las proteínas de choque térmico son importantes por su termotolerancia y pueden ayudar al ensamble y plegamiento de muchas proteínas bajo condiciones adversas.<sup>17</sup>

## 1. 16 LAS PROTEINAS DE ESTRES PATOGENAS COMO BLANCO DE LA RESPUESTA INMUNE.

Se han hecho estudios de los antígenos involucrados en la respuesta inmune contra el bacilo de la tuberculosis y la lepra, los cuales conducen a la conclusión de que una variedad de proteínas de choque se encuentran entre los blancos más fuertes de la respuesta inmune.<sup>19</sup> En una inmunización experimental en ratón con lisados de micobacterias, se observó una respuesta humoral al menos contra seis antígenos proteicos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* revelando que los mayores blancos de la respuesta humoral son hsp 70 y hsp 60. Dos hsp adicionales, una de 18 kd, miembros de la familia de hsp pequeñas y una de 12 kd se encontraron entre los antígenos de *M. tuberculosis* y *M. leprae*. Las proteínas de estrés de *Mycobacterium* se encuentran entre los blancos inmunodominantes ya sea para anticuerpos o para células T.<sup>42</sup>

Los antígenos de una amplia variedad de agentes infecciosos han sido identificados como miembros de las familias de las proteínas de estrés, muchas de las cuales son antígenos reconocidos por anticuerpos en infecciones bacterianas, especialmente la hsp 60.<sup>29</sup>

Las proteínas de estrés también han sido identificadas como blancos inmunes en la mayoría de las infecciones parasitarias humanas. Miembros de las familias de las HSP 70 y HSP 60 representan los mayores blancos para los anticuerpos en muchas infecciones con helmintos, protozoarios y bacterias. Los anticuerpos contra HSP 70 han sido descritos en infecciones con *Plasmodium falciparum* (malaria), *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas), *Leishmania donovani*

(leishmaniasis visceral), *Leishmania major* (leishmaniasis cutánea), *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum* (esquistosomiasis), *Brugia malayi* (filariasis linfática), *Onchocerca volvulus* (oncocercosis), *Mycobacterium leprae* (lepra) y *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis). La HSP 65 (la cual se encuentra en la familia de las HSP 60) es el antígeno más común entre las especies bacterianas patógenas, incluyendo, *Mycobacterium leprae* (lepra), *M. tuberculosis* (tuberculosis), *Treponema pallidum* (sífilis), *Legionella pneumophila* (enfermedad de legionariosis), *Borrelia burgdorferi*, y *Chlamydia trachomatis* (tracoma ocular). La HSP 90 es también el blanco de los anticuerpos en tripanosomiasis y un miembro de la familia de las HSP pequeñas es reconocida en algunos pacientes con esquistosomiasis.<sup>21,23,24</sup>

El por qué las proteínas de estrés son el blanco de la respuesta inmune de un amplio espectro de infecciones se atribuye principalmente a tres factores:

- 1) La abundancia de estas proteínas bajo condiciones de estrés, podrían jugar un papel importante. La bacteria podría sufrir estrés como respuesta a las condiciones hostiles impuestas por las células del hospedero.
- 2) Algunas proteínas de estrés, pueden ser intrínsecamente antigénicas. Por ejemplo, ellas pueden ser particularmente susceptibles a procesamiento y presentación de antígeno al sistema inmune por las células presentadoras de antígeno.
- 3) Finalmente, es posible que la memoria inmunológica para esas proteínas sea generada al inicio de la vida y sea periódicamente reestimulada por infecciones subsecuentes.<sup>25,56</sup>

## 1.17 INDUCCION DE LAS PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO.

Las células de *Drosophila* crecen normalmente a 25 °C. Las proteínas de choque térmico son inducidas cuando el rango de temperatura va de 29-38 °C, pero la máxima respuesta se observa entre los 36-37 °C. A tales temperaturas, el mensaje de choque térmico es producido en cuatro minutos. En una hora, miles de transcripciones son presentadas por la célula. Al mismo tiempo, ambos, la transcripción y la traducción de los mensajes existentes son reproducidos. Los mensajes del choque térmico aparecen en el citoplasma unos pocos minutos después de la elevación de la temperatura y son inmediatamente traducidos con mucha eficiencia.<sup>24,45</sup> Cuando las células son regresadas a su temperatura óptima, la síntesis normal de proteínas va reanudándose gradualmente, el tiempo en que vuelve a la normalidad la célula depende de la severidad del choque térmico. La inducción de las proteínas de choque térmico en otros organismos es igualmente rápida, pero la temperatura de inducción máxima varía de acuerdo con el rango de exposición experimental. En el salmón y la trucha, la máxima respuesta se observa alrededor de los 28 °C, en el limo a los 30 °C, en los erizos de mar a 30-32 °C, en levaduras a 39 °C, en plantas de maíz de 40-45 °C, en *Escherichia coli* de 45-50 °C y en *Halobacterium* a 60 °C. En la mayoría de los organismos el intervalo de temperatura alcanza su respuesta máxima de 10-15 °C arriba del rango de temperatura óptima de crecimiento, aunque se ha observado que una gran cantidad de microorganismos tienen un rango de crecimiento más restringido y su respuesta máxima la alcanzan a una temperatura 5 °C arriba de su temperatura óptima de crecimiento óptimo.<sup>42</sup>

## **2. HIPOTESIS.**

Se sabe que los organismos, tanto eucariotes como procariotes, responden a estímulos dañinos (estrés) sintetizando algunas proteínas que protegen a las células, es por esto que pensamos que si *Actinobacillus pleuropneumoniae* es sometido a condiciones de estrés (choque térmico), éste deberá responder a dicho estímulo sintetizando proteínas que mantengan la autointegridad de la bacteria, en este caso estaríamos hablando de las proteínas de choque térmico (HSP), estas proteínas tienen un tiempo y una temperatura óptimos de expresión, de tal modo que si controlamos estos parámetros podremos establecer las condiciones óptimas de inducción de dichas proteínas.

### **3. OBJETIVOS.**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL.**

- 3.1.1 Inducir e identificar las Proteínas de Choque Térmico (HSP) en *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

- 3.2.1 Determinar la temperatura óptima para la expresión de proteínas de choque térmico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1.
- 3.2.2 Determinar la variación en el patrón electroforético al someter las células al estrés.
- 3.2.3 Determinar el peso molecular de las proteínas de choque térmico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1.
- 3.2.4 Establecer la antigenicidad de las proteínas de choque térmico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 en el cerdo.



## **4. MATERIALES Y METODOS.**

### **4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.**

#### **4.1.1. CEPAS.**

- Cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1
- Cepa Cowan de *Staphylococcus aureus*

Obtenidas de la colección del Laboratorio de Inmunología de la FES-C, UNAM.

#### **4.1.2. SUEROS.**

Los sueros porcinos tanto positivos como negativos a *Actinobacillus pleuropneumoniae* fueron obtenidos de granjas de la zona de Morelia, Michoacán.

Se utilizaron 3 conejos Nueva Zelanda con aproximadamente 2 kg. de peso para la obtención de los sueros hiperinmunes, de acuerdo al protocolo de inmunización mostrado en la tabla III.<sup>47</sup>

**TABLA III. PROTOCOLO DE INMUNIZACION.**

DIA	DOSIS	VIA
0	0.5 ml. de susp. bacteriana inactivada D.O. = 1	I.V.
3	1.0 ml. de susp. bacteriana inactivada D.O. = 1	I.V.
8	2.0 ml de susp. bacteriana inactivada D.O. = 1	I.V
11	5.0 ml de susp. bacteriana inactivada D.O. = 1	I.V.
15	3.0 ml de susp. bacteriana activa D.O.= 1	I.V.
22	3.0 ml de susp. bacteriana activa D.O.= 1	I.V.
29	sangrado	

I.V. = Intravenosa

## 4.2 REACTIVOS.

Todos los reactivos empleados fueron de marca Baker, Merck y Sigma de grado analítico y los medios de cultivo fueron marca Bioxon. El conjugado de proteína A peroxidada fué de marca SIGMA.

### 4.2.1 Soluciones preparadas (ver apéndice 1)

- Solución salina fisiológica
- Solución triton X-100 al 2%
- Reactivo de Bradford
- Amortiguador tris-HCl pH = 7.4
- Amortiguador tris-HCl pH = 6.8
- Amortiguador tris-HCl pH = 8.8
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10%
- TEMED
- Persulfato de amonio
- Solución desteñidora I
- Solución desteñidora II
- Amortiguador de electrodos
- Amortiguador de muestra
- Acrilamida-bisacrilamida 30%
- Salina-tris (TBS) pH = 7.5
- TTBS
- Solución bloqueadora
- Buffer de corrimiento para la transferencia
- Solución negro de amido al 0.01%
- Solución desteñidora (transferencia)

## 4.3 MEDIOS DE CULTIVO.

Se utilizaron medios de cultivo de tipo convencional, a excepción del agar BHI suplementado con NAD al 0.01%.<sup>46</sup>

## **4.4 PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO.**

### **4.4.1 Tinción de Gram.<sup>1,6</sup>**

### **4.4.2 Prueba de satelitismo.<sup>1,28</sup>**

Se realizó inoculando en toda la placa de agar BHI la cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, colocando posteriormente un inóculo de la cepa nodriza (*S. aureus*) en forma perpendicular al estriado de la bacteria examinada. Una reacción positiva fué considerada cuando *A. pleuropneumoniae* creció en la periferia de la cepa nodriza.

