



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**IZTACALA**

---

---

**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS  
SECRETADAS POR *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*  
AISLADA DE POLLO”**

**T E S I S**

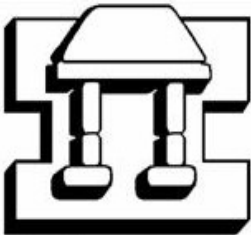
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**ELIZABETH GARCÍA GÓMEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL**



**IZTACALA** LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX.

**2004**



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.

**Proyecto financiado por:**

**PAPIIT/IN219203-3**

**PAPCA-UNAM**

*Las verdades que revela la ciencia,  
superan siempre a los sueños que destruye*  
**Joseph Ernest Renan**

**DEDICADA A:**

Mis padres María Elena y Gerardo y a mi hermana Ruth, por su amor, comprensión, confianza y apoyo incondicionales, por que sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí.

Toda mi familia, por su cariño y apoyo durante todo este tiempo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Erasmo Negrete, por su asesoría, orientación, paciencia, y todo lo que aprendí durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Sergio Vaca, por sus valiosos consejos y observaciones, confianza y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A mis revisores: Dr. Diego Arenas, M. en C. Gloria Paniagua y M. en C. Josefina Vázquez, por sus comentarios, que contribuyeron a enriquecer este trabajo.

Al Dr. Salvador Rodríguez, por ser un excelente profesor, y sobre todo por la oportunidad que me brindó para adquirir nuevos conocimientos y reforzar los que ya existían.

A todos mis profesores de la carrera, que contribuyeron a mi formación como bióloga y como persona, especialmente aquellos que siempre confiaron en mí.

A mis amigas Astrid, Rosa, Luz y Amelia, por ser una parte importante de mi vida.

A Andy, por ser mi mejor amigo durante todo este tiempo.

A Edna, Karina y Lucila, por su amistad durante toda la carrera, y por todos los momentos que compartimos.

A Magali, Gaby, Angélica y Ara, por brindarme su amistad y estar conmigo durante la etapa más importante de mi carrera.

A Luis, por tu amistad, por todos los buenos momentos que pasé contigo y por sacarme de quicio de vez en cuando.

A mis compañeros del laboratorio de genética: Favy, Ángel, Marce, Augusto, Gaby, Paulo, Lolita y Ricardo, por su ayuda, amistad y todos los buenos momentos que pase con ustedes.

A mis compañeros del laboratorio de microbiología: Tere, Ernes, Güicho y Abraham, por su amistad y ayuda, y por aguantarme durante tanto tiempo.

A todos mis compañeros de carrera, que de alguna forma también contribuyeron a hacer más fácil el camino hasta aquí.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 <i>Gallibacterium anatis</i></b>	<b>4</b>
<b>2.1.1. Descripción del microorganismo</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2 Aislamientos de <i>G. anatis</i> (<i>Pasteurella haemolytica</i>) a partir de aves domésticas</b>	<b>6</b>
<b>2.2 <i>Mannheimia haemolytica</i> (<i>P. haemolytica</i>)</b>	<b>9</b>
<b>2.2.1 Principales factores de virulencia de <i>M. haemolytica</i></b>	<b>10</b>
<b>2.2.2 Proteasas de <i>M. haemolytica</i></b>	<b>11</b>
<b>3. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1 Exopeptidasas</b>	<b>15</b>
<b>3.1.1 Aminopeptidasas</b>	<b>15</b>
<b>3.1.2 Carboxipeptidasas</b>	<b>15</b>



<b>3.2 Endopeptidasas</b>	<b>16</b>
<b>3.2.1 Serín- proteasas</b>	<b>16</b>
<b>3.2.2 Aspártico-proteasas</b>	<b>16</b>
<b>3.2.3 Metaloproteasas</b>	<b>17</b>
<b>3.2.4 Cisteín-proteasas</b>	<b>18</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>20</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>5.1 Objetivo general</b>	<b>21</b>
<b>5.2 Objetivos particulares</b>	<b>21</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
<b>6.1 Cepas bacterianas</b>	<b>22</b>
<b>6.2 Cultivo</b>	<b>22</b>
<b>6.3 Concentración de proteínas del sobrenadante</b>	<b>22</b>
<b>6.4 Actividad proteolítica</b>	<b>23</b>
<b>6.5 pH óptimo</b>	<b>23</b>
<b>6.6 Estabilidad al calor</b>	<b>24</b>
<b>6.7 Tipo de proteasa</b>	<b>24</b>
<b>6.8 Degradación de IgG de pollo</b>	<b>24</b>
<b>6.9 Western Blot (inmunorreconocimiento)</b>	<b>25</b>

<b>7. RESULTADOS</b>	<b>26</b>
7.1 Pureza de los cultivos	26
7.2 Concentración de proteínas	26
7.3 Actividad proteolítica	26
7.4 pH óptimo	27
7.5 Estabilidad al calor	28
7.6 Tipo de proteasa	29
7.7 Degradación de IgG de pollo	29
7.8 Inmunorreconocimiento	30
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>36</b>
<b>APÉNDICE I</b>	<b>37</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>40</b>

## RESUMEN

Las bacterias del género *Gallibacterium* son encontradas en el tracto respiratorio superior y en la parte baja del tracto genital en aves sanas, pero también han sido asociadas con condiciones patológicas como salpingitis, ooforitis, peritonitis, pericarditis, hepatitis, enteritis, septicemia y lesiones en tracto respiratorio superior en pollos. *Gallibacterium anatis* (anteriormente denominada *Pasteurella haemolytica-like*) es responsable de cuantiosas pérdidas económicas en parvadas de postura, predispone a infecciones virales y/o bacterianas e incrementa los costos de producción. De esta bacteria no se han descrito las características de patogenicidad así como tampoco se han caracterizado y/o descrito las proteasas secretadas por ella en pollos. En este trabajo se identificaron y caracterizaron las proteasas de dos cepas de *G. anatis* bv. *haemolytica* aisladas de pollo (2491-01 y 2509-00) utilizando geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) copolimerizados con sustrato (caseína 1% y gelatina 0.1%). Ambas cepas se cultivaron en caldo BHI (infusión cerebro-corazón), se empleó etanol para precipitar las proteínas de los sobrenadantes de cultivos libres de células. Las proteínas obtenidas de ambas cepas presentaron actividad proteolítica con peso molecular >200 kDa sobre los dos sustratos utilizados, aunque fue más evidente sobre caseína. Actividades proteolíticas de características similares a las de las cepas de campo también se observaron en cepas de referencia: *G. anatis*, *G. genomoespecie 1*, *G. genomoespecie 2* y *G. genomoespecie 3*. La actividad proteolítica de las dos cepas es evidente en el intervalo de pH de 3-10, siendo más intensa para la cepa 2491-01 en un rango de pH de 7 a 9 y para las proteasas de la cepa 2509-00 en pH 9. La actividad de ambas cepas se mantuvo estable hasta los 50°C, comenzó a disminuir a los 60°C y fue inhibida totalmente a los 70 y 80°C. Las proteasas de la cepa 2491-00 fueron inhibidas totalmente con EDTA 20 mM, mientras que la actividad de las proteasas de la cepa 2509-00 requirió de una concentración de 40 mM EDTA para ser inhibida totalmente, lo que sugiere la presencia de metaloproteasas en esta bacteria. Estas proteasas también fueron capaces de degradar IgG de pollo. Por Western Blot se observó una reactividad cruzada intensa entre las proteasas de las dos cepas de *G. anatis* empleadas con el anticuerpo dirigido contra la proteasa de *A. pleuropneumoniae*, lo que indica la presencia de epítomos inmunogénicos comunes entre las proteasas de las dos especies. Las proteasas secretadas por *Gallibacterium anatis* podrían participar en la colonización de los tejidos y evasión de la respuesta inmune del hospedero.

