



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

"EFECTO DEL pH EN EL PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE LAS
PROTEÍNAS INTRÍNSECAS DE MEMBRANA DEL
Actinobacillus pleuropneumoniae SEROTIPO 1"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ERNESTINA RAMIREZ RIVAS

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ANDRÉS ROMERO ROJAS

ASESORA: DRA. SUSANA E. MENDOZA

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

56
24.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



Departamento de
Exámenes Profesionales

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

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Cobalillos
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 la TESIS TITULADA: Efecto del pH en el botón electroquímico de las proteínas intrínsecas de membrana del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1

que presenta la pasante: Ernestina Ramírez Rivera
con número de cuenta: 8501814-4 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica Biológica

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida 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"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 14 de octubre de 1994

PRESIDENTE

G.F.I. Andrea Becerra Osnava *Andrea Becerra*

VOCAL

Dr. Marco A. Vega López *Marco A. Vega López*

SECRETARIO

M.en C. Andrés Romero Rojas *Andrés Romero Rojas*

PRIMER SUPLENTE

G.F.B. Marcela Hernández Vargas *Marcela Hernández Vargas*

SEGUNDO SUPLENTE

M.en C. Víctor Mendoza Buitrón *Víctor Mendoza Buitrón*

DEDICATORIAS:

A DIOS

Por la felicidad que me regala y por aquellos momentos en que ha puesto a prueba mi voluntad de ser feliz.

A MIS PADRES

Por su ejemplo de honestidad y sencillez, por sus sabios consejos, por sus sacrificios, por brindarme una oportunidad. A ellos con todo mi amor y respeto.

A MIS HERMANOS

Diego, Evaristo, Diana G, Carina, Luz M, Margarita, Julio C y C. David

Por su apoyo, por darme ánimo de seguir adelante, porque de ellos siempre he aprendido algo nuevo.

A MIS AMIGAS Y COMPAÑEROS

Por compartir momentos agradables y brindarme su amistad.

A MI DIRECTOR DE TESIS

M. C Andrés Romero Rojas

Para quien nunca tendré palabras suficientes, para agradecer su labor callada en la realización de este trabajo.

A Julio Lobato Hernández

Porque gracias a él descubrí que todo ser humano es capaz de alcanzar sus propósitos.

AGRADECIMIENTOS:

Un sincero agradecimiento a:

Dra. Susana E. Mendoza Elvira

Dr. Abel Ciprián Carrasco

Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

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

Al H. Jurado:

Q. F. I. Andrea Becerril Osnaya

Dr. Marco Antonio Vega López

M. en C. Andrés Romero Rojas

Q. F. B. Marcela Hernández Vargas

M. en C. Víctor Zendejas Buitrón

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

ÍNDICE

	Página	
I	Lista de tablas	
II	Lista de figuras	
III	Lista de abreviaturas	
IV	Resumen	
1.0	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Antecedentes	1
1.2	Características morfológicas y bioquímicas.	2
1.2.1	Características diferenciales	4
1.3	Pleuropneumonía	4
1.4	Epidemiología	5
1.5	Patogenia	6
1.5.1	Factores de patogenicidad	7
1.5.1.2	Antígenos capsulares	7
1.5.1.3	Fimbria	9
1.5.1.4	Proteínas de membrana externa	11
1.5.1.5	Exotoxinas	11
1.5.1.6	Proteasas	14
1.6	Diagnóstico	16

1.6.1	Métodos de diagnóstico	16
1.6.2	Pruebas serológicas	18
1.6.2.1	Prueba de fijación de complemento (FC)	18
1.6.2.2	Prueba de enzima ligada a inmunoabsorbente (ELISA)	19
1.6.2.3	Prueba de aglutinación	20
1.6.3	Diagnóstico diferencial	21
1.7	Vacunación y Control	22
1.8	Proteínas de estrés	25
1.8.1	Generalidades	25
1.8.2	Funciones de las proteínas de estrés	27
1.8.3	Respuesta inmune a las proteínas de estrés	28
1.8.4	Proteínas de choque pH	29
2.0	HIPÓTESIS	34
3.0	OBJETIVOS	34
4.0	MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1	Material biológico	35
4.1.1	Cepas	35
4.1.2	Sueros	35
4.2	Medios de cultivo	36
4.3	Reactivos	36
4.3.1	Preparación de soluciones	36

4.4 Pruebas de identificación del microorganismo	38
4.4.1 Pruebas bioquímicas	38
4.5 Exposición del <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1 a las diferentes condiciones de pH	39
4.6 Obtención de los extractos membranales	41
4.7 Cuantificación de proteínas	42
4.8 Electroforesis de los extractos membranales	43
4.8.1 Preparación del gel de separación	43
4.8.2 Preparación del gel de condensación	44
4.8.3 Preparación de las muestras	44
4.8.4 Corrimiento electroforético	45
4.8.5 Tinción de las proteínas en el gel de poliacrilamida-SDS	45
4.8.6 Determinación de los pesos moleculares de las proteínas observadas en el gel	46
4.9 Electrotransferencia	47
4.9.1 Transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida-SDS a membrana de nitrocelulosa	47
4.9.2 Bloqueo de los sitios de unión no específicos	50
4.9.3 Detección de las proteínas transferidas	50

5.0 RESULTADOS	52
5.1 Pruebas de identificación del <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1	52
5.2 Obtención de extractos membranales	53
5.3 Cuantificación de proteínas	53
5.4 Obtención del patrón electroforético	57
5.4.1 Patrón electroforético a pH 5.5	57
5.4.2 Patrón electroforético a pH 7.4	62
5.4.3 Patrón electroforético a pH 9.5	65
5.5 Obtención del patrón antigénico	69
6.0 DISCUSIÓN	74
7.0 CONCLUSIONES	81
8.0 REFERENCIAS	82
9.0 APÉNDICE	92

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Características diferenciales de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1	4
Tabla 2 Designaciones usadas para varias toxinas RTX encontradas en <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	13
Tabla 3 Factores de virulencia de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1	15
Tabla 4 Tiempo de exposición del <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1 a las diferentes condiciones de pH	40
Tabla 5 Preparación de la curva de calibración	42
Tabla 6 Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa de <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1	52
Tabla 7 Valores obtenidos para la realización de la curva patrón	54
Tabla 8 Contenido proteínico de los extractos membranales de <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1 a las diferentes condiciones de pH	56
Tabla 9 Coeficientes de movilidad relativa (Rf) de las proteínas estándar	59

Tabla 10 Pesos moleculares aproximados de las proteínas de los extractos membranales del <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1 expuesto a pH 5.5	61
Tabla 11 Pesos moleculares aproximados de las proteínas de los extractos membranales del <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1 expuesto a pH 7.4	64
Tabla 12 Pesos moleculares aproximados de las proteínas de los extractos membranales del <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1 expuesto a pH 9.5	68

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Diagrama de flujo. Desarrollo del método	37
Figura 2 Esquema de armado del "sandwich" para la electrotransferencia	49
Figura 3 Curva patrón de proteínas (Método de Bradford)	55
Figura 4 Patrón electroforético del extracto membranal del <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1 expuesto a pH 5.5	58
Figura 5 Curva patrón de las proteínas estándar	60
Figura 6 Patrón electroforético del extracto membranal del <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1 expuesto a pH 7.4	62
Figura 7 Patrón electroforético del extracto membranal del <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1 expuesto a pH 9.5	66
Figura 8 Patrón antigénico del extracto proteínico del <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1 expuesto a pH 5.5 (2 horas)	71
Figura 9 Patrón antigénico del extracto proteínico del <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1 expuesto a pH 7.4 (2 horas)	72
Figura 10 Patrón antigénico del extracto proteínico del <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1 expuesto a pH 9.5 (2 horas)	73

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Adenín Difosfato
ATP	Adenín Trifosfato
Ap	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
ASB	Albúmina sérica bovina
BHI	Agar de infusión de cerebro y corazón
Dm	Distancia total recorrida por la muestra
Dprot.	Distancia recorrida por la proteína
dil.	Dilución
g	Gravedades
kDa	Kilodalton
Log ₁₀	Logaritmo de base 10
LPS	Lipopolisacárido
NAD	Nicotinamida adenín dinucleótido
nm	Nanómetros
PM	Peso molecular
PCP	Pleuroneumonía contagiosa porcina

[Proteína]	Concentración de proteínas
Rf	Coefficiente de movilidad relativa
ARN	Acido ribonucleico
Ser. 1	Serotipo 1
SSF	Solución salina fisiológica
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Geles discontinuos de poli(acrilamida)-dodecilsulfato de sodio
SPF	Libre de patógenos específicos
TEMED	N,N,N',N' Tetrametiletilendiamino
TBS	Amortiguador Salina-Tris
UFC/ ml	Unidades formadoras de colonias/ mililitro
P/V	Peso/ Volumen
µg /µl	Microgramos / microlitros
µg	Microgramos

RESUMEN

La pleuropneumonía contagiosa porcina es una de las enfermedades que produce importantes pérdidas económicas en la porcicultura debido a su alta morbilidad y mortalidad. La propagación de la enfermedad es difícil de controlar debido a que no existe un método de diagnóstico que determine completamente si hay o no cerdos infectados en una pira; por ello es necesario el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico así como de inmunógenos que permitan la prevención y erradicación de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del pH (5.5, 7.4 y 9.5) sobre el patrón electroforético de las proteínas intrínsecas de membrana del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 .

Se inoculó una suspensión bacteriana de Ap a caldo BHI complementado y se incubó a 37°C con agitación constante durante 0, 0.5, 1 y 2 horas para cada diferente condición de pH. Después del tiempo de incubación se obtuvieron extractos enriquecidos de membrana centrifugando el medio de cultivo a 1000 g, la pastilla obtenida se lavó con SSF a 1000 g, se resuspendió la pastilla obtenida y se sonicó durante 10 min posteriormente se centrifugó a 1000g para separar las células completas que aún permanecían. El sobrenadante se centrifugó a 19,980 g durante 1 hora para obtener los extractos membranales. Se realizó el análisis de las proteínas por SDS-PAGE para las diferentes condiciones de pH y se determinó la antigenicidad de las proteínas por inmuno-

electrotransferencia. En el análisis del patrón electroforético aparentemente no se observan cambios, se determinaron proteínas de choque-pH de 28.38, 26.09 y 16.17 kDa (a pH 5.5) y 64.18, 28.07 y 16.17 kDa (a pH 9.5). En cuanto a los patrones antigénicos se observan bandas comunes tanto a pH ácido como básico (5.5 y 9.5) y que no se observan a pH 7.4 con la misma definición. Se observan proteínas de choque pH de 29.28, 25.10 y 15.91 kDa (a pH 5.5), 63.25, 29.28 y 15.91 kDa (a pH 9.5) que fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de cerdo positivos al *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, la identificación y purificación de estas proteínas ,aunado a estudios posteriores pueden ser de utilidad en el desarrollo de inmunógenos que ayuden a prevenir y controlar la PCP.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

El primer caso de *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* (Ap) en los Estados Unidos fue reportado en 1963. En este mismo año se reportó un brote de pleuroneumonía en Argentina²¹.

El microorganismo fue primeramente llamado *Haemophilus parahemolyticus*, un patógeno humano (Olander 1963). Subsecuentemente se demostró que es morfológica y bioquímicamente diferente del *H. parahemolyticus*, por lo que fue llamado *H. pleuropneumoniae* por Kilian y cols. en 1978. Con base en la relación fenotípica y estudios de DNA se demostró que el agente está cercanamente relacionado al tipo de especies del género *Actinobacillus* (Pohl y cols. en 1983), por lo que se transfirió la especie *Haemophilus pleuropneumoniae* a la *Actinobacillus pleuropneumoniae*, dependiente de NAD (Nicotinamida adenín dinucleótido) biovariedad 1 y *P. haemolytica*-parecida a la especie *Actinobacillus pleuropneumoniae* no dependiente de NAD biovariedad 2¹⁵.

Debido a las diferencias del antígeno capsular, se han descrito 13 serotipos. Estas diferencias coinciden en cambios en los patrones electroforéticos de proteínas de membrana externa⁵³.

En la década de los años setentas, se reconocieron 5 serotipos por (Kilian y cols. en 1978) y subsecuentemente 6 serotipos más (Nielsen 1982), 7 (Rosendal y Boyd 1982), 8 (Nielsen y O'Connor 1984), 9 (Nielsen 1985a), 10 (Nielsen 1985b), 11 (Kamp 1987) y 12 (Nielsen 1986), hasta el presente se conocen 13 serotipos ^{20,49,64}.

La prevalencia de varios serotipos difiere en los continentes. En México el *Haemophilus pleuropneumoniae* fue aislado e identificado por primera vez de brotes de PCP en los estados de Tlaxcala y Michoacán ²¹. A partir de esta fecha la PCP ha sido descrita en la mayoría de las cuencas porcícolas del país ¹⁴.

Estudios realizados por Ciprián y colaboradores en 1988 sugieren que el principal serotipo de la PCP en México es el número 1, aunque no sea el único ^{14,15}. El serotipo 1 se ha observado que es el más virulento, y está asociado con los casos más severos de la enfermedad ⁷⁰.

1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

Se ha propuesto que bacterias de los géneros *Actinobacillus*, *Haemophilus* y *Pasteurella* comprenden la familia *Pasteurellaceae*⁷³. Dentro del género *Actinobacillus* existen especies patógenas oportunistas: *A. equuli*, *A. lignieresii*, *A. suis* y *A. (Haemophilus) pleuropneumoniae (Ap)* ⁷².

Ap es un bacilo gram negativo, capsulado, pleomórfico, requiere de NAD (Factor V) de sangre, pero no requiere de hemina (Factor X). Debido a estos requerimientos de factor V, el agente fue inicialmente clasificado como *Haemophilus*^{53,21}.

Este microorganismo causa β -hemólisis de eritrocitos sanguíneos de diferentes animales y humanos. Con *Staphylococcus aureus* crece en pequeñas colonias satélite de aproximadamente 2 mm de diámetro, de aspecto opaco y de bordes redondeados, produce reacciones de CAMP y ureasa positivas y fermenta algunos azúcares con producción de gas^{53,21,14,16}.