### **4.4.3 Prueba de CAMP.<sup>1,28</sup>**

Es la capacidad para aumentar la hemólisis producida por una toxina de *Staphylococcus aureus* ( $\beta$ -lisina). Esta se realizó haciendo una inoculación a lo largo de toda una placa de agar sangre colocando posteriormente un inóculo de la cepa nodriza en forma perpendicular al estriado de la bacteria examinada. Una placa CAMP positiva fué aquella que mostró una hemólisis completa en la zona de colonias cercanas a la cepa nodriza.

### **4.4.4. Prueba de ureasa.<sup>1,28</sup>**

#### 4.5 INDUCCION DE LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO.<sup>31,45</sup>

- a) Se sembró *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 en 15 cajas de agar BHI suplementado con NAD.
- b) Se incubaron las cajas durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.
- c) Concluida la incubación se procedió a cosechar las 15 cajas con solución salina fisiológica.
- d) Se resuspendieron perfectamente las bacterias en la solución salina.
- e) Se añadieron 10 ml. de la cosecha a 6 tubos de polipropileno para centrifuga refrigerada ( 50 ml) los cuales contenian 20 ml de caldo BHI.
- f) Se incubaron todos los tubos a 39, 42 y 50 °C durante los siguientes tiempos de acuerdo a los datos de la tabla IV.

TABLA IV. TIEMPO DE INCUBACION DE LA COSECHA DE *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.

No. TUBO	1	2	3	4	5	6
TIEMPO (Hrs) a 39 °C	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0

Se siguió el mismo procedimiento para las temperaturas de 42 y 50 °C.

#### **4.6 OBTENCION DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES** <sup>47,48,49</sup>

Para obtener las membranas de la bacteria, al término de cada uno de los tiempos de incubación se les dió el siguiente tratamiento:

- a) Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos.
- b) Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con solución salina fisiológica.
- c) Se resuspendió la pastilla en 10 ml de solución salina fisiológica.
- d) Se sonicó durante 10 minutos o hasta que no quedaban células completas.
- e) Centrifugamos durante 15 minutos a 3000 rpm para separar las células completas que hayan quedado.
- f) Se desechó la pastilla y el sobrenadante se centrifugó a 20 000 rpm durante una hora para separar las membranas.
- g) Se resuspendieron las pastillas en 1 ml de agua desionizada.
- h) Se procedió a la cuantificación de proteínas.

#### **4.7 CUANTIFICACION DE PROTEINAS (METODO DE BRADFORD).**

La cuantificación de proteínas se hizo para cada uno de los tubos incubados por medio del método de Bradford <sup>5</sup>, el cual en resumen se realiza de la siguiente forma:

#### 4.7.1 PREPARACION DEL REACTIVO.

Se disuelven 100 mg de azul de Comassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%, a esta solución se le adicionan 100 ml de ácido fosfórico al 85% y se afora a un litro.

#### 4.7.2 PREPARACION DE LOS ESTANDARES DE PROTEINA.

Se prepara un estándar de albúmina al 0.01% y se utiliza para la siguiente curva de calibración (tabla V).

**TABLA V.** Preparación de los estándares para la curva de calibración (Metodo de Bradford).

TUBO	1	2	3	4	5	6	7
Albúmina (ml)	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
Agua Destilada (ml)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	-	-
Solución Problema (ml)	-	-	-	-	-	-	0.1
Reactivo de Bradford (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

## 4.8 SOLUBILIZACION DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES.<sup>49</sup>

- a) Se resuspendieron cada una de los extractos membranales en triton X-100 al 2% en amortiguador Tris 10 mM pH = 7.4 en proporción de 1  $\mu$ l de triton por cada  $\mu$ g de proteína.
- b) Se agitó la muestra y se incubó a 37 °C durante 30 minutos para solubilizar las membranas.

## 4.9 ELECTROFORESIS DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES.

### Geles discontinuos de Poliacrilamida - Dodecilsulfato de sodio (SDS - PAGE)<sup>23,47</sup>

#### 4.9.1 Gel de separación.

Tris (Hidroximetilamino-metano) 2M, pH 8.8	2.50 ml
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	0.10 ml
Acrilamida (30% acrilamida y 0.8% bis-acrilamida)	4.00 ml
Persulfato de amonio ( 10% )	0.50 ml
Agua destilada	3.00 ml
TEMED (N,N,N',N' tetrametiletilendiamino)	20.00 $\mu$ l

La mezcla se vertió rápidamente a la cámara de electroforesis guardando una pequeña cantidad para observar el momento de la polimerización.

#### 4.9.2 Gel de condensación.

Tris 2M , pH 6.8	2.50 ml
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	0.10 ml
Acrilamida (30% acrilamida y 0.8% bisacrilamida)	1.3 ml
Persulfato de amonio (10%)	0.50 ml
Agua destilada	6.10 ml
TEMED (N,N,N',N' tetrametiletilendiamino)	10.00 $\mu$ l



Se adiciona la mezcla sobre el gel de separación con cuidado y rapidez, quedando una pequeña cantidad en el matraz, se colocó el peine de 10 dientes, el cual se retiró cuando el gel hubo polimerizado, quedando pozos bien definidos.

#### **4.9.3 Corrimiento de las muestras**

Se colocaron los microlitros suficientes de muestra que contuvieran como mínimo 20  $\mu\text{g}$  de proteína en tubos de ensaye debidamente etiquetados, se les agregó la solución digestora (en proporción 1:4 respectivamente) se mezclaron y se hirvieron en baño maría durante 4 minutos. Posteriormente con ayuda de una jeringa Hamilton se colocaron en los pozos 25  $\mu\text{l}$  de cada una de las seis muestras de extracto membranal (en orden creciente de tiempo de incubación), junto con las muestras problema, se corrió en un pozo adyacente una muestra de proteínas de peso molecular conocido, con la finalidad de tomarlas como referencia y poder hacer el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas desconocidas presentes en las muestras. La electroforesis se corrió a 100 volts a temperatura ambiente, hasta el momento en que el colorante que sirve de referencia llegó al final del gel de separación<sup>12,13</sup>

#### **4.9.4 Tinción de los geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio con Azul de Coomassie R-250**

Se desensamblaron los moldes del gel cuidadosamente, se cortó el gel concentrador del gel separador y se colocó este último en la solución teñidora durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se sacó cuidadosamente y se colocó durante 4 horas en solución desteñidora I.

Posteriormente se transfirió a la solución desteñidora II hasta que el colorante en el gel se eliminó y las bandas de proteínas se distinguieron perfectamente.

#### **4.9.5 Curva patrón de movilidad relativa de proteínas.**

Las proteínas patrón siguieron el mismo tratamiento anterior, una vez hecho esto, se trazó una gráfica que muestra la relación entre los logaritmos de los pesos moleculares de las proteínas conocidas (eje de las X) y la movilidad relativa de las proteínas en el gel de poliacrilamida (eje de las Y). Esta relación es directamente proporcional y por lo tanto debe formar una línea recta.

#### 4.9.6 Cálculo del coeficiente de movilidad relativa de las proteínas.<sup>12</sup>

La movilidad relativa de las proteínas contenidas en las muestras es el desplazamiento que tienen con respecto a la distancia total que corre la muestra, dato que se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente de Movilidad Relativa (Rf)} = \frac{D_{\text{proteínas}}}{D_{\text{muestras}}}$$

$D_{\text{proteínas}}$  = distancia recorrida por las proteínas (bandas)

$D_{\text{muestras}}$  = distancia recorrida por las muestras (total)

#### **4.10 ELECTROTRANSFERENCIA.** <sup>12,48,56</sup>

- 1. Se tomó con cuidado el gel con las proteínas a transferir y se colocó sobre un papel filtro previamente humedecido con el amortiguador de transferencia, se colocaron los integrantes del sistema en el siguiente orden:**

acrílico  
fibra  
papel filtro  
papel de nitrocelulosa  
gel de poliacrilamida  
papel filtro  
fibra  
acrílico

- 2. Se introdujo en una cámara para electrotransferencia y se corrió a 20 volts durante 24 horas.**
- 3. Una vez transferidas las proteínas, se separó el papel de nitrocelulosa y se cortó en tiras.**
- 4. Se pasó cada tira a un tubo de ensayo y se marcaron cuidadosamente.**
- 5. Las tiras fueron sumergidas durante 2 horas en una solución bloqueadora, consistente en amortiguador TBS pH 7.4 con leche descremada al 5%.**
- 6. Posteriormente las tiras se sumergieron durante cuatro horas en una solución que contenía una dilución de sueros de cerdo (1:50).**
- 7. Las tiras fueron transferidas a tubos con buffer TTBS con el fin de remover el exceso de suero.**
- 8. Se repitió el paso anterior por lo menos tres veces.**
- 9. Una vez enjuagadas las tiras se transfirieron a tubos que contienen una dilución 1:100 de proteína A peroxidada, la cual se unirá a los anticuerpos que se hayan unido al papel y se mantiene en agitación durante dos horas.**

- 10. Terminado el tiempo del paso anterior se transfirieron a un buffer TTBS para eliminar el exceso de proteina A.**
- 11. Se repitió el paso anterior tres veces mínimo para evitar revelado inespecífico de la proteina A.**
- 12. Se reveló la peroxidasa con solución de  $\alpha$ -cloronaftol.**

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. Pruebas de identificación de *A. pleuropneumoniae*.