# 1. INTRODUCCIÓN

*Gallibacterium* constituye un nuevo género de la familia *Pasteurellaceae*, los miembros de esta familia causan enfermedades con importancia económica en una gran variedad de hospederos, incluyendo al hombre y animales domésticos (Jacques y Mikael, 2002; Christensen *et al.*, 2003).

*Gallibacterium* tiene un amplio espectro de hospederos, se ha aislado tanto de aves domésticas como de aves silvestres incluyendo pollos, pavos, gansos, patos, palomas, faisanes, y perdices. A pesar de su naturaleza cosmopolita estudios previos indican que los pollos son su hospedero preferido (Christensen *et al.*, 2003; Bojesen *et al.*, 2003<sup>a</sup>).

Esta bacteria forma parte de la flora normal del tracto respiratorio superior y parte baja del tracto genital en pollos, pero también está asociada con diferentes condiciones patológicas, incluyendo salpingitis, peritonitis, ooforitis, pericarditis, hepatitis, enteritis, septicemia y lesiones en el tracto respiratorio de gallinas de postura (Christensen *et al.*, 2003). Las lesiones inducidas por *Gallibacterium* se han reportado como no patognomónicas, debido a que no se presentan los síntomas característicos de una enfermedad determinada con los cuales pueda hacerse un diagnóstico adecuado, su detección e identificación dependen de los procedimientos clásicos (Bojesen *et al.*, 2003<sup>b</sup>).

*G. anatis* (anteriormente denominada *Pasteurella haemolytica-like*) es responsable de cuantiosas pérdidas económicas en parvadas de postura, predispone a infecciones virales y/o bacterianas e incrementa los costos de producción (Casaubon *et al.*, 2004).

Es evidente que esta bacteria es capaz de causar infecciones serias que afectan a distintos hospederos, pero sus mecanismos de patogénesis siguen sin comprenderse (Bojesen *et al.*, 2003<sup>b</sup>).

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en distintos aspectos del ciclo de vida bacteriano (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

El papel que las proteasas desempeñan en la virulencia ha sido demostrado en diferentes especies patógenas, algunas bacterias patógenas que colonizan superficies mucosas producen enzimas extracelulares que degradan moléculas del sistema inmune así como algunos de los componentes principales de los tejidos, promoviendo la invasión y la colonización del hospedero, (Maeda, 1996; Negrete-Abascal *et al.* 1998).

De *G. anatis* no se han descrito las características de patogenicidad ni se han caracterizado y/o descrito las proteasas secretadas por ella en pollos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *G. anatis* (*Pasteurella haemolytica*)

#### 2.1.1 Descripción del microorganismo

Anteriormente la familia *Pasteurellaceae* estuvo constituida solo por tres géneros: *Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella*, pero recientemente los géneros *Mannheimia* y *Gallibacterium* fueron agregados a la lista (Angen *et al.*, 1999; Jacques y Mikael, 2002; Christensen *et al.*, 2003).

Las bacterias clasificadas como *A. salpingiditis*, *P. haemolytica*-like aviar y *P. anatis* se reclasificaron y reubicaron en el nuevo género *Gallibacterium*, el cual incluye a las especies *G. anatis* (biovariedades haemolytica y anatis) y *G. genomoespecies* 1 y 2. *G. anatis* puede diferenciarse de otras especies de *Gallibacterium* por caracterización fenotípica, mientras que *G. genomoespecies* 1 y 2 solo pueden identificarse por métodos genotípicos debido a la heterogeneidad fenotípica que caracteriza a estos organismos (Christensen *et al.*, 2003).

Las bacterias del género *Gallibacterium* son Gram negativas, no móviles, en forma de bacilo o pleomórficas, se encuentran aisladas o en pares; las colonias sobre agar sangre presentan  $\beta$ -hemólisis (fig. 1), son grisáceas, no transparentes, pero eventualmente son translúcidas en su periferia, con una consistencia butirosa, elevadas, lisas, brillantes, circulares, con margen entero y con diámetro de 1 a 2 mm después de 24-48 horas de incubación a 37°C; no forman endoesporas; su crecimiento es mesofílico y anaeróbico facultativo o microaerofílico; no requieren NAD (factor V) para su crecimiento (Christensen *et al.*, 2003).

Son positivas a las pruebas de catalasa, oxidasa, fosfatasa, ONPG (ortonitrofenil- $\beta$ -galactósido o  $\beta$ -galactosidasa) y PNPG (paranitrofenil- $\beta$ -galactosido), reducen los nitratos. Forman ácido sin producción de gas a partir del glicerol, (-)D-ribosa, (+)D-

xilosa, (-)D-manitol, (-)D-fructosa, (+)D-galactosa, (+)D-glucosa, (+)D-manosa, sacarosa y rafinosa.

Son negativas para las pruebas de crecimiento simbiótico, citrato de Simmons, mucato, malonato, H<sub>2</sub>S/hierro triple azúcar (TSI), crecimiento en presencia de KCN, Voges-Proskauer a 37°C y ureasa. No producen pigmentos. Se observan variaciones en la reacción del rojo de metilo a 37°C, crecimiento en agar MacConkey y en la producción de ácido a partir de (+)L-arabinosa, (-)D-arabinosa, *m*-inositol, (-)D-sorbitol, (-)L-fucosa, lactosa, maltosa, trehalosa y dextrina. La especie tipo es *G. anatis* (Christensen *et al.*, 2003).

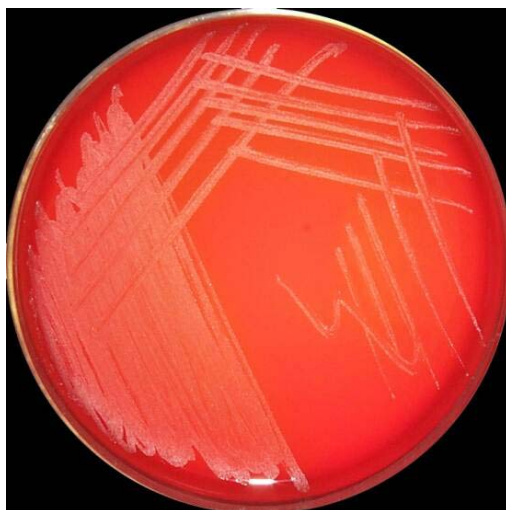


Figura 1. Crecimiento de *G. anatis* en agar sangre.