La hemólisis en la zona de difusión de la toxina β de *Staphylococcus aureus* es conocida como reacción de CAMP es una herramienta valiosa y de uso amplio para fines de diagnóstico. En particular ésta reacción permite diferenciar a *A. p* de *Haemophilus* spp porcino²⁹.

La prueba de CAMP fue originalmente descrita para *S. agalactiae*, pero reacciones de CAMP parecidas fueron descritas para muchas otras bacterias incluyendo *A. p*, se ha reportado¹⁶ que la reacción de CAMP es causada por una proteína de 27 kDa, pero resultados obtenidos por otros investigadores¹⁸ demostraron que las proteínas RTX producidas por *A. p* son las responsables de la actividad de CAMP. La reacción de CAMP es debida no a una proteína específica sino a la acción sinérgica de la toxina β de *S. aureus* y cualquier hemolisina débil¹⁸.

1.2.1 CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES

Las características diferenciales entre *A. pleuropneumoniae*, *A. parasuis* y *A. suis* se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características diferenciales de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

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

1.3 PLEURONEUMONÍA

Actinobacillus pleuropneumoniae es el agente etiológico de la "pleuroneumonía contagiosa porcina" (PCP). Esta enfermedad produce en cerdos susceptibles una alta mortalidad y pérdidas económicas debido a una pobre conversión alimenticia en los porcinos infectados crónicamente, asociada

a una pleuritis fibrinosa y la lesión crónica consiste en tejido pulmonar consolidado, infartado y encapsulado ¹⁴.

Las infecciones en cerdos totalmente susceptibles son frecuentemente fatales. Los cerdos que sobreviven a infecciones agudas frecuentemente son portadores y adquieren varios grados de resistencia a la pleuroneumonía de subsiguientes infecciones con el mismo u otros serotipos ⁷.

El agente causal posee severos factores de virulencia: fimbrias de adhesión, lipopolisacáridos de membrana externa, cápsula, citolisinas y proteasas de un amplio rango de pH de actividad ⁵³.

1.4 EPIDEMIOLOGÍA

La pleuroneumonía del cerdo debida a la infección con Ap es transmitida por contacto directo o a través de aerosoles de portadores crónicos a cerdos de piaras no inmunes^{36,66} es una enfermedad que está asociada al lugar, sobrepoblación, mala ventilación, cambios altos de temperatura, alta humedad relativa, y transporte de animales a otras granjas de cerdos predispuestos a adquirir la enfermedad, infecciones simultáneas y la virulencia del microorganismo contribuyen a incrementos y diseminación de la enfermedad⁵⁷.

Las piaras susceptibles a la pleuroneumonía tienen un repentino ataque, una rápida propagación y la afectación a cerdos de todas las edades, incluyendo animales de crianza^{53,57}. Un ataque severo de la enfermedad ocurre cuando un portador inmune, subclínico, crónico es introducido a una piara no inmune, o son adicionados más cerdos y son movidos y mezclados antes del primer signo del brote con altos rangos de morbilidad y mortalidad, se ha observado que la morbilidad y la mortalidad en cerdos de crecimiento puede variar ampliamente; la enfermedad puede manifestarse con un bajo grado de infección crónica, con pocas muertes por semana o como una epidemia de enfermedad hiperaguda con más de 35% de mortalidad^{38,57,60}.

1.5 PATOGENIA

No se conocen los mecanismos exactos de la patogenia involucrados en la pleuroneumonía porcina pero, la colonización del epitelio de las vías respiratorias puede ser un paso importante en la progresión de la enfermedad⁴⁰.

La muerte de los cerdos es generalmente causada por choque endotóxico por endotoxinas o lipopolisacáridos⁵³. Las investigaciones sugieren que las endotoxinas son la causa inicial de cambios patológicos debido a que es citotóxica para macrófagos alveolares pulmonares⁶⁰. Un factor de virulencia potencial es la hemolisina lábil al calor producida por *A. p* serotipo 1, esta

hemolisina ha sido purificada y mostró ser una proteína con masa molecular de 104 o 105 kDa¹⁹. Un factor que podría incrementar la virulencia de Ap es el material capsular, este material puede proteger las células bacterianas de muchos mecanismos de defensa del hospedero (La cápsula tiene actividad antifagocítica e inhibe la actividad bactericida de anticuerpos y complemento) y puede también estar involucrado en la formación de microcolonias que pueden ser aerolizadas o aspiradas hacia las vías respiratorias bajas, y la penetración alveolar profunda favorece la infección. La habilidad del Ap para adherirse a tejido pulmonar puede representar un paso importante en la patogénesis de pleuroneumonía porcina, éste es considerado como el paso inicial^{40,42,69,39,66}.

1.5.1 FACTORES DE PATOGENICIDAD

1.5.1.1 ANTÍGENOS CAPSULARES

La cápsula constituye la estructura externa de la bacteria y determina la serotipoespecificidad. La cápsula de Ap tiene un polisacárido compuesto de subunidades repetitivas de disacáridos, esto le da propiedades antifagocitarias a la bacteria pero también inmunogénicas. El papel de la cápsula de Ap en la producción de lesiones y virulencia bacteriana fue demostrado cuando un extracto de cápsula concentrado fue inoculado a cerdos los cuales desarrollaron

daños severos a nivel respiratorio y lesiones necrohemorrágicas. Estos daños no pudieron ser reproducidos por un extracto de cápsula poco concentrado. Estas diferencias en la consistencia capsular podrían explicar porqué los serotipos no son igualmente virulentos^{53,7}.

Los polisacáridos capsulares son reconocidos como importantes factores de virulencia bacterianos. La cápsula mejora la invasión bacteriana por proteger a la bacteria de las defensas del hospedero, en parte por inhibición de la activación de la cascada del complemento por antígenos somáticos. La formación de anticuerpos específicos capsulares por el hospedero resulta en opsonización y para la mayoría de las bacterias gram negativas *in vitro* en bacteriólisis. La presencia de anticuerpos específicos para el polisacárido capsular es suficiente para proteger al hospedero³⁷.

Estudios realizados para determinar la estructura y composición de monosacáridos y polisacáridos componentes de cada lipopolisacárido demuestran que los lipopolisacáridos (LPS's) de los serotipos 2,4 y 7 son del tipo liso y los de los serotipos 3 y 6 de tipo rugoso; los lipopolisacáridos de los serotipos 1 y 5 pueden ser considerados semirrugosos. La ramnosa estuvo presente sólo en el polisacárido O de los lipopolisacáridos de tipo liso y semirrugoso, la galactosa estuvo presente en el polisacárido O del LPS de tipo liso y en el centro de oligosacáridos de los lipopolisacáridos de tipo rugoso y semirrugoso. La glucoheptosa y la manoheptosa estuvieron presentes en el

centro de los oligosacáridos de todos los tipos de lipopolisacáridos excepto para la clase del serotipo 3, en el cual sólo se detectó manohexosa. La N-acetilglucosamina fue detectada sólo en el polisacárido O de los serotipos 1 y 5^{5,13}.

Los lipopolisacáridos de la pared celular son importantes en el desarrollo de una respuesta inmune después de la infección con Ap. Estudios serológicos demostraron que los LPS lisos de Ap tienen a la vez antígenos que son específicos de serotipo y antígenos específicos de especie. En contraste a las formas rugosas de LPS no contienen antígenos específicos de serotipo pero tienen antígenos específicos de especie¹³.

También se propone que las reactividades serológicas diferentes al LPS de Ap reflejan las diferencias en la composición química de este componente de la pared celular^{5,13}.

1.5.1.2 FIMBRIA

La fimbria, hace posible la adhesión bacteriana a tejidos, la adherencia a células hospederas es algunas veces considerada como un paso inicial en la patogénesis de la enfermedad. La hemaglutinación por células bacterianas sirve como modelo de la adherencia bacteriana a células epiteliales^{53,41}.

En México se han realizado una serie de trabajos¹⁵ que mostraron que cuando se inocularon cerdos, conejos, ratones y cuyes por nebulización con *A. pleuropneumoniae* (en una cámara de aerosoles), sólo los cerdos se infectaron y murieron con inóculos que variaron de 2×10^4 hasta 2×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ ml). Estas evidencias muestran la alta especificidad de especie de *A. pleuropneumoniae* hacia el cerdo, sugiriendo probablemente, que el cerdo posee receptores específicos hacia el factor de adherencia de esta bacteria.

En otros estudios¹⁵ se han identificado en *A. pleuropneumoniae* estructuras semejantes a fimbrias o pilis citoadherentes, denominadas también adhesinas. Sin embargo, no se han encontrado estos apéndices extracelulares en Ap cultivados *in vitro*, y al parecer sólo la bacteria expresa estos antígenos en el cerdo. Se han identificado estas estructuras mediante microscopía electrónica y estudios de patogenicidad en cerdos SPF, en donde se demuestra que *A. pleuropneumoniae* tiene y presenta factores de adherencia o pilis citoadherentes en el cerdo, mientras que sólo se mantienen estos pilis en los primeros pases de la bacteria en medios de cultivo *in vitro*^{15,31}.

1.5.1.3 PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA

Algunos investigadores⁶⁷ han separado las proteínas de membrana externa las cuales, las mejor detectadas por SDS-PAGE tienen un peso molecular aparente de 76, 50, 39 y 29 kDa. Estas proteínas demostraron estar libres de endotoxinas. Las proteínas de 76, 50 y 39 kDa mostraron estar expuestas en la superficie.

Las proteínas de membrana externa son antigénicas en el cerdo, demostraron que una mayor parte de la actividad opsónica en suero de cerdos infectados con *A. pleuropneumoniae* en fase convaleciente se debió a anticuerpos contra proteínas integrales de membrana externa⁶⁸.

1.5.1.4 EXOTOXINAS

Estas inactivan macrófagos, neutrófilos y otras células inmunes. Las citotoxinas (hemolisinas) son los factores de virulencia mejor estudiadas, algunas son dependientes de Ca^{++} para su síntesis (APXI), o para su actividad (ApXI). La hemolisina tipo I (ApXI) es fuertemente hemolítica y muestra actividad citotóxica hacia macrófagos y neutrófilos alveolares porcinos. Esta tiene una masa molecular aparente en el rango de 105 a 110 kDa^{27,17}.

Las hemolisinas contienen secuencias repetitivas, actúan a través de la formación de poros y están incluidas en el grupo de las citotoxinas RTX (Repeat toxin)²⁶.

La designación ApxII fue propuesta para la toxina RTX la que es producida por todos los serotipos de las cepas de referencia (serotipos 1,5a,5b,9,10 y 11), excepto el serotipo 10. Esta proteína es débilmente hemolítica y moderadamente citotóxica y tiene una masa molecular aparente entre 103 y 105 kDa. La designación Apx III se propuso para la toxina RTX no hemolítica de las cepas de referencia para los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8. Esta proteína es fuertemente citotóxica y tiene una masa molecular aparente de 120 kDa²⁷.

La tabla 2 muestra las designaciones para las toxinas RTX encontradas en *A. pleuropneumoniae*.

Las hemolisinas contienen secuencias repetitivas, actúan a través de la formación de poros y están incluidas en el grupo de las citotoxinas RTX (Repeat toxin)⁶⁶.

La designación ApxII fue propuesta para la toxina RTX la que es producida por todos los serotipos de las cepas de referencia (serotipos 1,5a,5b,9,10 y 11), excepto el serotipo 10. Esta proteína es débilmente hemolítica y moderadamente citotóxica y tiene una masa molecular aparente entre 103 y 105 kDa. La designación Apx III se propuso para la toxina RTX no hemolítica de las cepas de referencia para los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8. Esta proteína es fuertemente citotóxica y tiene una masa molecular aparente de 120 kDa²⁷.

La tabla 2 muestra las designaciones para las toxinas RTX encontradas en *A. pleuropneumoniae*.

Tabla 2. Designaciones usadas para varias toxinas RTX encontradas en *A. pleuropneumoniae* ²⁷.

Nueva designación		Sinónimos	
Nombre de la toxina	Proteína/símbolos del gen	Nombre de la toxina	Proteína/símbolos del gen
Toxina RTX I	Apx I	Hemolisina I	Hly I
	apx IC		hly C
	apx IA		hly IA
	apx IB		hly IB
	apx ID		hly ID
Toxina RTX II	Apx II	Hemolisina II	Hly II
	apx IIC		hly IIC
	apx IIA		hly IIA
Toxina RTX III	Apx III	Pleurotoxina	Ptx
	apx IIC		
	apx IIIA		ptxA
	apx IIIB		
	apx IIID		

1.5.1.5 PROTEASAS

Se ha determinado⁴⁹ si el *A. pleuropneumoniae* podría secretar proteasas como factores de virulencia potenciales, usando geles sustrato para detectar actividad proteolítica en sobrenadantes de cultivo, los sustratos porcinos usados fueron gelatina, hemoglobina e IgA. Las bandas de varios pesos moleculares con actividad se encontraron en las primeras horas de cultivo, estas actividades degradaron la gelatina en un amplio rango de pH con un óptimo a pH 7.0. Concluyendo que son metaloproteasas dependientes de Ca^{++} . Como las proteasas de los sobrenadantes degradaron IgA porcina, estas pueden ser factores de virulencia. Por otra parte otros investigadores⁴⁹ también buscaron actividad hemolítica en sobrenadantes de cultivo de Ap serotipos 1 y 5, no encontrando nada al respecto pero detectaron un factor de permeabilidad⁵². La tabla 3 muestra algunos factores de virulencia de *A. pleuropneumoniae*.