Los resultados de las pruebas realizadas para la identificación del *Actinobacillus pleuropneumoniae* se resumen en la tabla VI, estos resultados nos permiten confirmar que el microorganismo con el que trabajamos es efectivamente *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Las pruebas de identificación del microorganismo se realizaron continuamente en el transcurso de todo el trabajo para corroborar la pureza de los cultivos utilizados.

**TABLA VI. Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* utilizadas durante la experimentación.**

PRUEBA	RESULTADO
Tinción gram	NEGATIVO
Morfología	Bacilo pequeño, pleomórfico, ocasionalmente formando cadenas
Satelitismo	POSITIVO
CAMP	POSITIVO
Ureasa	POSITIVO

## **5.2. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES.**

### **5.2.1 Lisado de las bacterias.**

Se obtuvo un concentrado de células con una consistencia viscosa, de color ligeramente amarillo.

### **5.2.2 Separación de las membranas.**

Se obtuvieron aproximadamente de 20-30 mg de una pastilla amarillenta, la cual se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua desionizada.

### **5.2.3. Análisis del extracto membranal.**

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras, se hicieron curvas patrón, las cuales se muestran en las figuras 1, 2 y 3 y los valores de estas curvas se resumen en las tablas VII, VIII y IX.

Los resultados del contenido proteico de cada una de las muestras se resumen en las tablas X, XI y XII.

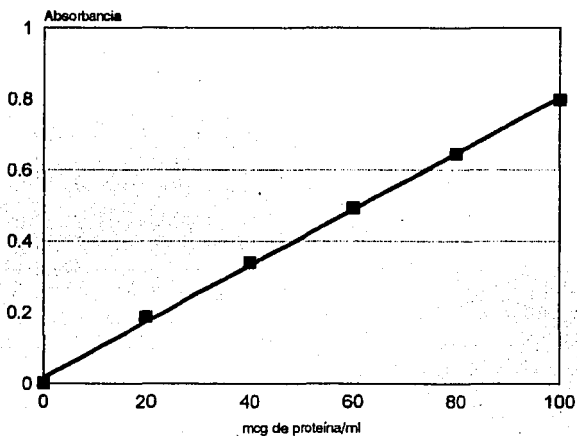
**TABLA VII. VALORES CALCULADOS PARA LA CURVA PATRON DE PROTEINAS DE LOS EXTRACTOS BACTERIANOS QUE FUERON INCUBADOS A 39° C, SIGUIENDO LA METODOLOGIA DE BRADFORD.<sup>5</sup>**

<b>[PROTEINAS] μg/μl</b>	<b>ABSORBANCIA</b>
0	0
20	0.187
40	0.339
60	0.492
80	0.644
100	0.797

La gráfica correspondiente se muestra en la figura 1 cuyos valores de regresión lineal son:  $r^2=0.99$ ,  $m=0.0072$  y  $b=0.0343$ .



**FIG. 1 CURVA PATRON PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINAS (METODO DE BRADFORD)**



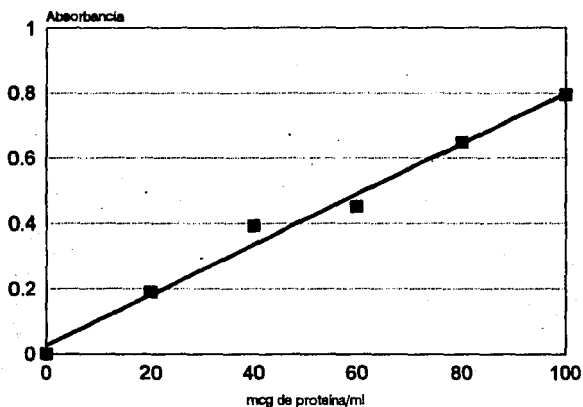
La curva patron se empleó para determinar la concentración proteica de los extractos membranales de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 a 39°C. Los resultados se muestran en la tabla X.

**TABLA VIII. VALORES CALCULADOS PARA LA CURVA PATRON DE PROTEINAS DE LOS EXTRACTOS BACTERIANOS QUE FUERON INCUBADOS A 42 °C, SIGUIENDO LA METODOLOGIA DE BRADFORD5.**

<b>[PROTEINAS] µg/µl</b>	<b>ABSORBANCIA</b>
<b>0</b>	<b>0</b>
<b>20</b>	<b>0.190</b>
<b>40</b>	<b>0.392</b>
<b>60</b>	<b>0.450</b>
<b>80</b>	<b>0.648</b>
<b>100</b>	<b>0.794</b>

La gráfica correspondiente es mostrada en la figura 2, cuyos valores de regresión lineal son:  $r^2=0.98$ ,  $m=0.0071$  y  $b=0.0724$ .

**FIG.2 CURVA PATRON PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINAS (METODO DE BRADFORD)**



Curva patrón empleada para determinar la concentración de proteínas de los extractos membranales de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 incubado a 42°C. Los resultados se muestran en la tabla XI.

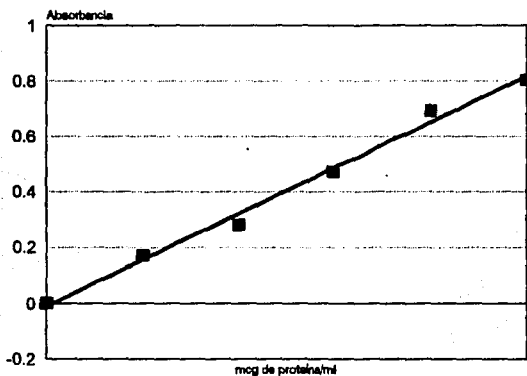
**TABLA IX.**

**VALORES CALCULADOS PARA LA CURVA PATRON DE PROTEINAS DE LOS EXTRACTOS BACTERIANOS QUE FUERON INCUBADOS A 50 °C SIGUIENDO LA METODOLOGIA DE BRADFORD.<sup>5</sup>**

<b>[PROTEINAS] µg/µl</b>	<b>ABSORBANCIA</b>
<b>0</b>	<b>0</b>
<b>20</b>	<b>0.170</b>
<b>40</b>	<b>0.280</b>
<b>60</b>	<b>0.473</b>
<b>80</b>	<b>0.691</b>
<b>100</b>	<b>0.803</b>

La gráfica correspondiente es mostrada en la figura 3, cuyos valores de regresión lineal son:  $r^2=0.99$ ,  $m=0.0086$  y  $b=0.0031$

**FIG. 3 CURVA PATRON PARA LA  
CUANTIFICACION DE PROTEINAS  
(METODO DE BRADFORD)**



Curva patron empleada para la cuantificacion de proteínas de los extractos membranales de A. pleuropneumoniae serotipo 1 incubado a 50 °C. Los resultados se muestran en la tabla XII.