*G. anatis* está constituida por dos biovariedades, la biovariedad haemolytica, la cual produce hemólisis, es positiva para (-)D-arabinosa y (-)L-fucosa; y la biovariedad anatis, la cual no es hemolítica, es positiva para trehalosa y negativa para (-)D-arabinosa, (-)L-fucosa, maltosa y dextrina (Christensen *et al.*, 2003).

Las características fenotípicas más importantes para diferenciar a las especies del género *Gallibacterium* se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Características fenotípicas para diferenciar las especies del género *Gallibacterium* (Christensen *et al.*, 2003).

Característica	<i>G. anatis</i> bv. <i>haemolytica</i>	<i>G. anatis</i> bv. <i>anatis</i>	<i>Gallibacterium</i> genomoespecie 1	<i>Gallibacterium</i> genomoespecie 2
Hemólisis	+	-	+	+
Producción de ácido a partir de:				
(-)D-arabinosa	(+)	-	(+)	d
(+)L-arabinosa	-	-	d	d
<i>m</i> -inositol	d	d	-	d
(-)D-sorbitol	d	d	-	-
(-)L-fucosa	(+)	-	+/(+)	d
Maltosa	d	-	+	+
Trehalosa	d	+	+	d
Dextrina	d	-	+/(+)	+

Las características reportadas son: + =90% de las cepas son positivas dentro 1-2 días; (+) =90% de las cepas son positivas dentro de 3-14 días; -, <10% de las cepas son positivas dentro de 14 días; d, 11-89% de las cepas son positivas.

### 2.1.2 Aislamientos de *G. anatis* (*P. haemolytica*) a partir de aves domésticas.

En 1962 (Harbourne) se reportó el aislamiento de *P. haemolytica* en cuatro ocasiones del hígado de pollos jóvenes y pavos en Inglaterra. En el mismo año, Greenham y Hill reportaron el aislamiento de *P. haemolytica* del cadáver de una gallina con lesiones en hígado y en la pared intestinal. También en 1962, Harry reportó que *P. haemolytica* puede ser aislada del tracto respiratorio de aves adultas sanas.

Hacking y Pettit (1974) aislaron a *P. haemolytica* de hígado y/ o sangre de pollos o gallinas de postura en ocho ocasiones; cinco casos involucraron decremento o anomalía en la producción de huevo, con una o más aves en cada caso mostrando peritonitis o salpigitis leves a severas; un caso involucró enteritis, otro caso una combinación de hepatitis y enteritis, y otro un problema respiratorio; en la mayoría de estos casos el microorganismo pareció ser un patógeno secundario, sin embargo, no se encontraron otros patógenos.



Bisgaard en 1977, observó la presencia de bacterias Gram negativas en pollos con síntomas respiratorios causados por bronquitis infecciosa, a pesar de que la flora de la tráquea de pollos sanos consiste principalmente en microorganismos Gram positivos. Entre los organismos presentes se encontró a *P. haemolytica* con una incidencia elevada, ninguna de las cepas aisladas correspondió a los biotipos descritos A y T; no existieron diferencias relacionadas con la presencia de dicho microorganismo en la tráquea de pollos con y sin síntomas respiratorios, además esta incidencia se incrementó con respecto a la edad, por lo que concluyó que esta bacteria constituye parte de la flora normal de la tráquea de pollos después de cierta edad en ciertos ambientes, y que su invasión aparentemente sólo ocurría en casos de debilidad general extrema.

En 1978 Mwangota *et al.* aislaron cepas de *P. haemolytica* de pulmones de bovinos, ovejas, cabras y pollos enfermos y de las vías nasales de bovinos, ovejas, cabras y ñus aparentemente sanos; el biotipo T de *P. haemolytica* fue aislado comúnmente de los animales enfermos, en cambio, el biotipo A fue aislado frecuentemente de las vías nasales de animales sanos. Sólo fueron recuperadas cepas del biotipo A en ganado bovino, y la mayoría fueron serotipos 1 y 2, aunque también se aislaron los serotipos 4 y 11. A diferencia de los bovinos, en pollos se encontraron ambos biotipos (A y T) en condiciones patológicas.

Mushin *et al.*, en 1980, encontraron *P. haemolytica* con una incidencia del 97% en pollos sanos, en contraste con una baja incidencia (3%) o ausencia de la flora de la tráquea de pavos y patos sanos, este organismo fue no frecuente o estuvo ausente en especímenes de la tráquea de aves silvestres; en una colección de cepas de *P. haemolytica* aisladas de casos de enfermedades respiratorias de aves domésticas, el número de aislamientos en pollos fue significativamente elevado (87%), en comparación con aquellas cepas aisladas de pavos (9%) y patos (4%), por lo anterior se determinó que *P. haemolytica* es un miembro de la flora normal del tracto respiratorio de pollos, pero no de pavos o patos, sin embargo, bajo condiciones de estrés, esta bacteria puede ser oportunista, participando en procesos patológicos.

Addo y Mohan en 1985 reportaron el aislamiento de cepas de *P. haemolytica* no fermentadoras de maltosa a partir de nódulos necróticos de hígado y de sangre periférica de aves domésticas (*Gallus domestica*). Estas cepas no se comportaron como los dos biotipos conocidos de *P. haemolytica*, ya que utilizaron la trehalosa y produjeron H<sub>2</sub>S (características del biotipo T) y produjeron ácido a partir de xilosa pero no de salicina (características del biotipo A), lo que sugiere la presencia de otros biotipos en aves.

Shaw *et al.*, 1990 aislaron *P. haemolytica* de diferentes órganos de gallinas de parvadas en donde se observó un aumento en la mortalidad, en todos los casos se presentó inflamación de la tráquea. Se identificó el virus de laringotraqueítis infecciosa y se consideró a *P. haemolytica* como un invasor de importancia secundaria.

En 1993, Lin *et al.* aislaron 15 bacterias hemolíticas Gram negativas del tracto respiratorio de pollos que sufrieron un síndrome respiratorio prolongado, entre las cuales se encontró a *P. haemolytica*.

Recientemente, en el año 2003 se logró la identificación de *G. anatis* bv. *haemolytica* en 138 aislamientos a partir de explotaciones avícolas de los estados de Sonora, Sinaloa, Nuevo León, Jalisco, Querétaro, Veracruz, Estado de México, Puebla y Yucatán, y se estableció que el 80% de los aislamientos pertenecía al biogrupo 4, el 9% al biogrupo 1, el 7% al biogrupo 2, el 3% al biogrupo U y el 1% al biogrupo 7 (Casaubon *et al.*, 2004).