Tabla 3. Factores de virulencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* ⁵³

Estructura celular	Función	Composición	Referencia
Fimbria	Adhesión	Proteínica	(55)
Cápsula	Evasión de fagocitosis	Polisacárido	(24)
Hemolisinas	Lisis de células rojas	Proteínica	(6,8)
Citotoxinas	Toxicidad a células	Proteínica	(8,10)
Membrana externa	Choque endotóxico	Lipopolisacárido	(51)
Receptores	Captación de hierro	Proteínica	(20)
Factor de permeabilidad	Desconocido	Desconocida	(30)
Proteasas	Degradación de sustratos	Proteínica	(28,36)

1.6 DIAGNÓSTICO

1.6.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Los métodos comúnmente utilizados para el diagnóstico de Infecciones por Ap en cerdo son:

- a) Signos y curso de la enfermedad en el cerdo individual y en la piara.
- b) Ensayos post-mortem.
- c) Aislamiento de la bacteria del tracto respiratorio.
- d) Serología.

a) Signos y curso de la enfermedad en el cerdo individual y en la piara

La muerte repentina sin signos clínicos o lesiones externas es común en casos hiperagudos de pleuroneumonía. Muertes peragudas usualmente ocurren en cerdos en buenas condiciones. Si son observados signos clínicos pueden incluir, fiebre alta, apatía, anorexia, y severos disturbios respiratorios, diarrea escasa, vómito y puede ocurrir epistaxis especialmente como eventos terminales o cerca de término. Los signos clínicos de la forma aguda son respiración por hocico, disnea, tos, depresión, fiebre y anorexia. Los signos clínicos de las formas subaguda y crónica de la enfermedad son no específicos: los cerdos pueden tener poca o nada de fiebre, disminución del apetito y disminución en el rango de ganancia de peso, ellos raramente mueren. Las

infecciones subclínicas son comunes resultando en baja conversión alimenticia, disminución del rango de crecimiento, retraso en salir al mercado e incremento en los costos de producción⁷⁰.

b) Ensayos post-mortem.

Las lesiones observadas pueden ser neumonía fibrica lobular con pleuritis. En casos crónicos hay una pleuritis fibrosa y los pulmones pueden tener necrosis local de tamaño y distribución variable.

En piaras contagiadas la examinación post-mortem es importante y podría en muchos casos, permitir un correcto diagnóstico⁵⁵.

c) Aislamiento de la bacteria del tracto respiratorio.

El aislamiento de Ap por métodos rutinarios de cultivo es difícil, ya que es común el crecimiento de otros microorganismos como *Pasteurella multocida*, la cual en algunas ocasiones se ha demostrado que inhibe el crecimiento del Ap. El cultivo directo, especialmente de lesiones crónicas, usualmente da resultados negativos.

Son necesarios medios y técnicas especiales para favorecer el crecimiento del Ap y evitar o disminuir el sobrecrecimiento de otros microorganismos de la flora normal del tracto respiratorio. Para ello es necesario la técnica de dilución y el uso de medio selectivo especial, sin

embargo no es posible suprimir completamente el crecimiento de otras bacterias sin alguna disminución del crecimiento del Ap⁷⁰.

d) Serología.

Durante el curso de la infección aparecen anticuerpos en la sangre y pueden ser detectados por algunos sistemas de diagnóstico.

Se han desarrollado una amplia variedad de pruebas serológicas para detectar anticuerpos contra algunos de los 13 serotipos de *A. pleuropneumoniae* sin embargo pocos de estos serotipos son comúnmente detectados en una región geográfica determinada^{55,36}.

1.6.2 PRUEBAS SEROLÓGICAS

1.6.2.1 PRUEBA DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO (FC)

Es la prueba más común para la detección de anticuerpos a Ap. Sin embargo, es una prueba que requiere de muchos cuidados y no siempre segura debido a las actividades procomplementarias y algunas veces anticomplementarias del suero de cerdo^{38,8,7}.

Los títulos de sueros de cerdos infectados naturalmente son altamente variables, algunos animales infectados nunca manifiestan títulos significantes y

otros animales van de un estado positivo a uno negativo en un período de tiempo corto. Los animales con títulos negativos o bajos de FC pueden ser portadores del microorganismo³⁵.

1.6.2.2 PRUEBA DE ENZIMA LIGADA A INMUNOABSORBENTE (ELISA)

Esta prueba ha sido utilizada para la detección de anticuerpos contra la cápsula o antígenos somáticos, requiere que el antígeno purificado este adherido a una fase sólida³⁶.

Utilizando la prueba de ELISA para el diagnóstico específico por serotipo en cerdos comerciales infectados con *A. pleuropneumoniae*, se han encontrado niveles altos de reactividad no específica la cual no es evidente en suero de cerdos con infección leve. Tales reacciones no específicas probablemente reflejan la exposición a microorganismos antigénicamente relacionados, se ha usado un extracto preparado con EDTA como antígeno, (que contenía polisacáridos superficiales y antígenos proteínicos) encontrándose que era específico para serotipo. Esta prueba de ELISA resultó más sensible que la prueba de FC⁵.

1.6.2.3 PRUEBA DE AGLUTINACIÓN

La prueba de aglutinación rápida en porta objetos es el método más comúnmente usado para la tipificación serológica de rutina, es simple y fácil de realizar, sin embargo pueden surgir dificultades con su uso. La serotipificación por aglutinación rápida en porta objetos está basada en la aglutinación de células completas, se requiere de células en la fase mucolde encapsulada para su realización se ha reportado que la disociación de las formas lisa y rugosa pueden reducir la sensibilidad de esta prueba⁶.

La prueba de aglutinación en tubo con pretratamiento del suero con 2-mercaptoetanol (2-Me) ha mostrado ser más sensible que la prueba de FC para detectar infecciones tempranas, pero de sensibilidad baja para detectar infecciones crónicas⁶.

La coaglutinación ha sido de utilidad para la serotipificación de *A. pleuropneumoniae*, pero esta prueba, no es necesariamente específica para la cápsula³⁶. Esta prueba es generalmente aceptada como el método más conveniente para una rápida serotipificación³⁶.

Existen otras pruebas para clasificar serológicamente cepas de *A. pleuropneumoniae*, por ejemplo inmunofluorescencia, Inmunodifusión y la prueba de hemaglutinación indirecta. Estas pruebas son relativamente complejas y no son usadas comúnmente en el diagnóstico bacteriológico de

rutina. Para este propósito las pruebas de aglutinación en placa y menos frecuentemente la inmunodifusión simple son aplicadas³⁶.

Las pruebas 2-Me y ELISA son altamente específicas y más sensibles que la prueba FC. Una desventaja es que ocurren algunas reacciones cruzadas entre los serotipos, pero esto no interfiere con su utilidad como pruebas rápidas de clasificación⁶⁴. El diagnóstico de la PCP en países como México y otros de latinoamérica, se limita sólo a eso, al diagnóstico, y no a la evaluación real del estado inmune de la granja, mediante la utilización de la evaluación serológica en las diferentes etapas de la producción o perfiles serológicos, para la prevención y control de la enfermedad¹⁵.

1.6.3 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

La mayoría de los casos perseguidos de PCP son diferenciados de otras causas repentinas de muerte de cerdos jóvenes en buenas condiciones. Esta incluye envenenamiento con sal, reportado por Tubbs, R. C.⁷⁰, deficiencia de vitamina E/Selenio, infección con *H. parasuis*, síndrome de estrés porcino, ulceración gástrica, síndrome hemorrágico gástrico, torsión intestinal y salmonelosis sistémica. Todas estas condiciones, excepto la forma respiratoria de *H. parasuis*, son fácilmente diferenciados de Ap por lesiones macroscópicas de la necropsia⁷⁰.

Usualmente *H. parasuis* afecta otros sistemas, causando artritis, peritonitis y meningitis. Los signos e historia clínica, con cultivo bacteriano y resultados de histopatología, son usados en diagnóstico diferencial estrechos⁷⁰.

Casos de Ap agudos, subagudos y crónicos deben ser diferenciados de otras causas, como disnea, disturbios respiratorios, tos, retraso en crecimiento, incluyendo a *P. multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus spp*, virus de Aujeszky, *H. parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, influenza de cerdo, *Ascaris suum* y especies de *Metastrongylus*. Usando los métodos de diagnóstico como, ELISA, 2-Me o FC se puede diferenciar la enfermedad causada por el *A. pleuropneumoniae* de las enfermedades arriba mencionadas^{70,56}.

1.7 VACUNACIÓN Y CONTROL

Un control de Ap no es posible sólo por vacunación especialmente en piaras con alta exposición al microorganismo.

La vacunación con vacunas comerciales que contienen el serotipo agresor pueden disminuir la mortalidad pero no pueden prevenir la infección, la reducción en los rangos de crecimiento y las enormes lesiones⁷⁰.

Para el control de la diseminación de la pleuroneumonía, es necesario detectar los portadores. El aislamiento de la bacteria del tracto respiratorio

superior de cerdos portadores no es un procedimiento seguro o práctico de diagnóstico en un programa de control de la enfermedad⁴⁸.

Los factores bacterianos que son responsables de la virulencia en *A. pleuropneumoniae* entre otros incluye a las toxinas citotóxica y hemolítica RTX (Apx).

Las toxinas Apx lábiles al calor están consideradas particularmente importantes en el desarrollo de lesiones severas y en la inducción de inmunidad protectora en animales.

La protección por anticuerpos a la cápsula o LPS es también inadecuada, pero la cápsula es un factor de virulencia requerido y previene la opsonización y el paso de la bacteria en el pulmón por el hospedero. Las vacunas comunes de *A. pleuropneumoniae* muerto se sabe que son inadecuadas, particularmente en el desarrollo de lesiones e infecciones crónicas. Las vacunas muertas, aunque sin toxina Apx extracelulares, dan alguna protección inmune, indicando que antígenos somáticos pueden también contribuir a la protección. Evidencias recientes mostraron que una o más de las toxinas Apx de Ap pueden conferir mejor protección sobre cerdos que otros antígenos específicos que han sido examinados, (en varios experimentos se ha demostrado que una vacuna Ap contiene 4 componentes - 3 exotoxinas (Apx I, Apx II, Apx III) y una proteína de membrana externa - que induce mejor protección en cerdos expuestos con diferentes serotipos)^{39,49}.

En la crianza de cerdos con pocos animales positivos a Ap el organismo puede ser eliminado cerrando la piara y usando pruebas serológicas para identificar y elegir los cerdos positivos. En piaras con alto número de cerdos positivos es necesario repoblarlas completamente para eliminar el organismo. El destete temprano y la separación de cerdos jóvenes de los otros animales, puede prevenir la infección en cerdos jóvenes, debido a que la inmunidad maternal dura de 5 a 9 semanas⁷⁰.

En piaras de crianza donde es necesaria la introducción constante de animales, sólo deben ser introducidos aquellos que son seronegativos de piaras seronegativas y estos deben guardar cuarentena de 30 a 45 días, la inseminación artificial es también una alternativa⁷⁰.

Otras medidas de control incluyen limitación del estrés, separar y no mezclar cerdos, mantener la temperatura favorable y constante, ventilación adecuada, disminución del nivel de polvo y reducción de la densidad de cerdos⁷⁰.

1.8 PROTEÍNAS DE ESTRÉS

1.8.1 GENERALIDADES

La interacción entre un patógeno y su hospedero mamífero incluye cambios en el medio ambiente para ambos organismos. El patógeno generalmente encuentra una temperatura y nutrientes que difieren a los que estuvo expuesto fuera del mamífero. En el caso de un patógeno intracelular, las células hospederas tienen en su interior el medio ambiente alterado por el crecimiento del patógeno y por el esfuerzo que tiene que hacer la célula para contrarrestar los efectos de la infección⁵¹.

Los cambios en el medio ambiente llevan a cambios en la expresión genética, esto puede facilitar la sobrevivencia del patógeno y del hospedero (o célula hospedera)⁵⁰.

Las bacterias y los parásitos están expuestos a cambios substanciales en su medio ambiente cuando entran a un hospedero mamífero, y tienen que desarrollar mecanismos para adaptarse a estos cambios por ejemplo cuando la bacteria o parásito entran al hospedero usualmente experimentan un rápido cambio en la temperatura, la respuesta al imprevisto cambio en la temperatura induce el incremento de la síntesis de proteínas de choque térmico (hsp). Ya que diferentes estímulos producen los mismos mecanismos de defensa celular,

los investigadores ahora se refieren a esto como respuesta al estrés y a las moléculas expresadas como proteínas de estrés⁷².

La cascada de inducción de eventos celulares y moleculares después de la exposición a temperaturas elevadas y otras formas de estrés, ha sido investigada a varios niveles. A nivel molecular, se han identificado varias familias de proteínas de choque térmico. Estas proteínas de estrés han sido clasificadas en 2 subgrupos: las proteínas de peso molecular relativamente alto (65-110 kDa) y las proteínas de peso molecular bajo (15-30 kDa)⁵¹.

Se sabe que las células procariotes y eucariotes reaccionan a agresiones químicas y/o fisiológicas con la inducción de proteínas de estrés o choque térmico. Estudios⁴⁸ de proteínas de estrés muestran que estas proteínas juegan papeles importantes durante infecciones bacterianas.

El sistema inmune del mamífero tiene la habilidad para reconocer varias de las proteínas de estrés altamente conservadas generadas por un microorganismo, algunas de estas proteínas -está comprobado- pueden causar enfermedades autoinmunes. Debido a su naturaleza altamente conservada, son llamadas antígenos comunes y pueden causar problemas en pruebas serológicas inmunodiagnósticas, porque inducen anticuerpos reactivos que cruzan entre procariotes y eucariotes. El patógeno puede ser privado de ciertos nutrientes, expuesto a radicales de oxígeno, cambios en pH, calor, anaerobiosis, aerobiosis, daño a DNA, estrés osmótico, enzimas, luz ultravioleta

(radiación en general) y puede adaptarse a todos estos medios hostiles a través de cambios en la expresión de genes^{78,51,34,24,33,57}.

1.8.2 FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DE ESTRÉS

Las proteínas de estrés más estudiadas son hsp 70 y hsp 60. Estas proteínas ayudan a otras a plegarse, ensamblarse y translocarse a través de las membranas, así como a estabilizar complejos moleculares. En *E. coli* la Dnak (hsp70) y la GroEl (hsp60) son las proteínas de choque térmico más estudiadas. Los productos groE (GroEl y GroES) son esenciales para el crecimiento normal, incluyendo la síntesis eficiente de RNA, DNA y proteínas. Las proteínas GroEl son requeridas para ensamblar complejos proteínicos multiméricos. La Dnak está implicada en la iniciación de la replicación de DNA, división celular y replicación de bacteriófagos^{12,75}. Aunque cada proteína es codificada por un gen particular en procariones (hay procariones con más de un gen para hsp60), los eucariotes tienen un gen para hsp60 y múltiples genes para hsp70. La supresión del gen bacteriano para hsp70 lleva a severos defectos en el crecimiento celular. En células de levadura la supresión de estos genes de la mitocondria y retículo endoplásmico es letal, como lo es la supresión de subpartes específicas de esos genes de citoplasma^{51,12}.