**TABLA X.**

**MUESTRA EL CONTENIDO PROTEICO DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 CALCULADOS USANDO LA METODOLOGIA DE BRADFORD<sup>5</sup>. (LA TEMPERATURA DE INCUBACION FUE DE 39 °C)**

<b>TIEMPO (HRS.)</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>[PROTEINAS] <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math></b>
<b>0</b>	<b>0.494</b>	<b>60.28</b>
<b>0.5</b>	<b>0.496</b>	<b>60.55</b>
<b>1</b>	<b>0.496</b>	<b>60.55</b>
<b>2</b>	<b>0.498</b>	<b>60.81</b>
<b>3</b>	<b>0.494</b>	<b>60.28</b>
<b>4</b>	<b>0.498</b>	<b>60.81</b>

**TABLA XI.**

**MUESTRA EL CONTENIDO PROTEICO DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1. CALCULADOS USANDO LA METODOLOGIA DE BRADFORD (LA TEMPERATURA FUE DE 42 °C).**

<b>TIEMPO (HRS.)</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>[PROTEINAS] μg/μl</b>
<b>0</b>	<b>0.594</b>	<b>73.55</b>
<b>0.5</b>	<b>0.643</b>	<b>80.25</b>
<b>1</b>	<b>0.649</b>	<b>81.09</b>
<b>2</b>	<b>0.648</b>	<b>80.95</b>
<b>3</b>	<b>0.649</b>	<b>80.09</b>
<b>4</b>	<b>0.645</b>	<b>80.53</b>

**TABLA XII.**

**MUESTRA EL CONTENIDO PROTEICO DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1. CALCULADOS USANDO LA METODOLOGIA DE BRADFORD<sup>5</sup>. (LA TEMPERATURA DE INCUBACION FUE DE 50 °C).**

<b>TIEMPO (HRS.)</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>[PROTEINAS] <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math></b>
<b>0</b>	<b>0.614</b>	<b>75.61</b>
<b>0.5</b>	<b>0.596</b>	<b>73.43</b>
<b>1</b>	<b>0.559</b>	<b>68.94</b>
<b>2</b>	<b>0.538</b>	<b>66.39</b>
<b>3</b>	<b>0.529</b>	<b>65.21</b>
<b>4</b>	<b>0.515</b>	<b>63.60</b>

### **5.3 ELECTROFORESIS.**

Se ensayaron varias concentraciones de los geles de poliacrilamida que fueron de 7 a 12%, siendo esta última la que mostró un patrón electroforético mejor definido.

Los valores de movilidad relativa (Rf) de las proteínas de peso molecular conocido se muestran en las tablas XIII, XIV y XV.

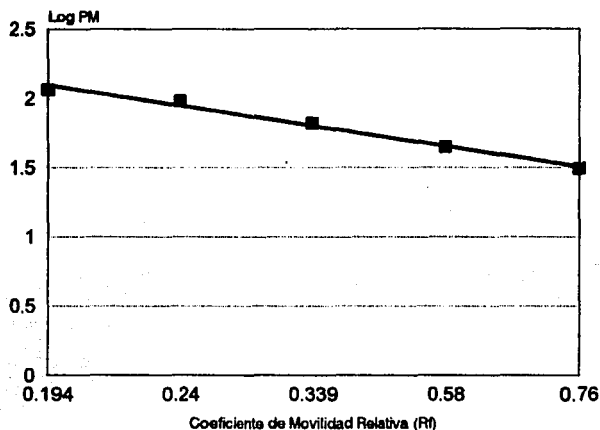


**TABLA XIII. VALORES DEL COEFICIENTE DE MOVILIDAD RELATIVA (Rf). DE LAS PROTEINAS PATRON EMPLEADAS PARA EL CALCULO DE LOS PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1. (LA TEMPERATURA DE INCUBACION FUE DE 39°C).**

PROTEINA	PESO MOLECULAR	log P.M.	Rf
<b>β-GALACTOSIDASA</b>	116.25	2.06	0.194
<b>FOSFORILASA B</b>	97.4	1.98	0.240
<b>ALBUMINA BOVINA</b>	66.2	1.82	0.339
<b>OVOALBUMINA</b>	45	1.65	0.580
<b>ANHIDRASA CARBONICA</b>	31	1.49	0.760

La gráfica correspondiente se muestra en la figura 4, los valores de regresión lineal son:  $r^2=0.98$ ,  $m=-0.96$  y  $b=2.21$ .

**FIG. 4 CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA DE *A. pleuropneumoniae*.**



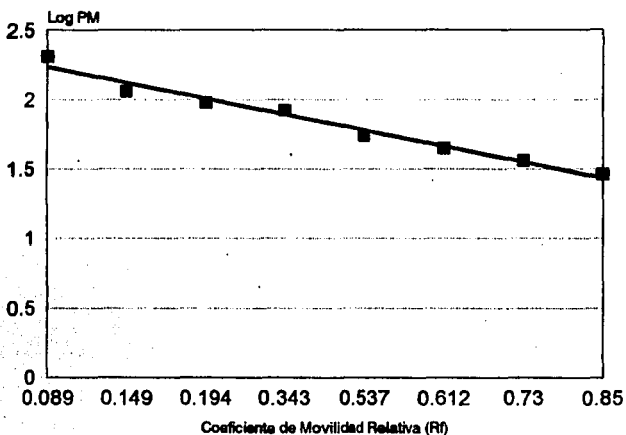
La curva patron fué empleada para calcular los pesos moleculares de las proteínas del extracto membranal de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 incubado a 39°C, de acuerdo al patron electroforetico correspondiente. (Fig. 7)

**TABLA XIV. VALORES DEL COEFICIENTE DE MOVILIDAD RELATIVA (Rf) DE LAS PROTEINAS PATRON EMPLEADAS PARA EL CALCULO DE LOS PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1. (LA TEMPERATURA DE INCUBACION FUE DE 42 °C).**

PROTEINA	PESO MOLECULAR	log P.M.	Rf
MIOSINA	205	2.31	0.089
$\beta$ -GALACTOSIDASA	116	2.06	0.149
FOSFORILASA B	97	1.98	0.194
FRUCTOSA-6-FOSFATOCINASA	84	1.92	0.343
GLUTAMICO DESHIDROGENASA	55	1.74	0.537
OVOALBUMINA	45	1.65	0.612
GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA	36	1.56	0.73
ANHIDRASA CARBONICA	29	1.46	0.85

La gráfica correspondiente se muestra en la figura 5 y los valores de regresión lineal son:  $r^2 = 0.95$ ,  $m = -0.97$  y  $b = 2.26$ .

**FIG.5 CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA DE *A. pleuropneumoniae*.**



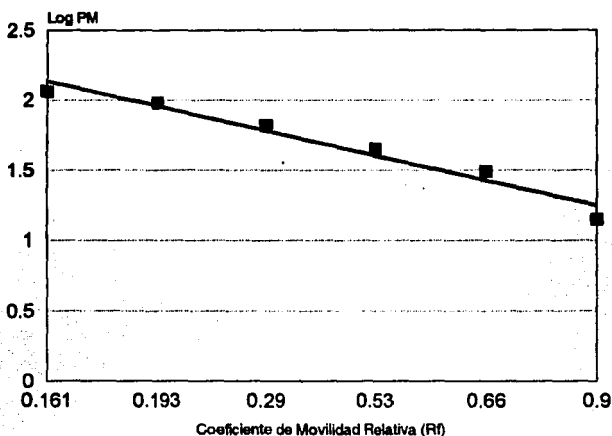
Curva patron empleada para calcular los pesos moleculares de las proteínas del extracto membranal de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 incubado a 42°C, de acuerdo al patron electroforético correspondiente (Fig.8)

**TABLA XV. VALORES DEL COEFICIENTE DE MOVILIDAD RELATIVA (Rf) DE LAS PROTEINAS PATRON EMPLEADAS PARA EL CALCULO DE LOS PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES DE Actinobacillus pleuropneumoniae SEROTIPO 1.(LA TEMPERATURA DE INCUBACION FUE DE 50° C).**

PROTEINA	PESO MOLECULAR	log P.M.	Rf
<b>β-GALACTOSIDASA</b>	116.25	2.06	0.161
<b>FOSFORILASA B</b>	97.4	1.98	0.193
<b>ALBUMINA BOVINA</b>	66.2	1.82	0.29
<b>OVOALBUMINA</b>	45	1.65	0.53
<b>ANHIDRASA CARBONICA</b>	31	1.49	0.66
<b>LISOZIMA</b>	14.4	1.15	0.90

La gráfica correspondiente se muestra en la figura 6, los valores de la regresión lineal son:  $r^2 = 0.98$ ,  $m = -1.15$  y  $b = 2.21$ .

**FIG. 6 CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA DE *A. pleuropneumoniae*.**



Curva patron empleada para calcular los pesos moleculares de las proteínas del extracto membranal de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 incubado a 50°C, de acuerdo al patron electroforético correspondiente (Fig 9).

En el patrón electroforético, (figs. 7,8,9,) se puede observar que existe una gran cantidad de bandas en común entre los 6 tiempos trabajados así como entre las 3 temperaturas, observando solo diferencia en la intensidad y/o definición de las mismas. Los pesos moleculares de cada una de las bandas observadas a 39, 42 y 50°C se resumen en las tablas XVI, XVII y XVIII respectivamente.