*Gallibacterium* spp. presenta las características típicas de un patógeno oportunista, debido a que depende de factores de predisposición como coinfecciones de virus, bacterias o parásitos, estrés o desbalances hormonales para producir una enfermedad (Bojesen *et al.*, 2003<sup>b</sup>).

El potencial patógeno de este microorganismo también ha sido demostrado a través de experimentos de desafío (Bojesen *et al.*, 2004; Campogarrido *et al.*, 2004; Casaubon *et al.*, 2004).

## **2.2 *Mannheimia haemolytica* (*P. haemolytica*).**

*Pasteurella haemolytica* aislada de rumiantes, cerdos, conejos y liebres recientemente fue denominada como *M. haemolytica* (Angen *et al.*, 1999).

*M. haemolytica* es el principal patógeno causante del complejo respiratorio bovino o pasteurelosis neumónica en rumiantes, esta enfermedad provoca pérdidas económicas importantes para la industria ganadera y se caracteriza por la infiltración extensiva de los neutrófilos y la exudación de fibrina en las vías aéreas y alvéolos; los neutrófilos movilizados, en lugar de eliminar la infección bacteriana agravan el daño pulmonar, probablemente por sufrir degranulación y lisis, resultando en la liberación de mediadores inflamatorios, superóxidos y enzimas proteolíticas (Veit *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999).

En *M. haemolytica* se han descrito 2 biotipos: A y T (en base a la fermentación de arabinosa y trehalosa, respectivamente) y 16 serotipos: 12 capsulares (A1, A2, A5-A9, A12-A14, A16 y A17, basados en antígenos capsulares) y 4 somáticos (basados en antígenos de pared) (Velasco y Yamasaki, 2001; Highlander, 2001). El biotipo A serotipo 1 predomina entre los microorganismos aislados de los pulmones de ganado bovino con neumonía o pasteurelosis neumónica (Abdullah *et al.*, 1991).

## **2.2.1 Principales factores de virulencia de *M. haemolytica*.**

### **Leucotoxinas**

Las leucotoxinas son un grupo de exotoxinas pertenecientes a la familia de toxinas RTX (repeats in toxin), forman poros transmembranales y poseen actividad citotóxica sobre los leucocitos, principalmente sobre los leucocitos polimorfonucleares, aunque también pueden ser citotóxicas para los eritrocitos y otras células epiteliales. Se consideran de los principales factores de virulencia en las infecciones en rumiantes (Madigan, 1998; Lo, 2001; Castañeda, 2002; Narayanan *et al.*, 2002).

### **Lipopolisacárido (LPS)**

Posee actividad endotóxica, con una alta capacidad de inducir una respuesta inflamatoria y se ha sugerido que tiene una fuerte asociación con la leucotoxina, (Highlander, 2001; Lo, 2001; Castañeda 2002).

### **Neuraminidasa**

Es una enzima que rompe el ácido siálico de la membrana citoplasmática de las células del hospedero, destruyendo los enlaces glicosídicos de las glicoproteínas y glicolípidos del tejido conjuntivo de los animales. Facilita la adherencia de las bacterias a la mucosa respiratoria (Madigan, 1998; Highlander 2001; Lo, 2001; Castañeda 2002).

### **Glicoproteasa**

Degrada las glicoproteínas de los macrófagos y otros leucocitos, favorece la invasión de tejidos al incrementar la adherencia (Abdullah, 2001; Lo, 2001; Castañeda, 2002).

### **Proteasas de IgA**

Incrementan la colonización bacteriana de las mucosas por la eliminación local de anticuerpos (Lee y Shewen, 1996; Castañeda, 2002).

Otros factores de virulencia importantes para *M. haemolytica* son: polisacáridos capsulares (CPS), adhesinas, fimbrias, proteínas de membrana externa [OMPs],

proteínas reguladas por hierro, antígenos aglutinantes específicos para cada serotipo, una citotoxina termolábil específica para leucocitos de rumiantes, superóxido dismutasa, y una proteína de choque térmico de 54 kDa (Frank y Briggs, 1992; Abdullah *et al.*, 1991; Lo, 2001).

### **2.2.2 Proteasas de *M. haemolytica*.**

Otulakowski *et al.*, en 1983, detectaron en los sobrenadantes citotóxicos de los cultivos de 9 serotipos de *M. haemolytica* la actividad de una enzima proteolítica que degradó sialoglicopéptidos de eritrocitos humanos. Estudios preliminares con la enzima cruda mostraron que presentó un pH óptimo alrededor de 7 y que su actividad no fue afectada por inhibidores de tripsin, quimotripsin, termolisin, tio o serin-enzimas; sin embargo, fue inhibida con *o*-fenantrolina a una concentración elevada, además la enzima hidrolizó glicoforina a una tasa cuatro veces mayor que la tasa para la degradación de caseína. Por lo anterior se especuló que la enzima era una proteasa neutra, probablemente metal-dependiente, con especificidad por sialoglicopéptidos.

Particularmente, en *M. haemolytica* A1 aislada de bovinos, se ha demostrado la presencia de una glicoproteasa (también denominada como endopeptidasa de O-sialoglicoproteínas) que es altamente específica para glicoproteínas O- glicosiladas; esta glicoproteasa es una metaloproteasa neutra. La glicoproteasa purificada de los sobrenadantes del cultivo de *P. haemolytica* A1 degradó glicoforina A de eritrocitos humanos, la cual es O-glicosilada, pero no degradó proteínas N-glicosiladas o proteínas no glicosiladas. Esta glicoproteasa es óptimamente activa en un pH de 7.4 y es estable en un rango de pH de 4.5 a 8 y fue inhibida por EDTA, citrato y ascorbato, dicha inhibición pareció deberse al secuestro de los iones metálicos de la glicoproteasa (Abdullah *et al.*, 1991 y 1992).

En 1991, Abdullah *et al.* clonaron el gen que codifica la glicoproteasa de *M. haemolytica* (denominado *gcp*) y determinaron su secuencia de nucleótidos. El gen *gcp* codifica para

una proteína de 35.2 kDa con un punto isoelectrico de 5.1. Esta glicoproteasa presentó una secuencia de aminoácidos que indicó un sitio de unión para zinc.

Tabatabai en 1995, utilizó la fetuina (una glicoproteína soluble de bovino) como un sustrato alternativo para identificar la actividad de la O-sialoglicoproteasa en las fracciones proteicas del sobrenadante del cultivo de *M. haemolytica* y encontró actividad de una proteína de 64 kDa, además, observó que al agregar  $Zn^{+}$  a la enzima, ésta aumentó su actividad proteolítica sobre la fetuina.

La glicoproteasa secretada por *M. haemolytica* también puede degradar epitectina, glicoproteína expresada sobre la superficie de células de carcinoma laríngeo de humanos. Otros sustratos para esta glicoproteasa incluyen la caseína K de leche de bovino, la interleucina y los ligandos para P- y L-selectinas (Hu *et al.*, 1994; Mellors y Lo, 1995).