1.8.3 RESPUESTA INMUNE A LAS PROTEÍNAS DE ESTRÉS

Durante una infección los mamíferos incrementan su respuesta inmune humoral y celular contra proteínas hsp70 y hsp60. De las dos proteínas de choque térmico, la hsp70 es el blanco más frecuente de la respuesta inmune por infección de parásitos, en contraste, la hsp60 es generalmente el antígeno dominante en infecciones bacterianas⁵¹.

Se sabe que GroEL y DnaK son inducidas durante la infección de macrófagos bajo condiciones que no involucran cambios térmicos^{12,51}. Las proteínas de estrés son importantes en la biología de la célula, en el sistema inmune en general, en la inflamación y funcionan como "chaperones" en la translocación de péptidos a través de membranas y en su ensamble a moléculas largas y complejos moleculares, por ejemplo en la formación de inmunoglobulinas y en el procesamiento y presentación de antígenos a los receptores de las células T, activación de linfocitos y macrófagos, selección de células T δ y γ y vigilancia inmune^{72,75}.

Las proteínas de estrés de varios patógenos producidas en el laboratorio por técnicas de DNA recombinante, pueden tener potencial como vacunas para la prevención de infecciones microbianas. Además, debido a que son inmunogénicas, las proteínas de estrés son consideradas como

adyuvantes. Unidas a proteínas virales, pueden mejorar la respuesta inmune contra estas infecciones⁷².

Los inmunólogos en años recientes han descubierto una posible conexión entre proteínas de estrés y enfermedades autoinmunes ya que se han observado en algunas ocasiones anticuerpos contra las proteínas de estrés del paciente. Si esas observaciones son confirmadas, podría ser de utilidad en el diagnóstico y quizá en el tratamiento de enfermedades autoinmunes^{72,77}.

1.8.4 PROTEÍNAS DE CHOQUE-pH

En estudios realizados en diferentes organismos se ha encontrado que como respuesta a un choque-pH se inducen proteínas semejantes a las inducidas por choque térmico, estrés osmótico, o por aerobiosis a baja temperatura. En *E. coli* se observó que después de un cambio de pH externo de 6.9 a 4.3 se indujeron proteínas que ya habían sido inducidas por otro tipo de estrés, así como otras proteínas que no habían sido inducidas antes; por ser inducidas por un cambio de pH ácido se les llamó proteínas de choque ácido (ASP)³⁴.

Taglich en 1987⁶³, observaron respuestas débiles en la inducción de proteínas en *E. coli* al realizar cambios de pH ácido, pero a pH alcalino se indujeron proteínas de choque térmico, por otro lado Y. L. Wu en 1994⁷⁶

observaron la inducción de 4 proteínas a pH 8.8, mientras que incubaciones a pH 4.0 y 5.0 no causaron la inducción significativa de proteínas; lo que indica que las observaciones están asociadas a las diferentes condiciones experimentales^{63,76}.

Martine Heyde³⁴ propone que las proteínas inducidas por un cambio ácido en *E. coli* (de las cuales 6 son también proteínas de choque térmico), podrían ser una ayuda para las células para adaptarse a la acidificación del medio. La dificultad para analizar el mecanismo responsable para mediar los cambios de pH en la expresión de genes es la diversidad de señales que son generadas cuando cambia el pH externo o interno. Dependiendo del organismo y las condiciones de crecimiento, los cambios en el pH externo (pH_o) pueden producir alteraciones en varios parámetros fisiológicos primarios, incluyendo pH interno (pH_i), la concentración de iones como K⁺ y Na⁺, la diferencia entre pH_o y pH_i, el potencial de membrana y la fuerza motora de protones (Que es la suma de la diferencia en la concentración de protones y el potencial de membrana y está relacionada o ligada a procesos como: (1) Entrada de ciertas sustancias a la célula contra un gradiente de concentración, (2) Mantenimiento de la estabilidad de la célula, (3) Mantenimiento del pH interno de la célula, (4) Movimiento flagelar y (5) Generación de ATP a partir de ADP). Cuando el pH_o se acerca al pH_i, la diferencia entre el pH_o y el pH_i es reducido, en ocasiones con un aumento en el potencial de membrana (asumiendo que la fuerza motora

de protones es altamente estable). Los cambios en estos parámetros pueden influir sobre otros procesos (e. g. energía de acoplamiento, fase de adsorción, soluto y transporte de iones, competencia, motilidad) las cuales pueden dar numerosas señales secundarias.

Teóricamente el mecanismo empleado por una célula para detectar un cambio en el pH ambiental puede ser dividido en tres categorías: 1) El efecto directo que el pH puede tener sobre la estructura normal o actividad de un componente celular, 2) La habilidad de la célula para responder a sólo un estado de ionización particular de una molécula pequeña (e. g. la habilidad de ciertos ácidos y bases débiles para cruzar la membrana sólo en su forma neutral), 3) La habilidad de componentes celulares para alterar sus propiedades en respuesta a cambios en pH relacionado a parámetros como potencial de membrana y la diferencia entre el pH_o y el pH_i (e. g. el requerimiento de un potencial de membrana suficiente para la entrada de antibióticos aminoglucósidos)⁵⁰.

Las proteínas de membrana están particularmente bien situadas para detectar un pH relacionado a señales de las tres clases⁵⁰. La exposición de *E. coli* y *S. typhimurium* a pH_o moderadamente bajo (pH 5.5 - 6.0) induce un proceso que protege a la célula de subsecuentes cambios de pH_o bajo (pH 3.4 - 4.0). Esta respuesta llamada tolerancia a la respuesta ácida (ATR) en *S. typhimurium* y habituación en *E. coli*, está caracterizada por el requerimiento de

la síntesis de proteínas durante un tratamiento a pH moderado. El propósito de este tratamiento de prechoque aparentemente es la inducción de un sistema el cual evita una disminución letal del pH interno^{56,25}.

La tolerancia a la respuesta ácida incluye dos pasos. El primer paso llamado choque pre-ácido es inducido a pHo de 5.8 e involucra la inducción del sistema pH de homeostasis y es funcional a pH externo a valores menores de 4.0. El segundo paso ocurre siguiendo un choque ácido, cambiando el pHo de un pH de 5.8 a un pH de 4.5 o más bajo y es llamado paso de choque post-ácido²⁶.

Los organismos neutrófilos como *S. typhimurium*, pueden crecer en un amplio rango de pH de 5 a 9 debido a que fisiológicamente se dispara el mecanismo pH de homeostasis que mantiene un pH interno relativamente constante sobre el rango de crecimiento en los valores de pH externo. La base de este fenómeno es primeramente la modulación de la bomba celular de protones (citocromos)²⁴.

La habituación a condiciones ácidas en *E. coli* parece ser muy similar al ATR de *S. typhimurium*, una síntesis de proteínas dependiente del proceso ocurrido a pHo 5.0 y 6.0 que permite que las células sobrevivan a condiciones más ácidas⁵⁶.

La respuesta a situaciones de estrés por cambios en el pH ambiental de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, no ha sido estudiada; debido a la importancia que tienen las proteínas de estrés en la respuesta inmune y en el funcionamiento celular, nosotros nos interesamos en saber si el *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 sintetiza estas proteínas de estrés en su membrana externa, como un mecanismo de defensa contra el hospedero ya que las proteínas de membrana externa están más expuestas y pueden interactuar con los elementos del sistema inmune del hospedero despertando una amplia respuesta inmune. Además, si estas proteínas son sintetizadas por *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 y reconocidas por anticuerpos presentes en sueros de cerdo positivos a Ap serotipo 1, su identificación, purificación y estudio pueden ser de utilidad en el desarrollo de inmunógenos que ayuden a prevenir y controlar la PCP 1.

Este estudio sería de importancia ya que esta enfermedad causa grandes pérdidas económicas en la porcicultura a nivel mundial, además de que no se cuenta con Inmunógenos adecuados para prevenirla y controlarla.

2. HIPÓTESIS

Si el *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 es expuesto a diferentes condiciones de pH, responderá modificando el patrón electroforético de proteínas de membrana externa (Proteínas de choque pH) como un mecanismo de defensa a las agresiones del medio.

3. OBJETIVOS

- Obtener el patrón electroforético de las proteínas intrínsecas de membrana del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, expuesto a diferentes condiciones de pH (5.5, 7.4 y 9.5).
- Comparar los patrones de migración electroforética obtenidos a las diferentes condiciones de pH y resaltar las proteínas comunes y diferentes en cada patrón electroforético.
- Determinar la antigenicidad de las proteínas de membrana del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 expresadas en las diferentes condiciones de pH.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1 CEPAS

a. Cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 ATCC número 27088

b. Cepa de *Staphylococcus aureus* cepa cowan 1

Ambas fueron obtenidas de la Coordinación de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

4.1.2 SUEROS

Los sueros de cerdo tanto positivos como negativos a *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 fueron obtenidos de muestreos en granjas con brotes comprobados de la zona de Morelia, Michoacán.

La positividad de estos sueros fue probada por la prueba de aglutinación usando bacteria inactivada como antígeno⁵⁹.

4.2 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados fueron Agar de infusión de cerebro y corazón (BHI), preparado en forma convencional y complementado, Agar Sangre y Caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI), normal y complementado, todos ellos marca BIOXON. El agar y el caldo BHI se complementaron con NAD puro (SIGMA) al 0.01%.

4.3 REACTIVOS

Todas las sustancias utilizadas fueron grado reactivo marca SIGMA, MERCK y BAKER.

4.3.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Los detalles en la preparación de las soluciones se describen en el apéndice.

La figura 1 describe de manera muy general mediante un diagrama de flujo el desarrollo del método.

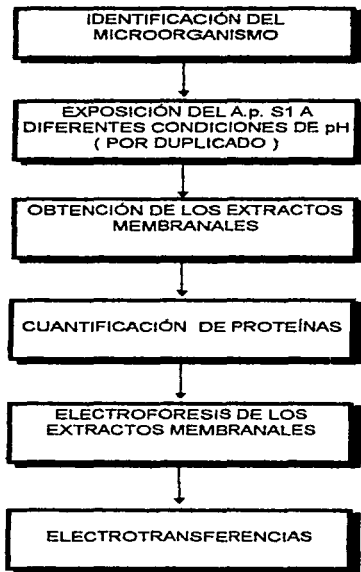


Fig. 1 Diagrama de flujo

4.4 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

4.4.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

La identificación de los microorganismos se llevó a cabo por medio de las siguientes pruebas bioquímicas, tinción de Gram, morfología, satelitismo, pruebas de CAMP y ureasa.

- a. Tinción de Gram, se realizó de acuerdo a la literatura^{3,47}
- b. Prueba de satelitismo^{3,47}

Se realizó inoculando el microorganismo por examinar a todo lo largo de una placa de agar BHI, posteriormente se colocó un inóculo de la cepa nodriza productora de NAD (*S. aureus*) en forma perpendicular al estriado de la bacteria examinada (*Actinobacillus pleuropneumoniae*). Una reacción positiva fue considerada cuando *A. pleuropneumoniae* creció en la periferia de la cepa nodriza.

- c. Prueba de CAMP^{3,47}

Es la capacidad para mejorar la hemólisis producida a eritrocitos por la toxina β de *S. aureus*. El aumento en la hemólisis en zona de difusión de esta toxina es conocida como reacción de CAMP²⁰. 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.

d. Prueba de ureasa^{3,47}

Esta prueba detecta los microorganismos que utilizan a la urea como fuente de nitrógeno por medio de la enzima ureasa, la urea es hidrolizada dando carbonato de amonio como producto final, dando propiedades alcalinas al medio lo que provoca el vire del indicador a un color rojo-rosado.

4.5 EXPOSICIÓN DEL *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 1 A DIFERENTES CONDICIONES DE pH

- 1) Se sembró *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 en suficientes cajas de agar BHI complementado para obtener una masa bacteriana considerable.
- 2) Se incubaron las cajas durante 24 horas a 37°C.
- 3) Se cosechó el microorganismo en condiciones estériles con solución salina fisiológica (SSF).
- 4) Se resuspendió la masa bacteriana obtenida en SSF.
- 5) Se inocularon 10 ml de suspensión bacteriana a caldo BHI complementado y se incubaron a 37°C con agitación constante de acuerdo a como se indica en la tabla 4.

Todo el procedimiento se realizó por duplicado

Tabla 4. Tiempo de exposición del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 a las diferentes condiciones de pH

pH	Tubo	Tiempo (horas)
5.5	1	0
	2	0.5
	3	1
	4	2
7.4	1	0
	2	0.5
	3	1
	4	2
9.5	1	0
	2	0.5
	3	1
	4	2

4.6 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES

Una vez concluido cada uno de los tiempos de exposición se realizó el siguiente tratamiento:

- 1) Se centrifugó a 1000g durante 15 minutos.
- 2) Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla obtenida con SSF (1000g/15 min)
- 3) Se resuspendió la pastilla en 5 ml de SSF.
- 4) Se sonicó la suspensión bacteriana a 60 ciclos durante 10 minutos (se repitió el proceso varias veces hasta que se eliminó la mayoría de las células completas). Esto se realizó con un sonicador 50 Watt ultrasonic homogenizer, Cole-Parmer Instrument Co. número de catalogo Z19,269-4, con una punta de 2mm de diámetro número de catalogo Z19,278-3 en cámara de hielo a una temperatura entre 0°C y 5°C.
- 5) Se centrifugó a 1000g 15 min para separar las células completas que pudieron haber quedado de los extractos membranales.
- 6) Se desechó la pastilla y se centrifugó el sobrenadante a 19980g durante 1 hora para obtener los extractos membranales.
- 7) Se resuspendió la pastilla en 1 ml de SSF.
- 8) Se realizó la cuantificación de proteínas de los extractos membranales por el método de Bradford^o.