**TABLA XVI.**

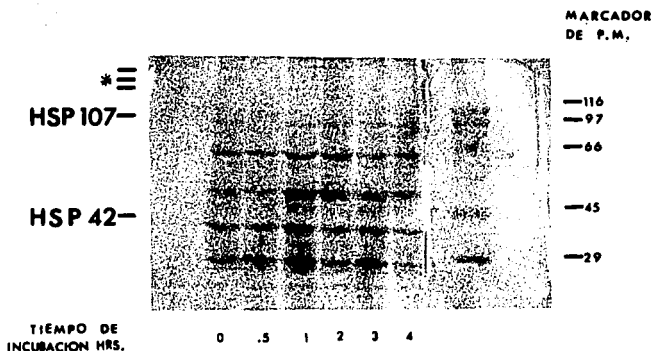
**PESOS MOLECULARES APROXIMADOS DE LAS PROTEINAS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS MEMBRANALES DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1 A LAS 4 HORAS DE INCUBACION. ( Ref. FIG. 7).**

RI	PESO MOLECULAR
0.048	146.4
0.080	136.25
0.129	122.30
0.177	109.79
0.220	97.56
0.258	91.71
0.274	88.47
0.338	76.60
0.370	71.29
0.483	54.41
0.548	47.98
0.629	40.08
0.677	35.98
0.709	33.48
0.758	30.05
0.79	27.90
0.951	19.51

La temperatura de incubación fué de 39° C. En la tabla solo se muestran los pesos moleculares de las bandas proteicas mejor definidas en el patrón electroforético correspondiente.



**FIG. 7 PATRON ELECTROFORETICO DEL EXTRACTO MEMBRANAL DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1 (TEMPERATURA DE CHOQUE: 39 °C).**



\* 146, 136, 122 KDa.

La figura muestra el corrimiento electroforético de los cultivos bacterianos incubados a 39 °C durante 4 horas de exposición al choque térmico, no se observa variación con respecto a la intensidad y definición de las bandas proteicas conforme transcurre el tiempo de incubación de los cultivos bacterianos, sin embargo, se hacen notar 2 bandas cuyos pesos moleculares son de 42 y 107 KDa, estas proteínas son las que a 42 °C aumentan su intensidad. La temperatura de 39 °C es tomada como temperatura de control negativo.

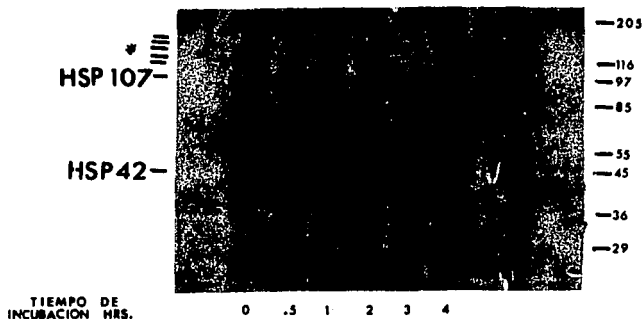
**TABLA XVII.**

**PESOS MOLECULARES APROXIMADOS DE LAS PROTEINAS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS MEMBRANALES DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1, A LAS 4 HORAS DE INCUBACION. (Ref. FIG. 8).**

<b>Rf</b>	<b>PESO MOLECULAR</b>
0.119	139.86
0.134	135.14
0.149	130.70
0.179	122.25
0.194	118.23
0.238	106.94
0.298	94.55
0.328	87.50
0.343	84.62
0.358	81.84
0.388	76.55
0.417	71.60
0.447	62.63
0.522	56.66
0.537	54.79
0.552	52.99
0.597	47.93
0.656	41.93
0.716	36.69
0.806	30.01
0.865	27.26
0.910	23.75
0.955	21.48

La temperatura de incubación fué de 42°C. En la tabla solo se muestran los pesos moleculares de las bandas proteicas mejor definidas en el patrón electroforético correspondiente.

**FIG. 8 PATRON ELECTROFORETICO DEL EXTRACTO MEMBRANAL DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1. ( TEMPERATURA DE CHOQUE: 42 °C).**



■ 140, 135, 130, 122, 118 KDA.

La figura muestra el corrimiento electroforético de los cultivos bacterianos incubados a 42 °C durante 4 horas de exposición al choque térmico, se observa una ligera variación en la definición de las bandas conforme aumenta el tiempo de exposición. Las proteínas de 42 y 107 KDa muestran un aumento en definición e intensidad un poco mas marcado, lo cual nos sugiere que estas sean proteínas de choque térmico.

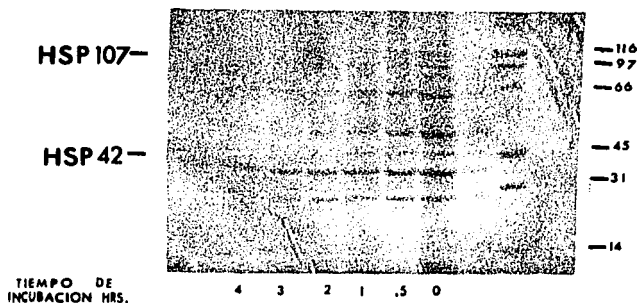
**TABLA XVIII.**

**PESOS MOLECULARES APROXIMADOS DE LAS PROTEINAS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS MEMBRANALES DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1, A LAS 4 HORAS DE INCUBACION. ( Ref. FIG. 9).**

<b>Rf</b>	<b>PESO MOLECULAR</b>
<b>0.161</b>	<b>79.3</b>
<b>0.177</b>	<b>75.2</b>
<b>0.193</b>	<b>71.3</b>
<b>0.241</b>	<b>61.8</b>
<b>0.306</b>	<b>51.4</b>
<b>0.354</b>	<b>45.0</b>
<b>0.419</b>	<b>37.8</b>
<b>0.451</b>	<b>34.6</b>
<b>0.516</b>	<b>28.7</b>
<b>0.596</b>	<b>22.5</b>
<b>0.703</b>	<b>15.3</b>

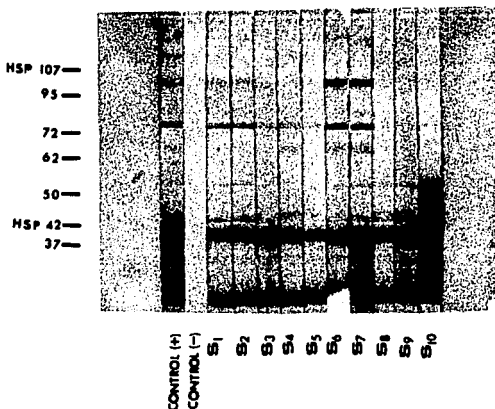
**La temperatura de incubación fué de 50 °C. En la tabla solo se muestran los pesos moleculares de las bandas proteicas mejor definidas en el patrón electroforético correspondiente.**

**FIG. 9 PATRON ELECTROFORETICO DEL EXTRACTO MEMBRANAL DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1. (TEMPERATURA DE CHOQUE 50 °C)**



La figura muestra el corrimiento electroforético de los cultivos bacterianos incubados a 50 °C durante cuatro horas de exposición al choque térmico, se observa una disminución progresiva en la intensidad y definición de las bandas proteicas posiblemente debido a la desnaturalización de las mismas a esta temperatura.

**FIG. 10 TRANSFERENCIA DEL PATRON ELECTROFORETICO DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1.**



S<sub>1</sub>-S<sub>10</sub> : SUEROS POSITIVOS DE CERDOS INFECTADOS CON *A. pleuropneumoniae* SEROTIPO 1.

CONTROL (+): SUERO HIPERINMUNE OBTENIDO EN CONEJO.

CONTROL (-): SUERO DE RATON.

La figura muestra la transferencia a papel de nitrocelulosa del corrimiento electroforético de los cultivos bacterianos incubados a 42 °C durante 4 horas, aquí podemos observar que si hay proteínas antigénicas en el extracto membranal y que las proteínas de 42 y 107 KDa. fueron las únicas proteínas de choque térmico que mostraron dicha antigenicidad contra los sueros positivos de cerdos infectados con *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.

## 6. DISCUSION.

Como ya hemos mencionado, la neumonía en el cerdo representa uno de los mas graves problemas infecciosos de esta especie animal. Típicamente entre el 30-60% de los cerdos de abasto presentan alguna lesión neumónica. Tomando en cuenta la producción porcina alrededor del mundo (Tabla XIX) podemos observar que el costo de esta enfermedad para la industria es enorme debido al carácter crónico que usualmente presenta<sup>51</sup>

**TABLA XIX. Producción porcina mundial.**

PAIS	PRODUCCION ANUAL (TONS.)
CHINA	344,278
U.S.A.	53,795
BRASIL	32,000
MEXICO	18,662
ESPAÑA	14,000
CANADA	10,476
ARGENTINA	4,036
KOREA	3,347

Sin embargo, actualmente no existe un método ni serológico ni

bacteriológico que proporcione un diagnóstico confiable de la enfermedad en los cerdos infectados. Tampoco existe hasta el momento una vacuna que controle con eficacia la enfermedad, es por esto que es urgente buscar y encontrar nuevos métodos, ya sea de diagnóstico o tratamiento para controlar la pleuroneumonía con la finalidad de llegar en un futuro a la erradicación de la misma.