También se ha demostrado la capacidad de la metaloproteasa de *M. haemolytica* para degradar las O-sialoglicoproteínas CD34, CD43, CD44 y CD45 de la superficie de leucocitos humanos. Estas estructuras, algunas de las cuales están involucradas en la recepción y transmisión de señales de fuentes externas, desempeñan papeles importantes en el destino y desarrollo de las células (Sutherland *et al.*, 1992).

En 1996, Cladman *et al.*, también encontraron en los sobrenadantes del cultivo de *M. haemolytica* A1 una endopeptidasa de O-sialoglicoproteína que degradó la glicoforina A de eritrocitos humanos, esta enzima fue inhibida por concentraciones micromolares de  $Zn^{+}$ ; sin embargo la fetuina no fue degradada por los sobrenadantes del cultivo de *M. haemolytica* A1, por la endopeptidasa de O-sialoglicoproteínas o por neuraminidasa. Esto podría indicar la presencia de más de una glicoproteasa secretada por *M. haemolytica*.

La actividad de la sialoglicoproteasa también se ha demostrado en los serotipos: A13, A14 y A16, de *M. haemolytica* lo cual confirma que todos los biotipos A son positivos

para el gen *gcp* y para la actividad de glicoproteasa, excepto el serotipo A11, ya que este presenta una organización genética diferente y no presenta actividad proteolítica, mientras que todos los biotipos T son negativos tanto para el gen como para la actividad de la proteasa (Lee *et al.*, 1994).

Watt *et al.* (1997) determinaron que el producto del gen *gcp* de *M. haemolytica* es el componente exclusivo de la actividad de la glicoproteasa, y demostraron la presencia de homólogos de esta glicoproteasa en algunas bacterias Gram negativas, incluyendo *Escherichia coli*, sin embargo, la secreción de glicoproteasa está restringida a los serotipos del biotipo A de *M. haemolytica*.

La O-sialoglicoproteasa y la leucotoxina secretadas por *M. haemolytica* A1 participan en la activación de plaquetas, las dos proteínas pueden interactuar directamente con las plaquetas de bovino iniciando la agregación plaquetaria y la formación de fibrina en el tejido alveolar durante la pasteurelisis neumónica. En presencia de calcio, la glicoproteasa produce un incremento de la adhesión plaquetaria dependiente de la dosis (Nyarko *et al.*, 1998).

Además, se ha puesto en evidencia la presencia de proteasas que degradan IgG1 en el sobrenadante del cultivo parcialmente purificado de *M. haemolytica*, observándose una hidrólisis parcial de la IgG2 de bovino, pero no de IgA o IgM de bovino. La producción de una proteasa específica para IgG1 puede ser un mecanismo de virulencia que contribuye a la patogénesis de la pasteurelisis neumónica en ganado bovino (Lee y Shewen, 1996). Sin embargo, las características de estas enzimas no han sido descritas.

### 3. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS

Las proteasas son enzimas degradativas que catalizan la hidrólisis total o parcial de las proteínas, rompen enlaces peptídicos y degradan las proteínas a péptidos (Rao, *et al.*, 1998; Häse y Finkelstein, 1993).

Las proteasas llevan a cabo modificaciones altamente específicas y selectivas de las proteínas, tales como la activación de las formas zimogénicas de las enzimas, la coagulación sanguínea y la lisis de los coágulos de fibrina, y el procesamiento y transporte de proteínas secretorias a través de las membranas (Rao, *et al.*, 1998).

Ejecutan una gran variedad de funciones, desde el nivel celular hasta el nivel de órganos y organismos, para producir los sistemas de cascada, como los de la hemostasis y la inflamación. Son responsables de los complejos procesos involucrados tanto en la fisiología normal de la célula como en las condiciones patológicas anormales (Rao, *et al.*, 1998).

Ya que las proteasas son fisiológicamente necesarias para los organismos, son ubicuas, siendo encontradas en una amplia diversidad de fuentes como plantas, animales y microorganismos (Rao, *et al.*, 1998; Häse y Finkelstein, 1993).

El sitio catalítico de las proteasas está flanqueado en uno o en ambos lados por subsitios específicos, cada uno es capaz de acomodarse con un residuo aminoácido simple del sustrato (Rao, *et al.*, 1998) (fig. 2).

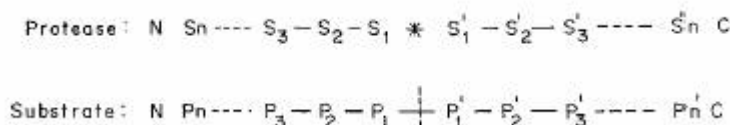


Figura 2. Sitios activos de las proteasas. El sitio catalítico de las proteasas esta indicado por \* y el enlace roto por  $\text{---}$ ;  $S_1$  hasta  $S_n$  y  $S'_1$  hasta  $S'_n$  son los subsitios específicos de la enzima, mientras que  $P_1$  hasta  $P_n$  y  $P'_1$  hasta  $P'_n$  son los residuos del sustrato acomodados por los subsitios de la enzima.



Comúnmente, las proteasas se clasifican de acuerdo a tres criterios: tipo de reacción catalizada, naturaleza química del sitio catalítico y relaciones evolutivas relacionadas con su estructura (Rao *et al.*, 1998).

Las proteasas se dividen ampliamente en dos grandes grupos, exopeptidasas y endopeptidasas, dependiendo de su sitio de acción. Las exopeptidasas rompen el enlace peptídico proximal al extremo terminal amino o carboxi del sustrato, mientras que las endopeptidasas rompen enlaces peptídicos distantes a la parte terminal del sustrato (Barett, 1994).

En base al grupo funcional presente en el sitio activo, las proteasas se clasifican en cuatro grupos: serín-proteasas, aspártico-proteasas, cisteín-proteasas y metaloproteasas. De acuerdo al pH óptimo de actividad se clasifican como proteasas ácidas, neutras o alcalinas (Rao *et al.*, 1998).

### **3.1 Exopeptidasas**

Las exopeptidasas actúan solamente cerca de los extremos de las cadenas de polipéptidos. En base a su sitio de acción en el extremo terminal N o C, se subdividen en amino o carboxipeptidasas (Barett, 1994).

#### **3.1.1 Aminopeptidasas**

Las aminopeptidasas actúan en el extremo N terminal libre de la cadena polipeptídica y liberan un residuo aminoácido simple, un dipéptido o un tripéptido. En general son enzimas intracelulares (Rao *et al.*, 1998).

#### **3.1.2 Carboxipeptidasas**

Actúan en los extremos C terminales de la cadena polipeptídica y liberan un aminoácido simple o un dipéptido. Pueden dividirse en tres grupos de acuerdo a la naturaleza de los residuos aminoácidos en el sitio activo de las enzimas: serin-carboxipeptidasas, metalocarboxipeptidasas, y cisteín-carboxipeptidasas (Rao *et al.*, 1998).