4.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (Método de Bradford)

La cuantificación de proteínas se realizó a todos los extractos de las diferentes condiciones trabajadas, por el método de Bradford^P, la prueba se realizó por duplicado para ello se preparó una curva de calibración (curva estándar) como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Preparación de la curva de calibración

(Método de Bradford)

Tubo	0	1	2	3	4	5	P
Sol. estándar ASB 0.01% (ml)	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
Agua destilada (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	-	0.9
Reactivo de Bradford (ml)	5	5	5	5	5	5	5
Extracto membranal (ml)	-	-	-	-	-	-	0.1

ASB: Albúmina sérica bovina

P: Tubos problema

4.8 ELECTROFORESIS DE LOS EXTRACTOS MEMBRANALES.^{50,32}

1) Se preparó el gel discontinuo de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio como se indica a continuación:

4.8.1 PREPARACIÓN DEL GEL DE SEPARACIÓN

1.5 M Tris (hidroximetilaminometano)-HCl, pH 8.8	2.50 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	0.10 ml
Acrilamida (30% acrilamida y 0.8% bis-acrilamida)	4.00 ml
Persulfato de amonio (10%)	50.0 μ l
Agua destilada	3.0 ml
TEMED	10.0 μ l

El gel de separación se preparó al 12% la mezcla se vertió rápidamente al molde que sirvió para formar el gel, guardando una pequeña cantidad para observar el momento de la polimerización.

4.8.2 PREPARACIÓN DEL GEL DE CONDENSACIÓN

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.50 ml
Dodecil sulfato de sodio	0.10 ml
Acrilamida (30% acrilamida y 0.8% bis-acrilamida)	1.30 ml
Persulfato de amonio (10%)	50.0 μ l
Agua destilada	6.10 ml
TEMED	10.0 μ l

Se adicionó la mezcla sobre el gel de separación con cuidado y rapidez, guardando una pequeña cantidad para observar el momento de la polimerización, se colocó un peine de 10 dientes, el cual se retiró cuando el gel polimerizó, dejando formados pozos bien definidos.

4.8.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

1) Los extractos membranales se diluyeron en relación 1:4 con solución digestora (ver apéndice) y se pusieron en baño María a ebullición durante 4 minutos.

4.8.4 CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO

Se preparó un gel para las muestras de cada condición de pH y se colocó un volumen de muestra diluida en los pozos formados en el gel, en el volumen agregado debe haber 20µg de proteínas, la muestra se agregó con una jeringa Hamilton. Además de las muestras se corrió en un pozo una muestra de proteína estándar (Marcador de peso molecular) con la finalidad de realizar posteriormente los cálculos de pesos moleculares de las proteínas desconocidas presentes en cada muestra. Las muestras se agregaron a los pozos en orden creciente de tiempo de exposición al pH (de izquierda a derecha marcador de peso molecular, muestras a 0, 0.5, 1 y 2 horas de exposición al pH).

La corriente a la cual se corrió el primer gel (gel concentrador) fue de 20 mA y la del segundo gel (gel de corrimiento) fue de 30 mA a temperatura ambiente, hasta que el colorante que sirve como referencia (Azul de bromofenol) llegó al final del gel de corrimiento.

4.8.5 TINCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN EL GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Se separó el gel del vidrio y la placa que sirvieron como molde para formarlo y se sumergió durante 3-4 horas en solución tefidora, ver apéndice.

Después del tiempo requerido para la tinción y fijación de las proteínas, el gel es sumergido en una mezcla de metanol, agua destilada y ácido acético glacial (solución desteñidora I) ver apéndice. Con cambios frecuentes de esta solución. Para eliminar el exceso de colorante el gel se sumergió posteriormente a la solución desteñidora II, ver apéndice.

4.8.6 DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEÍNAS OBSERVADAS EN EL GEL

El peso molecular fue calculado a partir de una curva estándar de proteínas. Esta curva estándar de proteínas fue generada trazando el coeficiente de movilidad relativa (Rf) de cada proteína estándar contra el Log_{10} de su peso molecular.

El peso molecular de las proteínas desconocidas se determinó localizando su Rf sobre la curva estándar e interpolando el valor del Log_{10} del peso molecular. El antilogaritmo de éste número es el peso molecular de la proteína desconocida. La movilidad relativa es el desplazamiento que tiene una muestra con respecto a la distancia total que corre la muestra y puede ser expresado con la siguiente fórmula:

Coefficiente de movilidad relativa (R_f) = D_p / D_m

D_p : Distancia recorrida por las proteínas

D_m : Distancia total recorrida por la muestra

4.9 ELECTROTRANSFERENCIA^{90,2}

4.9.1 TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS DEL GEL DE

POLIACRILAMIDA- SDS A MEMBRANA DE NITROCELULOSA

- 1) Se corrió un gel con la muestra de 2 horas para cada condición de pH
- 2) Se cortó un trozo de membrana de nitrocelulosa y dos de papel filtro al tamaño del gel.
- 3) Se humedeció la membrana y el papel filtro en solución amortiguadora de corrida (para transferencia) ver apéndice.
- 4) Se ensambló el gel, la membrana de nitrocelulosa y el papel filtro formando un "sandwich", evitando la formación de burbujas. Como se muestra en la figura 2.
- 5) Se llenó la cámara de transferencia con solución amortiguadora de corrida para transferencia.

- 6) Se colocó el "sandwich" completo en la cámara de transferencia de modo que quedara cubierto con la solución amortiguadora de corrida con la membrana de nitrocelulosa del lado al electrodo positivo (ánodo).
- 7) La transferencia se corrió a 18 volts durante 24 horas, con flujo de agua para evitar un calentamiento durante la transferencia.
- 8) Una vez terminada la transferencia se desmanteló el aparato. Se marcó la membrana mostrando la orientación del gel.
- 9) Para verificar la transferencia se tñó el gel como se indicó en el inciso 4.8.5, se cortó la membrana en tiras, la primera y la última se tñeron con solución Negro de Amido, ver apéndice.

Nota: Se decidió realizar las transferencias con los extractos de dos horas ya que en los patrones electroforéticos aparentemente se observan los mismos cambios a los tiempos de 0.5, 1 y 2 horas de exposición al pH.

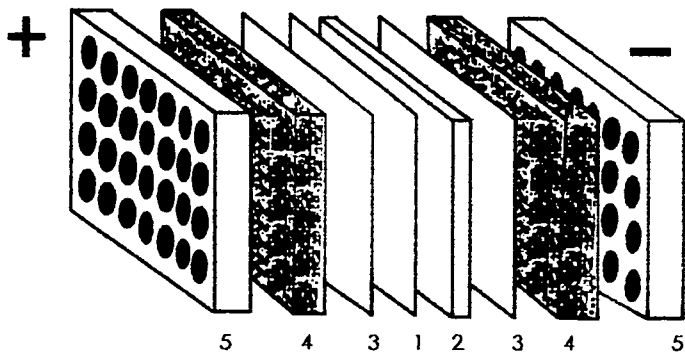


Fig. 2 Esquema de armado del "sandwich" para la electrotransferencia:
(1) Membrana de nitrocelulosa, **(2)** Gel de poliacrilamida, **(3)** Papel filtro, **(4)** Fibra, **(5)** Acrílico. Los signos negativo y positivo corresponden al cátodo y ánodo respectivamente.

4.9.2 BLOQUEO DE LOS SITIOS DE UNIÓN NO ESPECÍFICOS

- 1) Se cortó la membrana en tiras y se marcaron
- 2) Se sumergieron las tiras de membrana en solución bloqueadora (ver apéndice) por separado en tubos de ensaye previamente etiquetados durante 2 horas a temperatura ambiente.

4.9.3 DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS TRANSFERIDAS

- 1) Se sumergieron las tiras de membrana en sueros de cerdo positivos a *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 (los sueros fueron diluidos previamente 1:50)⁵⁰ durante 4 horas a temperatura ambiente.
- 2) Posteriormente las tiras se transfirieron a tubos de ensaye que contenían TBS (ver apéndice) con el fin de remover el exceso de suero. Se lavaron durante 15 minutos.
- 3) El paso anterior se repitió por lo menos tres veces.
- 4) Enseguida las tiras se transfirieron a tubos de ensaye que contenían proteína A peroxidasa (dilución 1:100) y se mantuvieron en agitación lenta durante 2 horas.
- 5) Posteriormente se lavaron con TBS por lo menos 3 veces (15 min cada lavado).

- 6) Se reveló la peroxidasa usando como sustrato 4-cloro1-naftol, ésta solución reveladora es preparada en el momento en que va a ser utilizada (ver apéndice).

5. RESULTADOS

5.1 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DEL *Actinobacillus*

pleuropneumoniae SEROTIPO 1

Las pruebas se realizaron continuamente durante el trabajo experimental con el fin de confirmar que era el microorganismo y que estaba puro, los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas se muestran en la tabla 6 .

Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1

PRUEBA	RESULTADO
Tinción de Gram	Negativo
Morfología colonial	Bacilo pequeño, pleomórfico ocasionalmente formando cadenas
Satelitismo	Positivo
CAMP	Positivo
Ureasa	Positivo

5.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS MEMBRANALES

Se obtuvo una pastilla amarillenta de consistencia mucosa de la cual se resuspendió en 1 ml de SSF, y se le realizó una tinción de Gram como prueba de pureza, no observándose célula alguna.

5.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de las proteínas se realizó como se explicó en 4.7, los valores de esta curva se resumen en la tabla 7. Con las lecturas de absorbancia a 595 nanómetros (nm) se realizó la curva patrón, la cual se muestra en la figura 3.

Los resultados del contenido proteínico de cada extracto membranar se muestran en la tabla 8. Para la obtención de estos datos, la absorbancia de cada extracto membranar se interpoló en la curva patrón.

Tabla 7. Valores obtenidos para la realización de la curva patrón
(Método de Bradford)

Proteínas μg	Absorbancia 595 nm
0	0
20	0.114
40	0.186
60	0.237
80	0.297
100	0.336

La gráfica correspondiente a estos datos se muestra en la figura 3
cuyos valores de regresión lineal son: r^2 : 0.9908, b: 0.002, m: 0.0675

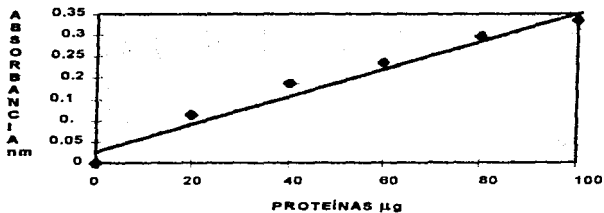


Fig. 3 CURVA PATRÓN DE PROTEÍNAS. (Método de Bradford.)

La curva patrón se empleó para determinar la concentración proteínica de los extractos membranales del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 los cuales se resumen en la tabla 8 .

Tabla 8. Contenido proteínico de los extractos membranales de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 a las diferentes condiciones de pH.

pH	Tiempo (horas)	[Proteínas] µg/µl
5.5	0	1.231
	0.5	3.045
	1.0	7.369
	2.0	2.684
7.4	0.0	3.369
	0.5	4.450
	1.0	4.306
	2.0	6.252
9.5	0.0	3.681
	0.5	5.855
	1.0	2.180
	2.0	4.450

Los datos de esta tabla se obtuvieron a partir de interpolar la absorbancia en la curva de proteínas.

5.4 OBTENCIÓN DEL PATRÓN ELECTROFORÉTICO

5.4.1 PATRÓN ELECTROFORÉTICO A pH 5.5

Los geles para la electroforésis se prepararon al 12%. La figura 4 muestra el patrón electroforético de los extractos membranales del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 expuestos a pH 5.5, en esta se observa la presencia de 4 bandas más intensas en cada carril, las cuales tienen un peso molecular de 76.50, 56.74, 31.21 y 17.17 kDa. Aparentemente no se observan cambios entre cada extracto, en el carril correspondiente al extracto de 2 horas se observan tres bandas más que no se observan a los tiempos 0, 0.5 y 1 horas de exposición al pH, estas bandas corresponden a proteínas de pesos moleculares aproximados de 28.38, 26.09 y 16.17 kDa (posibles proteínas de choque pH). Sin embargo a pH 7.4 se observa una banda de peso molecular de 26.70 kDa en todos los extractos.

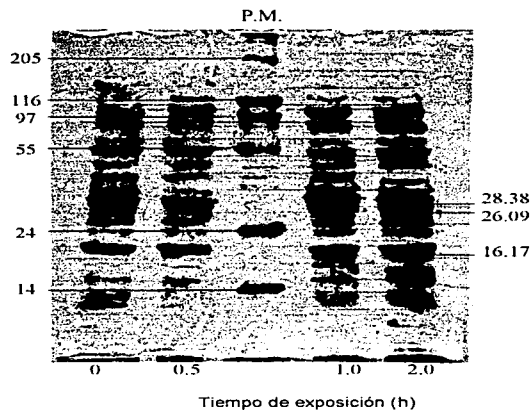


Fig. 4 Patrón electroforético del extracto membranal del A.p.1 expuesto a pH 5.5

Se observan bandas de posibles proteínas de choque-pH de pesos moleculares de 28.38, 26.09 y 16.17 kDa. Además de otras bandas más sobresalientes.

Los valores de movilidad relativa (Rf) de las proteínas estándar (marcador de peso molecular) se muestran en la tabla 9 .

Tabla 9. Muestra del coeficiente de movilidad relativa (Rf) de las proteínas estándar.

PROTEÍNAS ESTÁNDAR	PM	Log ₁₀ PM	Rf
Miosina	205	2.31	0.08
β-Galactosidasa	116	2.06	0.21
Fosforilasa B	97	1.98	0.26
Fructosa 6-fosfato quinasa	84	1.92	0.27
Albúmina	66	1.81	0.29
Glutámico deshidrogenasa	55	1.74	0.30
Ovoalbúmina	45	1.65	0.34
Gliceraldehído 3-Fosfato deshidrogenasa	36	1.55	0.39
Anhidrasa carbónica	29	1.46	0.42
Tripsinógeno	24	1.38	0.45
-Lactoalbumina	14.2	1.14	0.77

PM: Peso molecular en kDa

Rf: Coeficiente de movilidad relativa

Con estos datos se construyó la gráfica de la figura 5, la cual se empleó para el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas de los extractos membranales del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 expuestos a pH 5.5, pH 7.4 y pH 9.5 ya que el Rf de las proteínas estándar (Marcador de PM) en los tres casos es similar.