Actualmente se conoce que *Actinobacillus pleuropneumoniae* presenta varios factores de virulencia, como la cápsula que constituye la estructura externa de la bacteria y determina el serotipo específico<sup>20</sup>, una hemolisina estable al calor que es letal para cerdos jóvenes, así como citocida y antifagocítica para macrófagos pulmonares del cerdo y una proteína hemolítica y citotóxica para neutrófilos, además de otras hemolisinas y polisacáridos.<sup>33</sup> Sin embargo, hasta ahora no se tiene conocimiento alguno acerca de la capacidad del *Actinobacillus pleuropneumoniae* de responder a situaciones de estrés, sintetizando factores de protección contra el hospedero, es por esto que nuestro trabajo se enfocó a la identificación de proteínas que se presentan en situaciones de estrés, específicamente de proteínas de choque térmico (HSP) presentes en la membrana de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, nosotros optamos por trabajar con la membrana porque sabemos que durante años las membranas externas de las bacterias gram negativas han recibido considerable interés por su papel en la patogénesis de las enfermedades. Se ha comprobado que, en particular, las proteínas de membrana externa juegan un papel muy importante en la patogenicidad de varias especies bacterianas<sup>44</sup>

En 1993, Richard Thwaites presentó un artículo en el cuál, él identifica



básicamente tres proteínas integrales de la membrana externa del *Actinobacillus pleuropneumoniae*, cuyos pesos moleculares son 39, 50 y 76 KDa.<sup>52</sup> Usando antisueros específicos, se pudo observar que las tres proteínas son antigénicamente diferentes.<sup>52</sup> En el presente trabajo, observamos la presencia de dichas proteínas semejantes a las identificadas por Thwaites, las cuales varían ligeramente en peso molecular, estas proteínas son las de 37, 50 y 72 Kd, observamos también dos bandas más que son muy notorias las cuales tienen un peso molecular de 95 y 27 Kd respectivamente, además de la presencia de muchas otras bandas de menor intensidad, esto lo atribuimos a que nuestro extracto membranal no es un extracto solo de membrana externa de la bacteria sino es un extracto crudo de membranas, ya que la separación de las membranas se realizó centrifugando a 20 000 rpm solamente y para la obtención de membranas externas la metodología es mucho más sofisticada aunado a que nuestro objetivo no era obtener solo las proteínas de choque de la membrana externa del microorganismo.

En cuanto a las proteínas de estrés, sabemos que la respuesta al choque térmico ha sido extensamente estudiada en años recientes, en diversos organismos, desde procariontes hasta el hombre.<sup>25</sup> La cascada de inducción de eventos celulares y moleculares después de la exposición a temperaturas elevadas ha sido investigada a varios niveles. A nivel molecular, ya se han identificado varias familias de Proteínas de choque térmico (Schlesinger, 1982; Lindquist, 1986; Welch et al., 1989). Estas proteínas son usualmente clasificadas en dos enormes grupos: las de peso molecular relativamente grande (65-110 KDa) y las de bajo peso molecular (15-30 KDa).<sup>25,31</sup>

En nuestra investigación, nosotros determinamos la presencia de varias proteínas de choque en el *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, estas proteínas son las de 140, 135, 130, 122, 118, 107 y 42 KDa, las cuales se encuentran en el grupo de las proteínas de alto peso molecular, de estas proteínas encontradas, pudimos observar que las de 107 y 42 KDa son antigénicas, ya que se observó una reacción positiva al ser enfrentadas con un antisuero positivo a *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, sin embargo, su antigenicidad no está tan claramente definida como la de la proteína de 37 KDa.

En lo que se refiere a la temperatura y tiempo de inducción de las proteínas de choque térmico, nosotros sabemos que la mayoría de las proteínas de choque están presentes en niveles de bajo a moderado en células que no han sido estresadas y que estas tienden a acumularse en niveles elevados en células sometidas a un "choque" esta respuesta es universal y ha sido observada en cada organismo en el cual ha sido buscada.<sup>44</sup> La temperatura es pues un factor de inducción de estas proteínas. En trabajos realizados anteriormente (Tisieres y Mitchell, 1993) se observó que en las células de *Drosophila* que crecen normalmente a una temperatura de 25 °C, las proteínas de shock son inducidas cuando el rango de temperatura va de 29-38 °C, a tales temperaturas el mensaje de shock térmico es producido rápidamente. Los mensajes del choque llegan al citoplasma en unos pocos minutos después de la elevación de la temperatura y son traducidos inmediatamente.<sup>25</sup>

En la investigación acerca de esto, realizada por Lindquist en 1988, encontró que en la mayoría de los organismos, el rango de temperatura en el que el

microorganismo alcanza su respuesta máxima va de 5-15 °C arriba del rango de temperatura óptima de crecimiento.<sup>24</sup>

Lo anterior concuerda con los datos obtenidos en nuestra investigación, ya que nosotros probamos tres temperaturas de inducción de las proteínas de choque térmico en el *A. pleuropneumoniae*; conociendo que su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, pudimos observar que a 39 °C no se detectó ninguna alteración en el patrón electroforético del extracto membranal del microorganismo comparandolo con estudios previos.<sup>47</sup> sin embargo, cuando esta temperatura de exposición fué de 42°C, se observó un cambio moderado en las bandas del patrón electroforético, ya que se observó una mayor intensidad de algunas de las bandas que, aunque ya estaban presentes (a 39 °C), no tenían la misma definición observada a 42 °C. Como podemos observar, la temperatura aumentó 5 °C en relación a su temperatura de crecimiento óptima y fué suficiente para observar la expresión de las proteínas de choque, sin embargo, cuando el microorganismo fué expuesto a una temperatura de 50 °C, la cantidad de bandas observadas disminuyó considerablemente, posiblemente debido a la desnaturalización o degradación de algunas proteínas al paso del tiempo de incubación. Al obtener estos resultados, nosotros quisimos observar el crecimiento de la bacteria a las temperaturas trabajadas, esto es, hicimos crecer la bacteria a 39, 42 y 50 °C por separado y observamos que a 39 y 42°C, el *A. pleuropneumoniae* crece aparentemente igual, sin embargo, a 50 °C no hubo crecimiento del microorganismo, esto nos muestra que aunque existe siempre una defensa contra las condiciones adversas de estrés, el microorganismo tiene un límite de resistencia y en el caso de la temperatura este lo encontramos a 50 °C.

Con base en los resultados anteriores, nosotros observamos que la temperatura de 42 °C es la apropiada para lograr la expresión de las proteínas de choque, sin embargo, posiblemente trabajando a una temperatura mayor de 42 °C, pero inferior a 50°C, podamos lograr una inducción mas evidente de estas proteínas, lo cual podría ser motivo de estudios posteriores.

El tiempo de exposición de la bacteria a la temperatura de estrés, no tuvo gran relevancia, ya que no se observó una diferencia significativa en relación a la intensidad de las bandas conforme pasaba el tiempo de exposición a la temperatura indicada, sin embargo pensamos que si se trabaja en lapsos de tiempos menores al inicio y al transcurrir algunas horas se amplían estos lapsos, podría quizás observarse alguna diferencia en relación a las bandas con la finalidad de obtener un tiempo de inducción de proteínas de choque térmico más exacto. Con los resultados obtenidos aquí podemos decir que el tiempo de exposición a la temperatura de estrés, no es un factor determinante ya que los mecanismos sensores del microorganismo le permiten detectar los cambios en las condiciones de crecimiento en cuestión de segundos o en pocos minutos.