## **3.2 Endopeptidasas**

Las endopeptidasas se caracterizan por su acción preferente sobre los enlaces peptídicos en las regiones internas de la cadena polipeptídica, distantes de los extremos N y C terminales. Las endopeptidasas se dividen en cuatro subgrupos dependiendo de su mecanismo catalítico: serín-proteasas, aspártico-proteasas, cisteín-proteasas y metaloproteasas (Barett, 1994).

### **3.2.1 Serín- proteasas**

Las serín-proteasas se caracterizan por la presencia de un grupo serín en su sitio activo, estas proteasas son vitales para los seres vivos. Las serín proteasas son reconocidas por su inhibición irreversible por 3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI), L-3-carboxitrans 2,3-epoxipropil-leucilamido (4-guanidina) butano, diisopropilfluorofosfato (DFP), fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) y tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK). Son generalmente activas a pH alcalino y neutro, con un rango óptimo de pH entre 7 y 11. Su masa molecular presenta un rango entre 18 y 35 kDa. Sus puntos isoeléctricos están generalmente entre pH 4 y 6. Las serín-proteasas usualmente siguen una reacción de dos pasos para realizar la hidrólisis del sustrato, en el cual se forma un intermediario enzima-péptido unido covalentemente, con la pérdida de un aminoácido o un péptido; este paso de acilación es seguido por un proceso de deacilación, este último ocurre por medio de un ataque nucleofílico por medio de agua sobre el intermediario, resultando en la hidrólisis del péptido (Barett, 1994; Rao *et al.*, 1998).

### **3.2.2 Aspártico-proteasas**

Las aspártico-proteasas son endopeptidasas que dependen de residuos de ácido aspártico para llevar a cabo su actividad catalítica. La mayoría de las aspártico-proteasas muestran su actividad máxima a pH bajo (3 a 4) y tienen puntos isoeléctricos en el rango de 3 a 4.5. Sus masas moleculares están en el rango de 30 a 45 kDa. Son inhibidas por pepstatina, también son sensibles a los compuestos de diazocetona como el diazoacetil-DL-norleucin metil éster (DAN) y 1,2-epoxi-3-(*p*-nitrofenoxi)propano (EPNP) en la presencia de iones de cobre. Su catálisis no involucra un intermediario covalente, el ataque nucleofílico se realiza por dos transferencias simultáneas de

protones: la primera a partir de una molécula de agua en los dos grupos carboxilo y la segunda en el oxígeno del grupo carbonilo del sustrato con la ruptura del enlace CO-NH, esta catálisis ácido-base conduce a la formación de un intermediario tetraédrico no covalente neutro (Barett, 1995; Rao *et al.*, 1998) (fig. 3).

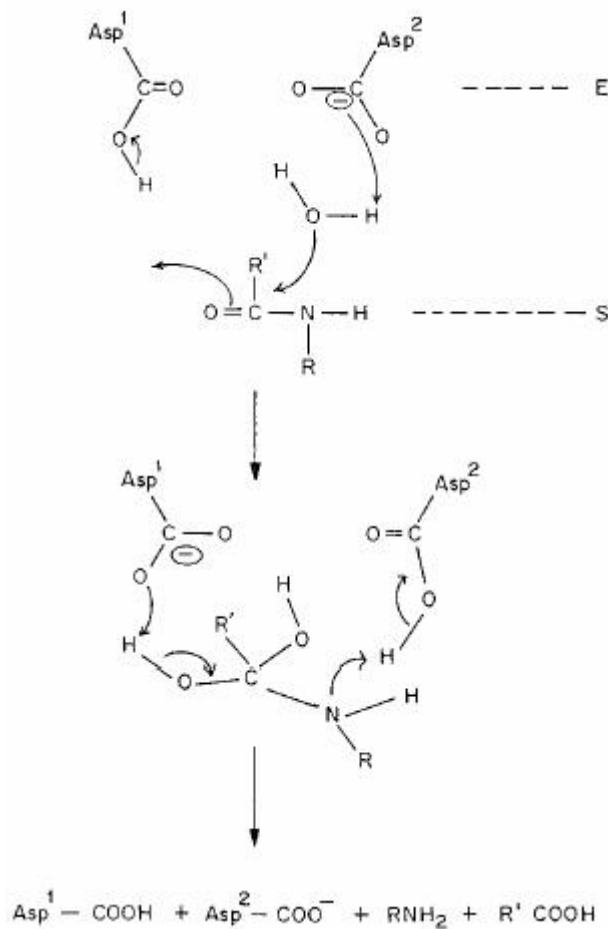


Figura 3. Mecanismo de acción de las aspártico-proteasas.

### 3.2.3 Metaloproteasas

Las metaloproteasas son las proteasas más diversas. Se caracterizan por requerir un ión metálico divalente para su actividad, la mayoría contiene un átomo de zinc. El zinc es un componente integral de muchas proteínas involucradas virtualmente en todos los aspectos del metabolismo de diferentes especies de todos los phyla. Las metaloproteasas neutras muestran especificidad por los aminoácidos hidrofóbicos,

mientras que las metaloproteasas alcalinas poseen una especificidad más amplia. Son inhibidas por agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) pero no por agentes sulfhídricos como DFP. Se ha propuesto que el ácido glutámico interviene en el ataque nucleofílico de una molécula de agua sobre el grupo carbonilo del enlace peptídico, el cual es polarizado por el ión zinc. El mecanismo catalítico conduce a la formación de un intermediario tetraédrico no covalente después del ataque que es llevado a cabo por una molécula de agua que se une al ión metálico sobre el grupo carbonilo del enlace móvil, posteriormente, este intermediario tetrahédrico dona un protón del ácido glutámico al grupo saliente (Häse y Finkelstein; Barrett, 1995; Rao *et al.*, 1998).

### **3.2.4 Cisteín-proteasas**

Las cisteín-proteasas se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas. Su actividad depende de un sitio catalítico bivalente que consiste en cisteína e histidina. Son activas en presencia de agentes reductores como HCN o cisteína. Su pH óptimo es neutro. Son susceptibles a agentes sulfhídricos como *p*-cloromercuribenzoato (PCMB), pero no son afectadas por DFP y agentes quelantes. Las cisteín-proteasas catalizan la hidrólisis de los derivados de ácido carboxílico, involucrando la formación de un ácido-base y la hidrólisis de un intermediario acil-tiolato; su mecanismo de acción es muy similar al de las serín-proteasas. El paso inicial en el proceso catalítico involucra el enlace no covalente de la enzima libre y el sustrato para formar el complejo, esto es seguido por la acilación de la enzima, con la formación y liberación del primer producto, una amina R'-NH<sub>2</sub>, en el siguiente paso de deacilación, la acil-enzima reacciona con una molécula de agua para liberar el segundo producto, con la regeneración de la enzima libre (Barrett, 1994; Rao *et al.*, 1998) (fig. 4).