La figura 5 muestra la curva patrón de las proteínas estándar para la determinación de los pesos moleculares de las proteínas expresadas a pH 5.5, pH 7.4 y pH 9.5 de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.

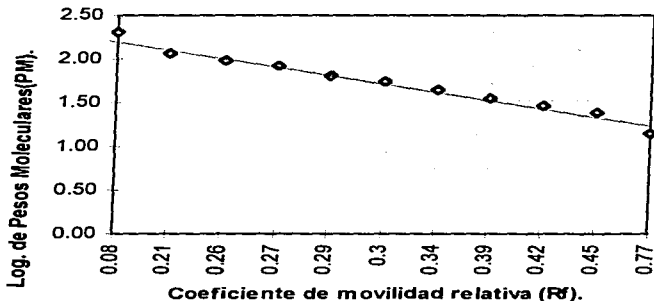


Fig. 5 CURVA PATRÓN DE PROTEÍNAS

Determinación de pesos moleculares

Los pesos moleculares de las proteínas de los extractos membranales del Ap 1 expuesto a pH 5.5 se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Pesos moleculares aproximados de las proteínas de los extractos membranales del *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 expuesto a pH 5.5

PESOS MOLECULARES			
Tiempo (horas)			
0	0.5	1	2
166.38	166.38	147.64	166.38
147.64	147.64	139.07	156.73
139.07	139.07	123.40	147.64
123.40	123.40	103.10	139.07
109.50	109.50	91.53	123.40
97.16	97.16	86.22	103.15
91.53	91.53	81.22	91.53
86.22	86.22	76.50	86.22
81.22	81.22	63.95	81.22
76.50	76.50	56.74	76.50
72.07	63.95	47.43	72.07
63.95	56.74	42.09	63.95
56.74	47.43	35.18	56.74
47.43	42.09	31.21	47.43

PESOS MOLECULARES			
Tiempo (horas)			
0	0.5	1	2
42.09	35.18	24.58	42.09
35.18	31.21	21.81	35.18
31.21	24.58	17.17	31.21
24.58	21.81	16.18	28.38
21.81	17.17	14.35	26.09
17.17	16.18	11.99	24.58
14.35	14.35	10.02	21.81
11.99	12.0	8.89	17.17
10.02	10.02	7.0	16.17
8.89	8.89	6.22	14.35
7.0	6.60	5.52	11.99
	5.86		10.02
			8.89
			7.0

5.4.2 PATRÓN ELECTROFORÉTICO pH 7.4

La figura 6 muestra el patrón electroforético de los extractos membranales del *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 expuestos a pH 7.4. En cada carril se observa la presencia de 4 bandas intensas y bien definidas de pesos moleculares de 82.16, 57.82, 30.73 y 17.51 kDa.

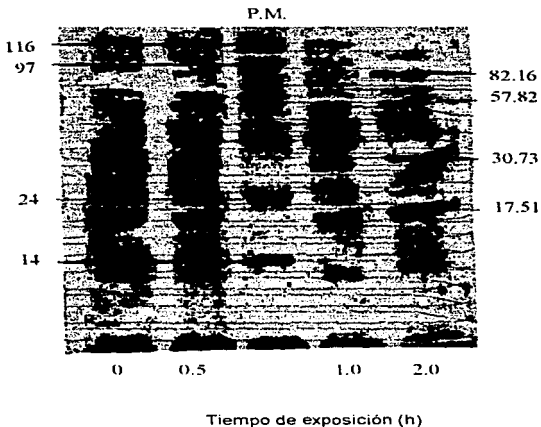


Fig. 6 Patrón electroforético del extracto membranal del A.p.1 expuesto a pH 7.4.

Se observa la presencia de 4 bandas intensas y bien definidas, cuyos pesos moleculares son: 82.16, 57.82, 30.73 y 17.51 kDa.

Los valores de movilidad relativa (Rf) de las proteínas estándar se muestran en la tabla 9.

Los pesos moleculares de las proteínas de los extractos membranales del *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 expuesto a pH 7.4 se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Pesos moleculares aproximados de las proteínas de los extractos membranales del *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 expuesto a pH 7.4

PESOS MOLECULARES			
Tiempo (horas)			
0	0.5	1	2
116.73	116.73	154.61	154.61
101.43	94.55	134.34	134.34
94.55	88.14	116.73	108.81
88.14	82.16	94.55	88.14
82.16	76.58	88.14	82.16
76.58	66.55	82.16	76.58
66.55	57.82	76.58	66.55
57.82	50.24	66.55	57.82
50.24	40.70	57.82	46.84
46.84	35.36	50.24	40.70
40.70	32.96	40.70	35.36
35.36	30.73	35.36	30.73

PESOS MOLECULARES			
Tiempo (horas)			
0	0.5	1	2
32.96	26.70	30.73	26.70
30.73	21.62	26.70	23.20
26.70	17.15	21.62	21.62
23.20	14.19	17.15	17.15
21.62	12.33	14.19	14.19
17.51	9.98	12.33	12.33
14.19	9.31	9.98	9.98
12.33	4.94	9.31	9.31
9.98		7.02	7.02
9.31		6.55	6.55
4.94		6.10	6.10

5.4.3 PATRÓN ELECTROFORÉTICO pH 9.5

La figura 7 muestra el patrón electroforético de los extractos membranales del Ap 1 expuesto a pH 9.5. En la figura se observa la presencia de tres bandas en los carriles de 0.5 a 2 horas de exposición y que no se observan a tiempo 0, cuyos pesos moleculares son de 64.18 (muy cercana a una banda observada a pH 5.5 de peso molecular de 63.95 kDa), 28.07 y 16.17 kDa. Igualmente se observa la presencia de las bandas más intensas y sobresalientes como en las otras dos condiciones de pH.

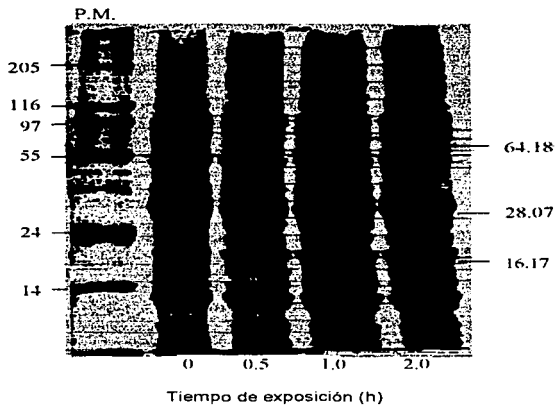


Fig. 7 Patrón electroforético del extracto membranal del A.p. 1 expuesto a pH 9.5

Se observa la presencia de tres bandas en los carriles de 0.5 a 2 hrs. De exposición y que no se observan a tiempo 0, cuyos pesos moleculares son: 64.18, 28.07 y 16.17 kDa.

Los valores de movilidad relativa (Rf) de las proteínas estándar se muestran en la tabla 9.

Los pesos moleculares de las proteínas expresadas a pH 9.5 de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 se muestran en la tabla 12 estos datos fueron obtenidos de interpolar su Rf respectivo en la curva patrón de las proteínas estándar.

Tabla 12. Muestra los pesos moleculares de las proteínas de los extractos membranales del *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 expuesto a pH 9.5

PESOS MOLECULARES			
Tiempo (horas)			
0	0.5	1	2
157.21	157.21	157.21	168.42
111.39	111.39	146.74	157.21
84.55	84.55	136.97	146.74
73.67	73.67	111.39	136.97
68.76	68.76	84.55	111.39
59.91	64.18	73.67	84.55
52.19	59.91	68.76	73.67
48.72	52.19	64.18	68.76
45.47	48.72	59.91	64.18
42.45	42.45	52.19	59.91
39.62	39.62	48.72	52.19
34.52	36.98	42.45	48.72
30.07	34.52	39.62	45.47
24.46	30.07	36.98	42.45

PESOS MOLECULARES			
Tiempo (horas)			
0	0.5	1	2
18.56	28.07	30.07	39.62
14.09	24.46	24.46	36.98
12.28	21.31	21.31	30.07
9.98	18.56	18.58	28.07
9.32	16.17	16.17	24.46
7.07	14.09	14.09	21.31
6.16	12.28	11.46	18.56
	9.98	9.98	16.17
	9.32	9.32	14.09
		7.58	12.28
		7.07	9.98
		6.16	9.32
			7.58
			7.07

5.5 OBTENCIÓN DEL PATRÓN ANTIGÉNICO

La figura 8 muestra el patrón antigénico del extracto membranal del *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 expuesto durante 2 horas a pH 5.5, se observa que las proteínas correspondientes a las bandas más sobresalientes en el gel de electroforesis tienen una marcada respuesta antigénica, además de otras proteínas que son reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de cerdo positivos a *A. pleuropneumoniae* serotipo 1. Observamos que proteínas de pesos moleculares de 29.28, 25.10 y 15.91 kDa fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de cerdo positivos a *A. pleuropneumoniae* serotipo 1. Probablemente se trata de las mismas proteínas (proteínas de choque pH) observadas en el gel de electroforesis ya que tienen una movilidad relativa semejante.

La figura 9 muestra el patrón antigénico del extracto membranal del *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 expuesto durante 2 horas a pH 7.4, en el cual se observa que las bandas más sobresalientes en el gel de electroforesis correspondiente fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de cerdo positivos a *A. pleuropneumoniae* serotipo 1. Además se observan las bandas de 15.91 y 29.28 kDa (no tan definidas como a pH 9.5).

La figura 10 muestra el patrón antigénico del extracto membranal del *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 expuesto durante 2 horas a pH 9.5, se observan bandas de proteínas que fueron reconocidas por los sueros de cerdo positivos a *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 cuyos pesos moleculares son de 63.25, 29.28, y 15.91 kDa por la posición en la que se encuentran (movilidad relativa) y la cercanía de su peso molecular con las bandas observadas en el gel de electroforesis probablemente se trata de las mismas proteínas. En esta condición es muy notoria la banda de peso molecular de 25.10 kDa.

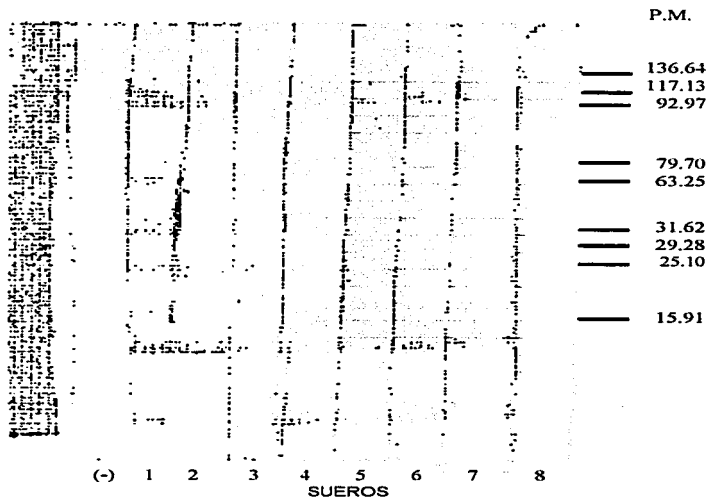


Fig. 8 Patrón antigénico del extracto proteínico del A.p.1 expuesto a pH 5.5 (2h).

Se observan las bandas de proteínas que fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de cerdo positivos a A.p.1, cuyos pesos moleculares son: 29.28, 25.10 y 15.91. kDa.

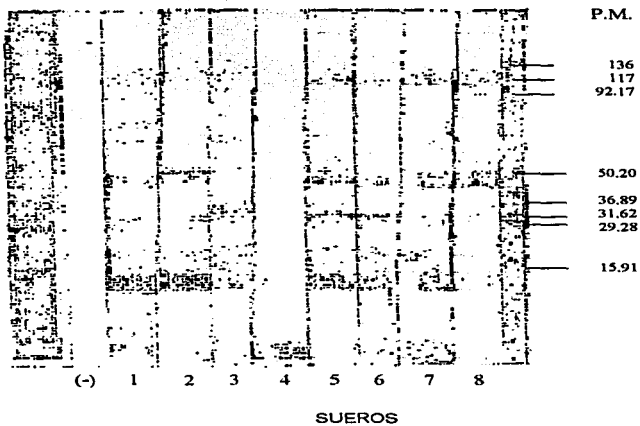


Fig. 9 Patrón antigénico del extracto proteínico del Ap1 expuesto a pH 7.4 (2h).

Se observa que las proteínas más sobresalientes en el gel de electroforesis fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de cerdo positivos a Ap1, además de la presencia de bandas de pesos moleculares de 29.28 y 15.91 kDa.

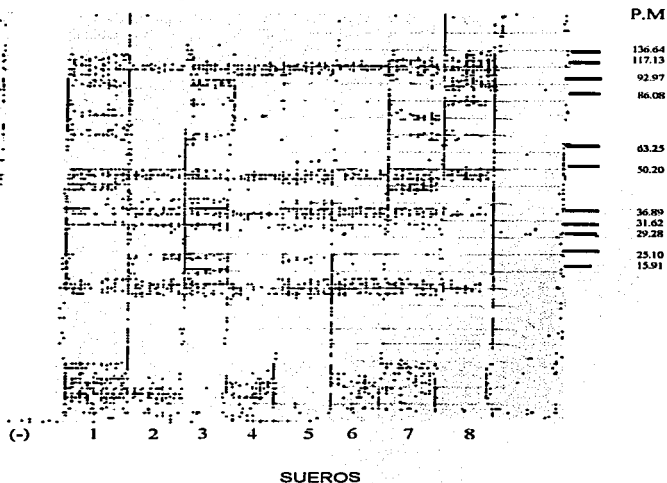


Fig. 10 Patrón antigénico del extracto proteínico del Ap1 expuesto a pH 9.5 (2h).