La importancia de la identificación de las proteínas de choque térmico del *Actinobacillus pleuropneumoniae* puede ser en el area de la respuesta inmune contra esta bacteria, en estudios anteriores, se probó que las células T son activadas durante la infección microbiana por contacto con las HSPs microbianas. En pacientes con lepra y tuberculosis, las células T con especificidad para HSP 65 han sido repetidamente identificadas. Estas células T son activadas por la HSP 65.<sup>24</sup>

La respuesta inmune a proteínas de choque térmico, parece estar restringida a epítopes específicos. Tales epítopes únicos, por supuesto, podrían ser potencialmente usados con fines diagnósticos y representan candidatos interesantes para el desarrollo de una vacuna<sup>10</sup>, aunque por otra parte, los epítopes compartidos por el microorganismo y el hospedero pueden también ser un eslabón entre la infección y la autoinmunidad, la cual bajo condiciones desfavorables, puede poner en funcionamiento respuestas nocivas. Sin embargo, aunque sabemos que hay riesgo, hay también evidencias recientes que sugieren que los beneficios que estas proteínas pueden proporcionarnos, pueden ser mucho más grandes que el riesgo de enfermedad autoinmune. Un ejemplo de esto es en el caso de los procesos carcinogénicos, en los cuales estas proteínas, en caso de ser expresadas por estas células cancerosas, pueden utilizarse como blanco de la respuesta inmune y por medio de este mecanismo ayudar a la disminución de la proliferación celular, evitando de esta forma que el proceso canceroso se consolide.<sup>25</sup>

## CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos, podemos concluir que en el presente trabajo:

- 1) No hubo variación perceptible en la concentración de proteínas de choque térmico (HSP) de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 con respecto al tiempo de exposición al choque térmico.
- 2) Se obtuvo un patrón electroforético similar en las tres temperaturas trabajadas, aunque la intensidad de las bandas en el gel de 50 °C fué menor en relación a los geles de 39 y 42 °C.
- 3) En los patrones electroforéticos se detectaron varias bandas comunes de proteínas (a 39 y 42 °C) cuyos pesos moleculares son de aproximadamente 95, 72, 50, 37 y 27 KDa.
- 4) Cuatro de estas bandas son las mas prominentes y bien definidas en todas las temperaturas, estas bandas corresponden a los pesos moleculares de 27, 37, 50 y 72 KDa.
- 5) La temperatura óptima de choque térmico para el *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 fué de 42 °C.
- 6) Las proteínas de choque térmico determinadas a esta temperatura fueron las de 107 y 42 kd. aunque se observaron otras bandas de 140, 135, 130, 122 y 118 Kd que se sugiere sean proteínas de choque térmico.
- 7) En el enfrentamiento con los sueros de cerdo positivos a *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, encontramos que de todas las proteínas de choque térmico expresadas por la bacteria, solo la HSP 107 y HSP 42 mostraron ser antigénicas para los cerdos.

## **BIBLIOGRAFIA.**

1. Ballows A. and Hausler W., **MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, American Society for Microbiology, Fifth edition, Washington D.C. 1991, pp. 419-420.
2. Bond U., Schelesinger M., et al, 1985. **UBIQUITIN IS A HEAT SHOCK PROTEIN IN CHICKEN EMBRYO FIBROBLAST**. Molecular and Cellular Biology. Vol.5. No. 5. 949-956.
3. Boog Cl., Graeff-Meeder E., 1992. **TWO MONOCLONAL ANTIBODIES GENERATED AGAINST HUMAN hsp 60 SHOW REACTIVITY WITH SYNOVIAL MEMBRANES OF PATIENTS WITH JUVENILE CHRONIC ARTHRITIS**. J. Exp. Med. 175: 1805-1810.
4. Born W., Pat Happ M., et al, 1990. **RECOGNITION OF HEAT SHOCK PROTEINS AND  $\delta$  CELL FUNCTION**. Immunology Today. 11:40-43.
5. Bradford M., 1985. **A RAPID AN SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING**. Analytical Biochemistry. 151:369-374.
6. Breach M., **MANUAL TECNICAS BACTERIOLOGICAS**, Ed. Acribia, segunda edición, Zaragoza ,España 1989, pp. 23.
7. Chin-Nan Ch., et al.,1988. **ISOLATION AND ANTIGENIC CHARACTERIZATION OF *Haemophilus pleuropneumoniae* FROM PORCINE PNEUMONIA**. Jap. J. vet. Sci. 40:103-107.
8. Ciprian A., et. al., 1988. **SEROTIIFICACION DE *Haemophilus pleuropneumoniae* AISLADOS DE CERDOS EN MEXICO**. Vet. Mex. 1:205-210.

9. Collins P. and Hightower L.,1982. **NEWCASTLE DISEASE VIRUS STIMULATES THE CELLULAR ACCUMULATION OF STRESS (HEAT SHOCK) mRNAs AND PROTEINS.** Journal of Virology. 44: 255-261.
10. Craig E.A., 1985. **THE HEAT SHOCK RESPONSE.** Crit. Rev. Bioch. 18:239-280.
11. Craig E., Gambill D. and Nelson J., 1993. **HEAT SHOCK PROTEIN: MOLECULAR CHAPERONES OF PROTEIN BIOGENESIS.** Microbiological Reviews, 57: 402-414.
12. Garvey, Cremer and Sussdorf, **METHODS IN IMMUNOLOGY** , W.A. PUBLISHERS, Third edition, 1987, pp.545.
13. Gershoni, J.M., and Palade,G.E., 1982. **ELECTROPHORETIC TRANSFER OF PROTEINS FROM SODIUM DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GELS TO A POSITIVELY CHARGED MEMBRANE FILTER.** Anal. Biochem., 124:396-405.
14. Graeff-Meeder, et al., 1991. **RECOGNITION OF HUMAN 60 KD HEAT SHOCK PROTEIN BY MONONUCLEAR CELLS FROM PATIENTS WITH JUVENILE CHRONIC ARTHRITIS.** The Lancet. 337:1368-1374.
15. Graeme L. Hammond, Yiu-Kay L., et al., 1982. **DIVERSE FORMS OF STRESS LEAD TO NEW PATTERNS OF GENE EXPRESSION THROUGH A COMMON AND ESSENTIAL METABOLIC PATHWAY.** Proc. Natl. Acad. Sci. 79:3485-3488.
16. Guidon P.T. and Highower, 1986. **PURIFICATION AND INITIAL CHARACTERIZATION OF 71 KD RAT HEAT SHOCK PROTEIN.** Biochemistry. 25:3231-3239.
17. Hafeez and Joslin,et al., 1991, **EXPRESSION OF STRESS PROTEINS IN HUMAN MONONUCLEAR PHAGOCYTES.** The Journal of Immunology. 17:1614-1620.



18. Hammond C.L., Markert C.L., et al., 1982. DIVERSE FORMS OF STRESS LEAD TO NEW PATTERNS OF GENE EXPRESSION THROUGH A COMMON AND ESSENTIAL METABOLIC PATHWAY. Proc. Natl. Acad. Sci. 79:3484-3485.
19. Haregewoin A., Singh B., et al., 1991. A MYCOBACTERIAL HEAT SHOCK PROTEIN RESPONSIVE T CELL CLONE ALSO RESPONDS TO THE HOMOLOGOUS HUMAN HEAT SHOCK PROTEIN: A POSSIBLE LINK BETWEEN INFECTION AND AUTOIMMUNITY. The Journal of Infectious Diseases. 163:156-160.
20. Inzana T., Jianneng M.A., et al. 1988. VIRULENCE PROPERTIES AND PROTECTIVE EFFICACY OF CAPSULAR POLYMER OF *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* SEROTYPE 5. Infection and Immunity. 56:1880-1889.
21. Kaufmann S., 1990. HEAT SHOCK PROTEINS AND THE IMMUNE RESPONSE. Immunology Today. 11:129-136.
22. Kessi, Poirée, et al., 1994. SHORT-CHAIN PHOSPHATIDYLCHOLINES AS SUPERIOR DETERGENTS IN SOLUBILIZING MEMBRANE PROTEINS AND PRESERVING BIOLOGICAL ACTIVITY. Biochemistry. 33:10825-10836.
23. Koga T., Wand A., et al., 1989. T CELLS AGAINST A BACTERIAL HEAT SHOCK PROTEIN RECOGNIZE STRESSED MACROPHAGES. Science. 245:1112.
24. Lindquist S., et al, 1986. THE HEAT SHOCK RESPONSE. Ann. Rev. Biochem. 55:1151-1191.
25. Lindquist S. and Craig E. A., 1988. THE HEAT SHOCK PROTEINS. Annu. Rev. Genet. 22:631-677.
26. Lucasen M. A., Edenand Van W., 1994. IMMUNE RECOGNITION OF HEAT SHOCK PROTEIN-60 (HSP 60). Immune Notes. SIGMA. No. 12. pp. 1-4.

27. Lugo Ramirez M. C., **VALIDACION DEL PLEUROTEST A BASE DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 A NIVEL DE GRANJA Y RASTRO**, Tesis de Licenciatura M.V.Z., Cuautitlán Izcalli 1993.
28. Mac Fadin, **PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA**, Ed. Panamericana, primera edición, México D.F. 1990, pp. 183-184.
29. Maudsley J.R., Kadis S., Mayberry W.R. 1986. **ISOLATION, PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF LIPOPOLISACCHARIDE FROM *H. pleuropneumoniae***. Infect. Immun. 51:501-506.
30. Milton J. Schlesinger, 1986. **HEAT SHOCK PROTEINS: THE SEARCH FOR FUNCTIONS**. The Journal of Cell Biology. 103:321-325.
31. Miron T., et al., 1991. **A 25 KD INHIBITOR OF ACTIN POLIMERIZATION IS A LOW MOLECULAR MASS HEAT SHOCK PROTEIN**. The Journal of Cell Biology. 114:255-261.
32. Mitchell H. K., Petersen N. S. and Buzin C. H., 1985. **SELF DEGRADATION OF HEAT SHOCK PROTEINS**. Proc. Natl. Acad. Sci. 82:4969-4973.
33. Morilla A., **AVANCES EN ENFERMEDADES DEL CERDO**, Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, México 1985, pp.437-478.
34. Neidhard F., **PHYSIOLOGY OF THE BACTERIAL CELL**, Sihaver Associates, Inc. Publishers, 1a. edition, Sunderland Massachusetts, 1990, pp. 226-239.
35. Nicolet J., et al., 1985. ***Haemophilus pleuropneumoniae*, BACTERIOLOGY AND EPIDEMIOLOGY**. Compendium on swine *Haemophilus pleuropneumoniae*. USA, pp.1-13.