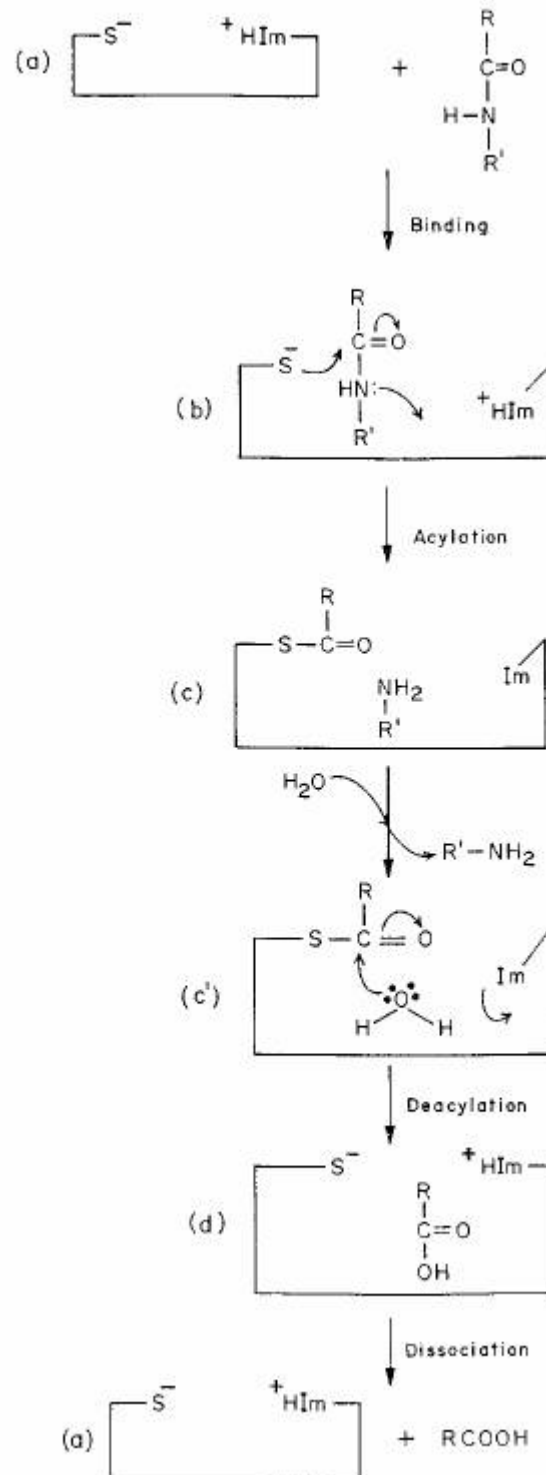


Figura 4. Mecanismo de acción de las cisteín-proteasas. Im y  $\text{HIm}^+$  se refieren al imidazol y al imidazol protonado, respectivamente.

## 4. JUSTIFICACIÓN

Debido al gran potencial patógeno que posee *G. anatis* y a las grandes pérdidas económicas que sufre cada año la industria avícola nacional, es necesario comprender los mecanismos que le permiten a este microorganismo evadir al sistema inmune, establecer una infección y desarrollar la enfermedad, siendo necesario identificar y caracterizar los factores de virulencia involucrados.

Particularmente se considera que las proteasas bacterianas pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis debido a su capacidad para degradar las moléculas involucradas en la inmunidad y los componentes de los tejidos del hospedero, por lo que es necesario caracterizarlas para aclarar su participación en este proceso.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Identificar y caracterizar las proteasas secretadas por *G. anatis* bv. haemolytica aislada de pollo.

### 5.2 Objetivos particulares

- Evaluar la actividad proteolítica de proteínas secretadas por *G. anatis* bv. haemolytica.
- Determinar el pH óptimo de actividad de dichas proteasas
- Determinar la temperatura óptima de actividad de las enzimas obtenidas.
- Identificar el tipo de proteasas con el uso de inhibidores.
- Evaluar la degradación de IgG de pollo por las enzimas proteolíticas secretadas por *G. anatis* bv. haemolytica.
- Determinar la presencia de epítomos inmunogénicos comunes entre las proteasas de *G. anatis* y la proteasa de *A. pleuropneumoniae*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas bacterianas

#### Cepas de campo

Se utilizaron dos cepas de campo de *G. anatis* bv. *haemolytica* aisladas de pollo: 2491-01 (aislada de lesiones de folículos ováricos y útero de aves de postura comercial del estado de Jalisco) y 2509-00 (aislada de lesiones de tráquea, fisura palatina y senos infraorbitales de aves de postura comercial del estado de Puebla) (Biotecnología Veterinaria S. A. de C. V., Tehuacan, Puebla).

#### Cepas de referencia

Se utilizaron cuatro cepas de referencia: *G. anatis* F149<sup>T</sup> (CCUG15563<sup>T</sup>), *G. genomoespecie* 1 (CCUG23129), *G. genomoespecie* 2 (Mraz573a/71D) y *G. genomoespecie* 3 (Gerl. 3191/88), donadas por el Dr. H. Christensen (The Royal Veterinary and Agricultural University, Dinamarca).

### 6.2 Cultivo

Las cepas se cultivaron en caldo BHI (infusión cerebro-corazón) (Apéndice I) y fueron incubadas 24 h a 37°C en baño de agitación (150 r. p. m.). Para determinar la pureza de los cultivos, se inocularon con ellos placas de agar BHI y se incubaron a 37°C durante 24 h, se evaluó el crecimiento de las colonias en agar sangre (Apéndice I), así como el tipo de hemólisis (Mannheim, 1984; Bailey, 1991).

### 6.3 Concentración de proteínas del sobrenadante

Los cultivos en caldo BHI fueron centrifugados durante 20 min. (8000 r. p. m. a 4°C) y las proteínas del sobrenadante libre de células se precipitaron con un volumen de metanol o con sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] al 70% durante 24 h en frío;



posteriormente los precipitados se centrifugaron en las mismas condiciones y la pastilla obtenida se resuspendió en un volumen mínimo de buffer TRIS 20 mM, pH 7.5. (Negrete-Abascal *et al.* 1998). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

#### **6.4 Actividad proteolítica**

Se evaluó la actividad proteolítica de las proteínas obtenidas, por medio de electroforesis con geles de acrilamida (10%) con SDS (SDS-PAGE) (Apéndice I) copolimerizados con caseína 1% ó gelatina 0.1%. Los pozos se cargaron con 10-15 µg de la proteína concentrada mezclada con 5 µL de buffer de muestra. Las muestras no se hirvieron o trataron con β-mercaptoetanol (β-ME). La separación electroforética se realizó a 80 V durante una hora y media. Después de la electroforesis los geles se incubaron durante una hora a 37°C con Tritón X-100 al 2.5%, posteriormente se incubaron con buffer de activación (TRIS 20 mM más CaCl<sub>2</sub> 10mM) durante dos horas a 37°C y finalmente se tiñeron con azul de Coomassie (Apéndice I), el exceso de colorante se eliminó con ácido acético al 10% (Negrete-Abascal *et al.* 1999).