Se observan bandas de proteínas que fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de cerdos positivos a Ap1, cuyos pesos moleculares son: 63.25, 29.28, 15.91 kDa.

6. DISCUSIÓN

Estudios realizados en *E. coli*⁶³ demostraron que cambios alcalinos (pero no ácidos) en el pH externo activa la respuesta de choque térmico, observando una inducción de más de 6 veces las proteínas dnaK y groEL. Por otro lado otros investigadores³⁴ indujeron un grupo de proteínas después de un cambio de pH de 6.9 a 4.3 (cambio ácido), de ellas, 4 corresponden a las proteínas de choque térmico: GroEL, DnaK, HtpG y HtpM. Otras tres proteínas pH inducidas fueron previamente identificadas como proteínas de estrés inducidas por osmolaridad o aerobiosis a baja temperatura. Otras 7 fueron específicamente inducidas después de un cambio ácido y fueron llamadas proteínas de choque ácido (ASP). Sin embargo con cambios de pH de 6.9 a 5.0 no se indujo la síntesis de proteínas de choque ácido. Estas diferentes observaciones están asociadas a las diferentes condiciones experimentales que se utilizaron^{34,63}. En otro trabajo se indujeron 4 proteínas de 22, 38, 53 y 66 kDa a pH 8.6, mientras que a choque ácido de pH 4.0 y 5.0 no se produjo significativa inducción de proteínas en *Campylobacter jejuni* a las condiciones trabajadas en ese experimento⁷⁶. En nuestro trabajo se obtuvo la inducción de posibles proteínas de choque pH, si comparamos los patrones electroforéticos de los extractos proteínicos expuestos a pH 5.5 y 9.5 observamos que las bandas de las posibles proteínas de choque pH se encuentran en la misma

posición (movilidad relativa semejante) y tienen un peso molecular semejante: 28.38 y 16.17 kDa (a pH 5.5), 28.07 y 16.17 kDa (a pH 9.5). Estas proteínas estarían dentro del subgrupo de las proteínas clasificadas como proteínas de peso molecular bajo (de 15 a 30 kDa)⁴⁶, las bandas no se observan a tiempo 0 de exposición al pH correspondiente. A pH 5.5 se observa una proteína más de 26.09 kDa que no se observa a tiempo 0, sin embargo su peso molecular es muy cercano a una banda de 26.70 kDa observada a pH control (7.4). En el gel correspondiente al pH de 9.5 se observa una banda más la cual no se observa a tiempo 0, esta banda tiene un peso molecular de 64.18 kDa, sin embargo a pH 5.5 se observa una banda de peso molecular de 63.95 en todos los tiempos de exposición a ese pH.

En los geles electroforéticos de las 3 condiciones de pH se observa aparentemente el mismo patrón electroforético, así como la presencia de 4 bandas bien definidas y más intensas de pesos moleculares de 76.50, 56.74, 31.21 y 17.17 kDa (a pH 5.5), 82.16, 57.82, 30.73 y 17.51 kDa (a pH 7.4), 84.55, 52.19, 30.07 y 18.56 kDa (a pH 9.5), coincidiendo con lo reportado en estudios anteriores en *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en los cuales han estudiado las proteínas intrínsecas de membrana por SDS-PAGE, observando la presencia de 3 o 4 bandas bien definidas y más intensas^{66,48}. Debido a que los pesos moleculares son semejantes a los reportados podemos decir que se trata de proteínas con movilidad relativa semejante.

En este trabajo también observamos que las bandas de algunas proteínas se intensifican cuando el tiempo de exposición del microorganismo al pH es mayor.

En cuanto al patrón antigénico de las tres condiciones, aparentemente no se observan diferencias entre ellos.

De las probables proteínas de choque pH observadas en los geles electroforéticos estas fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de cerdo positivo a *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, cuyos pesos moleculares son 29.28, 25.10 y 15.91 kDa (a pH 5.5), 63.25, 29.28 y 15.91 kDa (a pH 9.5). De las proteínas de membrana externa separadas por Thwait's⁶⁸ se encuentra una de 29 kDa que no está expuesta en la superficie, nosotros encontramos una proteína de peso molecular similar de 29.28 kDa a pH 5.5 y 9.5, también observamos que de las proteínas de pesos moleculares mayores a 90 kDa observadas en el patrón electroforético de las 3 condiciones de pH, las de pH 5.5 y 9.5 son más notorias en el patrón antigénico que las de pH 7.4.

Los resultados obtenidos son válidos a las condiciones experimentales trabajadas, ya que cabe mencionar que en estudios²⁸ de choque ácido en *S. typhimurium* se observó que algunas de estas proteínas son transitorias, por lo que se debió haber realizado transferencias de todos los extractos de los diferentes tiempos de exposición al pH porque si bien electroforéticamente no se

observan cambios aparentes, tal vez en una transferencia pudieran observarse diferencias en el patrón antigénico .

En estudios^{76,66} sobre proteínas de estrés se muestra que estas proteínas juegan papeles importantes durante infecciones bacterianas, los mamíferos incrementan una intensa respuesta inmune humoral y celular contra estas proteínas durante la infección. Ya que algunas proteínas de estrés de bacterias son homólogas con las proteínas de estrés del hospedero, existe en individuos genéticamente susceptibles un riesgo constante de enfermedad autoinmune debido a dificultades en los mecanismos para diferenciar lo propio de lo extraño. Debido a que la infección ocasiona estrés para ambos (microorganismo y hospedero), por ejemplo durante la fagocitosis⁷⁵ ocurre en el momento de la respuesta inmune activa, un incremento en la síntesis y la expresión alterada de grupos extremadamente similares de moléculas autólogas y extrañas, colocando por lo tanto a las proteínas de estrés en la interfase entre la tolerancia y la autoinmunidad, sin embargo las proteínas de estrés son los mejores blancos en un amplio espectro de enfermedades infecciosas, datos recientes⁷⁰ sugieren que una importante línea de defensa involucra proteínas de estrés autólogas, especialmente péptidos conservados de hsp60, las cuales son presentadas a receptores de células T δ γ por moléculas de clase II del CMH ⁷⁵.

Los macrófagos alveolares representan una primera línea de defensa contra partículas inorgánicas y microorganismos inhalados en los pulmones. Con lo cual mantienen la esterilidad de los pulmones⁶³.

La superficie bacteriana interactúa directamente con los mecanismos de defensa del hospedero durante el proceso de infección. La composición de la superficie sólo puede determinar un grado la virulencia relativa de un patógeno. Actualmente se conocen varios factores de patogenidad de Ap, entre ellos están: antígenos capsulares, fimbrias, lipopolisacáridos, proteínas de membrana externa, exotoxinas y proteasas; aunque se conocen estos factores no se tiene un buen método serológico ni bacteriológico que nos ayude al diagnóstico de la enfermedad, y tampoco se cuenta con un inmunógeno adecuado para prevenir y controlar la enfermedad. Se sabe que las vacunas con las que se cuenta actualmente son inadecuadas ya que sólo dan alguna protección inmune, las vacunas comerciales que contienen el serotipo agresor pueden disminuir la mortalidad pero no pueden prevenir la infección, algunas sólo protegen contra el serotipo homólogo. Debido a estas circunstancias la pleuropneumonía por Ap sigue siendo una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas en la porcicultura a nivel mundial, por lo que nuestro trabajo se enfocó al estudio del perfil proteínico de las proteínas de membrana del Ap 1 ya que éste puede ser modificado como respuesta al estrés, sintetizando nuevas proteínas, y debido a que la superficie bacteriana interactúa directamente con los mecanismos de defensa del hospedero durante un

proceso de infección, es de interés estudiar las proteínas de estrés que pudieran estar presentes en la membrana del *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 ya que si se lograra identificar, caracterizar y aislar estas proteínas y posteriormente bloquearlas o bloquear su función, se provocarían daños en la integridad de la célula (en este caso *A. pleuropneumoniae* serotipo 1) y en consecuencia el sistema inmune del hospedero (el cerdo) eliminaría más fácilmente al microorganismo, esto nos permitiría la creación de un nuevo inmunógeno que nos sirva en la erradicación de la PCP de cerdos enfermos y la prevención de la misma en cerdos sanos. Se ha demostrado en otros trabajos⁷⁴ que estas proteínas despiertan una amplia respuesta inmune en el hospedero, además tienen epítopes específicos, los cuales son reconocidos por células T considerándolas como candidatos importantes para vacunas^{75,44,77} (esta demostrado que este tipo de enfermedad en el cerdo, la inmunidad protectora esta dada por inmunidad celular)⁵⁹, sin embargo 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, pueden poner en funcionamiento respuestas nocivas, aunque sabemos que hay riesgo, también hay evidencias que sugieren que los beneficios que estas proteínas pueden proporcionarnos, pueden ser mucho más grandes que el riesgo de enfermedad autoinmune⁴⁸. Por otra parte se ha demostrado que las proteínas de membrana de Ap son antigénicas en el cerdo, además de que anticuerpos

contra estas proteínas se desarrollan junto con inmunidad protectora⁸⁸. En estudios realizados en *neisseriae* y *gonococci*, el perfil de membrana externa fue alterado en respuesta a cambios de pH de crecimiento o por limitación de hierro, en ese trabajo se presentaron evidencias que la manipulación del pH y la disponibilidad de hierro en conjunto no sólo pueden cambiar el perfil proteínico de membrana externa si no también incrementan la virulencia relativa de ese organismo¹¹.

7. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron los diferentes patrones electroforéticos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 a las diferentes condiciones de pH. Los cuales son similares en los tres casos, observándose bandas de proteínas comunes, de pesos moleculares de aproximadamente 76.50, 56.74, 31.21 y 17.17 kDa (a pH 5.5), 82.16, 57.82, 30.73 y 17.51 kDa (a pH 7.4), 84.55, 52.19, 30.07 y 18.56 kDa (a pH 9.5).
2. Se determinaron proteínas de choque pH de 28.38, 26.09 y 16.17 kDa (a pH 5.5), 64.18, 28.07 y 16.17 kDa (a pH 9.5).
3. Las proteínas de choque pH encontradas fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de cerdo positivos al *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1.
4. El pH influyó en la intensificación de algunas bandas tanto en el patrón electroforético como en el patrón antigénico, estas bandas corresponden a proteínas de pesos moleculares mayores a 90 kDa (observadas a pH 5.5 y 9.5).

8. REFERENCIAS

1. Aguirre, G. R. 1995 Determinación de las proteínas de choque térmico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1. Tesis de licenciatura, UNAM.
2. Albert, W. H. Staines, N. A. Methods of Immunological Analysis. Vol.1 Fundamentals, Editorial VCH, Germany 1993 p.529-535
3. Baker, F. J. Manual de técnicas de microbiología médica Ed. Acribia, España 1990 p.18, 118, 129-130, 141
4. Bélanger, M., Dubreuil, D., Harsel, J., Girard, C. and Jacques, M. 1990 Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. Infection and Immunity **58**:3523-3530.
5. Bertram, T. A. 1990 *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Molecular Aspects of Virulence and Pulmonary Injury. Canadian Journal Veterinary Research **54**: S53-S56.
6. Bingham, R. J., Hall, k. S. and Slonczewski, J. L. 1990. Alkaline Induction of a Novel Gene Locus, *atx*, in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. **172**:2184-2186.
7. Bosse, J. T., Johnson, R. P. and Rosendal, S. 1990 Capsular Polysaccharide Antigens for Detection of serotype-specific Antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Canadian Journal Veterinary Research **54**:320-325.

8. Bosse, J. T., Johnson, R. P. and Rosendal S., 1990 Serodiagnosis of pleuropneumonia Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Capsular Polysaccharide Antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1,2,5 and 7. Canadian Journal Veterinary Research **54**:427-431.
9. Bradford, A.M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. Analytical Biochemistry **72**:248-254
10. Brandreth, S. R. and Smith, I. M. 1987 Comparative Virulence of some English Strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes 2 and 3 in the Pig. Research in Veterinary Science **42**:187-193
11. Brener, D; DeVoe, I. W. and Holbein, B. E. 1981 Increased Virulence of *Neisseria meningitidis* After in Vitro Iron-Limited Growth at Low -pH . Infection and Immunity, **33**: 59-66
12. Buchmeier, N. A. and Heffron, F. 1990 Induction of *Salmonella* Stress Proteins upon Infection of Macrophages. Science **248**:730-732
13. Byrd, W. and Kadis, S. 1989 Structures and Sugar Compositions of Lipopolysaccharides Isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. Infection and Immunity **57**:3901-3906
14. Ciprián, C. A., Medina, A. G., Fuentes, R. M., Pijoan, A. C., Torres, A. O., Colmenares, V. G. y Camacho, M. J. 1988 Serotificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en México. Veterinaria México **19**:205-210
15. Ciprián, C. A. y Mendoza, E. S. Aportaciones de la FES-Cuautitlán UNAM, en las investigaciones de las afecciones respiratorias del cerdos. Memorias del XXX Congreso Nacional de la Asociación Mexicana

de Veterinarios Especialistas en Cerdos 1995 Manzanillo Colima 1995 19-28 AMVEC Manzanillo Colima México.