36. Nielse R., 1986. SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* STRAINS AND PROPOSAL OF NEW SEROTYPE: SER. 12. Act. Vet. Scand. 27:453-455.
37. Pelczar M., MICROBIOLOGIA, Ed. Mc. Graw-Hill, cuarta edición, México 1987, pp. 59-60.
38. Piffer I.A., Carter G.R., et al., 1986. IDENTIFICATION OF SEROTYPES OF *Haemophilus* BY COUNTER-IMMUNOELECTROPHORESIS. The Veterinary Record. 15:292-294.
39. Pijoan C., 1988. *Haemophilus pleuropneumoniae* IN PIGS, PATHOGENESIS AND CONTROL. American Association of Swine Practitioners. Iowa. pp. 18-20.
40. Pittman M. 1983, A CLASSIFICATION OF THE HEMOLYTIC BACTERIA OF GENUS *H. haemolyticus* and *H. parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology. 65: 750-751.
41. Pohl S., et al, 1983. TRANSFER OF *Haemophilus pleuropneumoniae* AND THE *Pasteurella Haemolytica*-like ORGANISM CAUSING PORCINE NECROTIC PLEURO-PNEUMONIA TO THE GENUS *Actinobacillus* ON THE BASIS OF PHENOTYPIC AND DEOXYRIBONUCLEIC ACID RELATEDNESS. J. Syst. Taxon. 33:510-516.
42. Pola B. and Douglas Y., 1989. HEAT SHOCK PROTEINS AND IMMUNITY. Immunology Today. 10:393-394.
43. Ramirez Necochea, R., Pijoan Aguade C., ENFERMEDADES DE LOS CERDOS, Ed. Diana, México 1987, pp. 275-281.
44. Rapp V. and Ross R., 1986. ANTIBODY RESPONSE OF SWINE TO OUTER MEMBRANE COMPONENTS OF *Haemophilus pleuropneumoniae* DURING INFECTION. Infection and Immunity. 54:751-760.

45. Ritossa F., et al. 1962. **A NEW PUFFING PATTERN INDUCED BY TEMPERATURE SHOCK AND DNA IN *Drosophila*. *Experientia*. 18:571-573.**
46. Rogers R.J., Le Eaves, 1990. **COMPARATIVE VIRULENCE OF FOUR SEROTYPES OF *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Australian Veterinary Journal*. 67:187-193.**
47. Romero Rojas A., 1989. **ANALISIS DE EXTRACTOS MEMBRANALES DE *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* (Tesis de maestría). UNAM.**
48. Romero Rojas A., Camacho Machin J., et al., 1992. **PATRONES ELECTROFORETICOS Y ANTIGENICOS DE LOS SEROTIPOS 1,2,5 Y 7 DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* , *Veterinaria México*, 2:1125-130.**
49. Rose N., Friedman H., et. al. **MANUAL OF CLINICAL LABORATORY IMMUNOLOGY**. American Society for Microbiology, Third edition, United States of America 1986, pp. 969.
50. Rosedal S., et al. 1990. **CHARACTERIZATION OF AN ATTENUATED STRAIN OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTYPE 1. *Vet. Res.* 51:711-719.**
51. Ross R., 1985. **RESEARCH NEEDS FOR PLEUROPNEUMONIA. *Can. Vet. J.* 13:41-59.**
52. Schultz A. R., 1991. **THE IMPACT OF CHANGES IN GLOBAL SWINE PRODUCTION ON SWINE VETERINARY PRACTICE. *Proc. Amm. Ass. Swine Pract. Minneapolis*. Marzo. pp. 173-203.**
53. Thwaites R. and Kadis S., 1993. **PURIFICATION OF SURFACE-EXPOSED INTEGRAL OUTER MEMBRANE PROTEINS OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* AND THEIR ROLE IN OPSONOPHAGOCYTOSIS. *Am. J. Vet. Res.* 54:1462-1470.**

54. Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. 1979. **ELECTROPHORETIC TRANSFER OF PROTEINS FROM POLYACRYLAMIDE GELS TO NITROCELLULOSE SHEETS: PROCEDURE AND SOME APPLICATIONS.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4353.
55. Van Eden W., 1991. **HEAT-SHOCK PROTEINS AS IMMUNOGENIC BACTERIAL ANTIGENS WITH THE POTENTIAL TO INDUCE AND REGULATE AUTOIMMUNE ARTHRITIS.** Immunological Reviews. 121:1-27.
56. Williams C. A. and Chase, M.W. 1987. **METHODS IN IMMUNOLOGY AND IMMUNOCHEMISTRY.** Vol. I. Academic Press. First edition.
57. Wilson P., 1987. **DETECTION OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* INFECTION IN PIGS.** Can. Vet. J. 28:111-116.
58. Young A. R., et al, 1989. **STRESS PROTEINS INFECTION AND IMMUNE SURVEILLANCE.** Cell. 59:5-8.

## **APENDICE 1**

### **1.- Solución salina fisiológica.**

Cloruro de sodio (NaCl)..... 8.5 g

Aforar a 1 litro con agua destilada.

### **2.- Amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH = 6.8**

Tris-base..... 6.0 g

Agua destilada ..... 60 ml

Ajustar a pH = 6.8 con HCL 1N

Llevar a 100 ml con agua destilada y almacenar a 4°C.

### **3.- Amortiguador Tris-HCl 1.5 M pH = 8.8**

Tris-base ..... 18.75 g

Agua destilada ..... 80 ml

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N

Llevar a 150 ml con agua destilada y almacenar a 4°C.

### **4.- Acrilamida-bis 30% (solución stock)**

Acrilamida ..... 29.2 g

Bis-acrilamida ..... 0.8 g

Llevar a 100 ml con agua destilada.

Filtrar y almacenar a 4°C en obscuridad (30 días máximo).

**5.- Persulfato de amonio 10%**

Persulfato de amonio ..... 10 g

Llevar a 100 ml con agua destilada.

**6.- SDS 10%**

Dodecil sulfato de sodio ..... 10 g

Llevar a 100 ml con agua destilada.

**7.- Salina-Tris (amortiguador) 20 mM tris HCl, 500 mM NaCl, pH = 7.5 (TBS).**

Tris-base ..... 4.84 g

NaCl ..... 58.48 g

Aforar a 2 lt con agua destilada.

Ajustar el pH a 7.5 con HCl 1N.

**8.- Solución de lavado Tween 20 (TTBS)**

Tween 20 ..... 0.5 ml

Aforar a 1 lt con TBS.

**9.- Solución bloqueadora.**

Leche descremada en polvo ..... 3.0 g

Llevar a 100 ml con TBS.

#### 10.- Amortiguador de corrimiento (Transferencia)

Tris-base .....	3.0 g
Glicina .....	14.4 g
Metanol .....	200 ml

Ajustar el pH a 8.3.

Aforar a 1 lt con agua destilada.

#### 11.- Solución amortiguadora de corrida (Electroforesis)

Tris .....	4.5 g
Glicina .....	28.8 g
SDS (al 10% en agua) .....	20 ml
Agua destilada .....	2.0 lt

pH = 8.4

#### 12.- Solución digestora

Tris 0.5 M, pH = 6.8 .....	1.0 ml
Agua destilada .....	4.0 ml
Glicerol .....	0.8 ml
SDS al 10% en agua destilada .....	1.6 ml
2- $\beta$ -mercaptoetanol .....	0.4 ml
Azul de bromofenol .....	0.2 ml

#### 13.- Solución teñidora

Azul de Comassie .....	2.0 g
Agua destilada .....	200 ml



**14.- Solución desteñidora I**

Metanol ..... 500 ml  
Acido acético ..... 100 ml

Se aforó a 1 lt con agua destilada.

**15.- Solución Desteñidora II**

Acido acético ..... 70 ml  
Metanol ..... 50 ml  
Aforar a 1 lt con agua destilada.

**16.- Solución Reveladora**

TBS ..... 50 ml  
Peróxido de hidrógeno ..... 0.05 ml  
Metanol ..... 10 ml  
 $\alpha$ -cloronaftol ..... 30 mg

**17.- Solución Negro de Amido**

Negro de amido ..... 100 mg  
Metanol ..... 45 ml  
Acido acético glacial ..... 1.0 ml  
Agua destilada ..... 45 ml