16. Cowan, S. T. Manual for the Identification of Medical Bacteria, segunda edición, Ed. Cambridge University Press, Gran Bretaña 1975 p.96
17. Cruijssen, A. L. M., Van Leengued, L. A. M. G Stockhofe- Zurwieden, Kamp, E. M., Widjaja, A., Broekhuysen, P., Ham, M., Verheijden, J. H. M. 1996, Pathogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 9 Depends Upon Toxin Production. Proceedings of the 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna, Italy
18. Devenish, J; 1992 Association of the RTX Proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with Hemolytic, CAMP and Neutrophil-Cytotoxic Activities. *Infection and Immunity* 60:2139-2142
19. Devenish, J; Rosendal, S; Johnson, R. and Hubler, S. 1989 Immunoserological Comparison of 104-Kd Proteins Associated with Hemolysis and cytolysis in *A. pleuropneumoniae*, *A. suis*, *P. hemolytica*, and *E. coli*. *Infection and Immunity* 57:3210-3213
20. Eaves, L. and Blackall, PJ 1988 Serological characterisation of Australian Isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Australian Veterinary Journal* 65:379=381
21. Fales, W. H., Morehouse, L. G., Mittal, K. R., Bean-Knudsen, C., Kintner, L. D., Turk, J. R., Brown, T. P., Shaw, D. P. 1989 Antimicrobial Susceptibility and Serotypes of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* recovered from Missouri swine. *Journal Veterinary Diagnosis Investigation* 1: 16-19

22. Fedorka-Cray, P. J., Huether, M. J., Stine, D. L. and Anderson, G. A. 1990 Efficacy of Cell Extract from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 1 against Disease in swine. *Infection and Immunity* **58**: 358-365
23. Foster, J. W. 1991 *Salmonella* Acid Shock Proteins are Required for the Adaptive Acid Tolerance Response. *Journal of Bacteriology* **73**:6896-6902
24. Foster, J. W. 1992 Beyond pH homeostasis: The Acid Tolerance of *Salmonella*. *ASM News* **58**:266-270
25. Foster, J. W. and Hall, H. K 1991 Inducible pH homeostasis and the Acid Tolerance Response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **173**:5129-5135
26. Foster, J. W. 1993 The Acid Tolerance Response of *Salmonella typhimurium* Involves Transient Synthesis of Key Acid Shock Proteins. *Journal of Bacteriology* **175**:1981-1987
27. Frey, J., Perrin, J. and Nicolet, J. 1993 *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of Haemolysins, Cytolysins, Pleurotoxin and their genes. *Journal of General Microbiology* **139**:1723-1728
28. Frey, J; Perrin, J. and Nicolet, J. Biochemical and Genetic characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Hemolysin. *International Pig Veterinary Society Bacterial Infections* chapter III, 1990 p.70
29. Frey, J., Perrin, J. and Nicolet, J. 1989 Cloning and Expression of a Cohemolysin, the CAMP Factor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* **57**:2050-2058
30. Frey, J. and Nicolet, J. 1991 Immunological Properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Hemolysin I. *Veterinary Microbiology*, **28**:61-73

31. Garibay, E. J., González, G. S., Robless, R., Mendoza, E. S., Hernández, B. E., Ciprián, C. A. 1996 Extracelular Appendices in *Actinobacillus pleuropneumoniae* Isolated From Acute Cases of Pig Contagious Pleuropneumonia. Proceeding of the 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna, Italy
32. Garvery, J. S., Cremer, N. E., Sussdorf, D. H. Methods in Immunology, tercera edición, Ed. Benjamín, USA 1983 p. 93-94, 107-108
33. Hickey, E. W. and Hirshfield, I. N. 1990 Low-pH-Induced Effects on Patterns of Protein Synthesis and on Internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Applied and Environmental Microbiology 56:1038-1045
34. Heyde, M. and Portaller, R. 1990 Acid Shock Proteins of *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters 69:19-26
35. Hoffman, L. J. 1989 *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* : use of coagglutination and complement fixation to determine the relationship between presence of organisms and Antibody titer in Slaughterhouse pigs. Journal Veterinary Diagnosis Investigation 1:12-15
36. Hommez, J., Devriese, L. A., Castryck, F. and Cassimon, P. 1990 Slide Precipitation: a simple Method to type *Actinobacillus(Haemophilus) pleuropneumoniae*. Veterinary Microbiology 24:123-126
37. Inzana, T. J., Ma, J., Workman, T., Gogolewski, R. P. and Anderson, P. 1988 Virulence Properties and Protective Efficacy of Capsular Polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* Serotype 5. Infection and Immunity 56:1880-1889

38. Inzana, T. J., Clark, G. F. and Tood, J. 1990 Detection of Serotype-Specific Antibodies or Capsular Antigen of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by a Double-Label Radioimmunoassay. *Journal of Clinical Microbiology* **28**:312-318
39. Inzana, T. J., Todd, J. and Veit, H. P. 1993 Safety, Stability, and Efficacy of Noncapsulated Mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in Live Vaccines. *Infection and Immunity* **61**:1682-1686
40. Jacques, M., Bélanger, M., Roy, G. and Foiry, B. 1991 Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to Porcine Tracheal Epithelial Cells and Frozen Lung Sections. *Veterinary Microbiology* **27**:133-143
41. Jacques, M., Roy, G., and Mittal, K. R. 1988 Hemagglutinating Properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Canadian Journal Microbiol.* **34**:1045-1049
42. Jacques, M., Foiry, B., Higgins, R. and Mittal, K. R. 1988 Electron Microscopic Examination of Capsular Material from Various Serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **170**:3314-3318
43. Kamp, E. M., Popma, J. K., Anakotta, J. and Smits, M. A. 1991 Identification of Hemolytic and Cytotoxic Proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal Antibodies. *Infection and Immunity* **59**:3079-3085
44. Kaufmann, S. H. E., Schoel, Embden, Tetsuja Koga, A., Wand-Württenberger, Munk M. E. and Steinhoff, U. 1991 Heat-Shock Protein 60: Implications for Pathogenesis of and Protection Against Bacterial Infections. *Immunological Reviews* No. 121 p. 76-87

45. Liggett, A. D. and Harrison, L. R. 1987 Sequential Study of Lesion development in Experimental *Haemophilus pleuropneumonia*. *Research in Veterinary Science* **42**:204-212
46. Lindquist S. and Craig E. A., 1988 The Heat Shock Proteins. *Annual Review of Genetics*. **22** :631-677
47. Mac Fadin Pruebas para la identificación de bacterias de importancia clinica, Ed. Panamericana, primera reimpression México D.F. 1990 p. 183-184
48. MacInnes, J. I. and Rosendal, S 1987 Analysis of Major Antigens of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* and Related Organisms. *Infection and Immunity* **55**:1626-1634
49. Martelli, P., Guadagnini, P. F., Foccoli, E., Ballarini, G, 1996 Efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* Subunit Vaccine in the Pleuropneumonia: A Fiel Trial, Proceedings of the 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna, Italy
50. Miron, T, Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M. and Geiger, B. 1991 A 25kD Inhibitor of Actin Polymerization Is a low Molecular Mass Heat Shock Protein, *Journal of Cell Biology* **114**:255-261
51. Murray, P. J. and Young, R. A. 1992 Stress and Immunological Recognition in Host-Pathogen Interactions. *Journal of Bacteriology* **174**:4193-4196
52. Negrete-Abascal, E., Tenorio, V. R., Serrano, J. J., García, C. C. and De la Garza, M. 1994 Secreted Proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 Degrade Porcine Gelatin, Hemoglobin and Immunoglobulin A. *Canadian Journal Veterinary Research* **58**:83-86

53. Negrete-Abascal, E., Tenorio, V., García, C., Godínez, D., Serrano, J. J., Alvarez, de la C. J. and De la Garza, M. 1994 *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Virulence and Gene Cloning. Archives of Medical Research **25**:229-233
54. Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Schaechter, M. Physiology of the bacterial cell USA 1990 primera edición p.156-157
55. Nielsen, R. *Haemophilus pleuropneumoniae* Diagnosis, Immunity and Control. Compendium on Swine Haemophilus pleuropneumonia. American Association of Swine Iowa USA 1985 p.14-18
56. Olson, R. E. 1993 Influence of pH on Bacterial Gene Expression. Molecular Microbiology **8**:5-14
57. Rogers, R. J., Le, E., Blackall, P.J. and Truman, K.F. 1990 The Comparative Pathogenicity of four Serovars of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Australian Veterinary Journal **67**:9-12
58. Romero, R. A., Camacho, M. J., Barcenas, M. G. y Montaraz, C. J. A. 1992 Patrones electroforéticos y antígenicos de los serotipos 1,2,5 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Veterinaria México **XXIII**: 125-130
59. Romero, R. A 1989 Analisis de extractos membranales de *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* (tesis de maestría) UNAM
60. Rosendal, S., MacInnes, J. I. 1990 Characterization of Attenuated Strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Serotype 1. American Journal Veterinary Research **51**:711-717
61. Stephens, R. L. 1990 Positive and Negative Aspects of Host Immune Response to *Haemophilus*, *Actinobacillus* and *Pasteurella*. Canadian Journal Veterinary Research **54**:S41-S44

62. Stine, D. L., Huether, M. J., Moxley, R. A. and Srikumaran, S. 1991 *Actinobacillus pleuropneumoniae* Induced Thymic Lesions in Mice and Pigs. *Infection and Immunity* **59**:2885-2891
63. Taglicht, D., Padan, E., Oppenheim, A. B. and Schuldiner, S. 1987 An Alkaline Shift Induces the Heat-Shock Response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **169**:885-887
64. Tarasiuk, K., Hogg, A., Pejsak, Z. 1996 Evaluation of Hemolysin Neutralization Titers in Pigs Vaccinated With *Actinobacillus pleuropneumoniae* Whole Cell Subunit Vaccine. *Proceedings of The 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna, Italy*
65. Tarigan, S., Slocombe, R. F., Browning, G. F., Kimpton, W. 1994 Functional and Structural Changes of Porcine Alveolar Macrophages Induced by Sublytic Doses of a Heat-Labile, Hemolytic, Cytotoxic Substance Produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *American Journal Veterinary Research* **55**:1548-1557
66. Terraciano, J. S., Rapaport, E. and Kashket, E. R. 1988 Stress and Growth Phase- Associated Proteins of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**:1989-1995
67. Thwaites, R. and Kadis, S. 1991 Immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer Membrane Proteins and Enhancement of phagocytosis by Antibodies to the Proteins. *Infection and Immunity* **59**: S44-S49
68. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings National Academic of Sciences, USA* **76**:4350-4354

69. Tubbs, R. C. 1988 Managing the swine herd that's been Infected with *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Veterinary Medicine* 83 : 220-229
70. Utrera, V., Trigo, E. and Pijoan, C. Comparative Study of High and Low Virulence Strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1. *International Pig Veterinary Society, Bacterial Infections chapter III 1990* p.66
71. Welch, W, J 1993 How Cell Respond to Stress. *Scientific-American* 5:56-64
72. Willson, J. P., Falk, Gloria and Klashinsky, S. 1987 Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Infection in Pigs. *Canadian Veterinary Journal* 28:11-116
73. Willson, J. P. 1990 *Haemophilus, Actinobacillus, Pasteurella: Mechanims of Resistance and Antibiotic Therapy*. *Canadian Journal Veterinary Research* 54: S73-S77
74. Winfield, J. B. and Jarjour, W. N. 1991 Stress Proteins , Autoimmunity, and Autoimmune Disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 176:161-179
75. Wu, Y. L., Lee, L. H., Rollins, D. M. and Ching, W. M. 1994 Heat Shock and Alkaline pH Induced Proteins of *Campilobacter jejuni*: Characterization and Immunological Properties. *Infection and Immunity* 62:4256-4260
76. Young, A. R. and Elliott, J. T. 1989 Stress Proteins, Infection, and Immune Surveillance. *Cell* 59:5-8

9. APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución salina fisiológica (SSF)

Cloruro de sodio	0.85 g
Agua destilada	100 ml

Reactivo de Bradford

Azul brillante de Coomassie (G-250)	50 mg
Etanol al 95 %	25 ml
Ácido orto-fosfórico al 85 %	50 ml
Aforar a 500 ml	

Amortiguador tris (Hidroximetilaminometano)-HCl 1.5 M

Tris-base	18.75 g
Agua destilada	80 ml
Ajustar a pH 8.8 con HCl 1N	
Llevar a 150 ml con agua destilada y almacenar a 4° C	

Amortiguador Tris-HCl 0.5 M

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	

Acrlamida/ BIS (30% stock)

Acrlamida	29.2 g
Bis-acrlamida	0.8 g
Llevar a 100 ml con agua destilada	
Filtrar y almacenar a 4 C en oscuridad	

Persulfato de amonio 10 %

Persulfato de amonio	0.1 g
Agua destilada	1.0 ml

SDS 10%

SDS	10 g
Agua destilada	100 ml

Solución amortiguadora de corrida (Electroforésis) stock

Tris-base	9.0 g
Glicina	43.2 g
SDS	3.0 g

Diluir en 600 ml de agua destilada, almacenar a 4° C, calentar a 37°

C antes de usar si ocurre precipitación.

Diluir 60 ml de este stock con 240 ml de agua destilada para hacer una electroforésis.

Solución digestora

Agua destilada	4.0 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.0 ml
Glicerol	0.8 ml
SDS 10 %	1.6 ml
2-β-mercaptoetanol	0.4 ml
Azul de bromofenol 0.05%	0.2 ml

Diluir la muestra al menos 1:4 con la solución digestora y calentar a 95° C por 4 minutos.

Stock de Azul de Coomassie (R-250) 1%

Azul de Coomassie (R-250)	2.0 g
Agua destilada	200 ml
Agitar y filtrar	

Solución teñidora

Solución stock Azul de Coomassie (R-250) 1%	62.5 ml
Metanol	250 ml
Ácido acético	50 ml
Aforar a 500 ml con agua destilada	

Solución desteñidora I

Metanol	125 ml
Ac. acético	25 ml
Aforar con agua destilada a 250 ml.	

Solución desteñidora II

Metanol	12.5 ml
Ac. acético	17.5 ml
Aforar a 250 ml con agua destilada.	

Amortiguador Salina-Tris 20 mM Tris-NaCl (TBS) pH 7.5

Tris-base	4.84 g
NaCl	58.48 g

Aforar a 2 l con agua destilada, ajustar a pH 7.5 con HCl 1N.

Solución bloqueadora (Leche descremada en polvo 5% en TBS)

Leche descremada en polvo	1.25 g
TBS	25 ml

Solución amortiguadora de corrida (Transferencia)

Tris-base	3.0 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 ml

Disolver con agua destilada, ajustar a pH 8.3

Aforar a 1 litro con agua destilada.

Solución reveladora

TBS	50 ml
Peróxido de hidrógeno	0.05 ml
Metanol	10 ml
4-cloro1-naftol	30 mg

Solución de Amido Negro

Negro de Amido	100 mg
Metanol	44.0 ml
Ac. acético glacial	1.0 ml
Agua destilada	45.0 ml