#### **6.5 pH óptimo**

Para determinarlo se llevó a cabo electroforesis SDS-PAGE (con caseína 1%) con las muestras que presentaron actividad proteolítica. Después de la separación de las proteínas, los geles se incubaron con Tritón X-100 al 2.5%, posteriormente se cortaron y se incubaron con diferentes amortiguadores a distinto pH: buffer de acetatos 50 mM (pH 3, 4, 5 y 6), buffer TRIS 50 mM (pH 7 y 8) ó buffer glicina-NaOH 50 mM (pH 9 y 10) (Apéndice I) adicionados con CaCl<sub>2</sub> 10 mM durante 24 h a 37°C y se tiñeron con azul de Coomassie (Gomori, 1955; Negrete-Abascal *et al.*, 1999).

## **6.6 Estabilidad al calor**

Para determinar la estabilidad térmica de la proteasa, las muestras se mantuvieron a diferentes temperaturas durante 10 minutos: 4°C (control, en refrigeración), temperatura ambiente, 37, 40, 50, 60, 70 y 80°C. Después se les agregó buffer de muestra para evaluar su actividad proteolítica por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida con sustrato. Después del corrimiento, los geles se incubaron en el buffer con el pH óptimo de actividad de la enzima a 37°C y se tiñeron con el colorante mencionado anteriormente (Negrete-Abascal *et al.*, 1998).

## **6.7 Tipo de proteasa**

Se incubaron muestras de la proteasa a temperatura ambiente durante media hora en presencia de diferentes inhibidores: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 20 mM, p-hidroximercuribenzoato (pHMB) 10 mM ó fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 5 mM para después agregarles buffer de muestra. Una vez que las muestras se separaron por electroforesis, los geles se incubaron con tritón X-100 al 2.5% a 37°C durante 1 h para posteriormente incubarlos en el buffer con el pH óptimo de actividad más cada uno de los agentes inhibidores a 37°C durante 2 h (Negrete-Abascal *et al.*, 1999).

## **6.8 Degradación de IgG de pollo**

Se mezclaron 10 µg de IgG de pollo con 20 µg de la mezcla de proteínas y se incubaron durante 24, 48 y 72 h a 37°C con CaCl<sub>2</sub> 10mM. Después de cada tiempo las muestras se diluyeron con buffer de muestra y fueron hervidas durante 5 minutos (sin β-ME). Los productos de degradación se separaron por electroforesis SDS-PAGE y los geles se tiñeron con azul de Coomassie (Negrete-Abascal *et al.*, 1998 y 1999).

## 6.9 Western Blot (inmunoconocimiento)

Para determinar la presencia de reactividad cruzada con la proteasa de *A. pleuropneumoniae*, las proteínas secretadas al sobrenadante y concentradas por precipitación con metanol de las dos cepas de campo de *G. anatis* se separaron por medio de SDS-PAGE (las muestras fueron adicionadas con buffer de muestra y  $\beta$ -ME y hervidas) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante una hora a 100 V, la membrana fue bloqueada durante una hora con una mezcla de PBS-Tween y leche descremada al 5%, después se agregó a la membrana un anticuerpo policlonal de conejo (antiproteasa de *A. pleuropneumoniae*; 1: 1000) diluido en PBS-Tween. Posteriormente se agregó un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (1:2000), Para observar la reacción se adicionó una mezcla de diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Negrete-Abascal *et al.*, 1998 y 1999).

Para cada ensayo se realizaron al menos 3 repeticiones.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Pureza de los cultivos**

Se confirmó al observarse el crecimiento de colonias grisáceas y lisas en placa con un diámetro de 1 a 2 mm, y la presencia de hemólisis beta en las placas de agar sangre.

### **7.2 Concentración de proteínas.**

La precipitación de proteínas de los sobrenadantes de cultivos libres de células se logró utilizando metanol o sulfato de amonio, sin embargo, se optó por utilizar la precipitación con metanol, pues con este solvente se define mejor la actividad proteolítica y no se tiene la interferencia de las sales en la corrida electroforética.

### **7.3 Actividad proteolítica**

Las proteínas obtenidas a partir de los sobrenadantes libres de células de los cultivos de las cepas 2491-01 y 2509-00 de *G. anatis* bv. *haemolytica* aisladas de pollo, presentaron actividad proteolítica a alto peso molecular sobre los dos sustratos utilizados (>200 kDa), sin embargo, para las proteasas de ambas cepas esta actividad fue más evidente sobre caseína. En las cepas de referencia fueron observadas actividades proteolíticas de características similares a las de las cepas de campo (fig. 5).

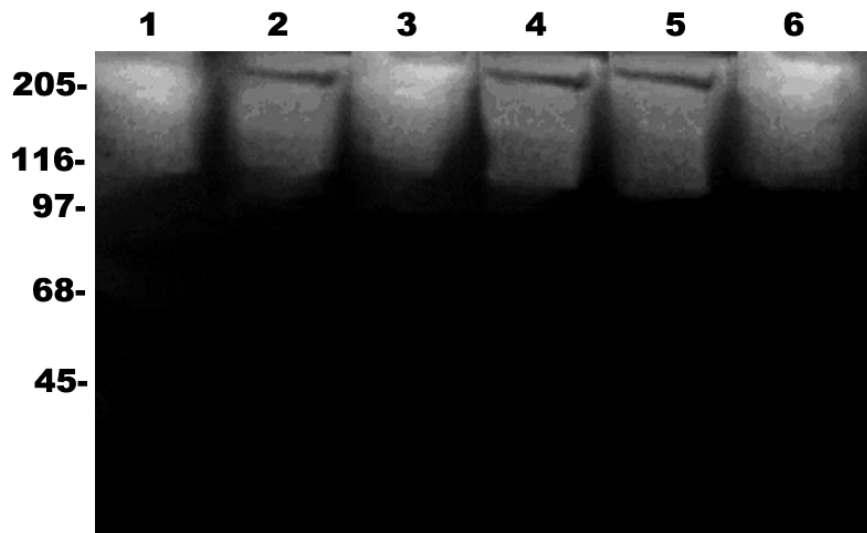


Figura 5. Actividad proteolítica de las proteínas obtenidas. Carril 1: *G. anatis* 2491-01; 2: *G. anatis* 2509-00; 3: *G. anatis* (cepa de referencia); 4: *G. gen. sp. 1*; 5: *G. gen. sp. 2* y 6: *G. gen. sp. 3*.

#### 7.4 pH óptimo

La actividad proteolítica de la cepa 2491-01 es evidente en el intervalo de pH de 3-10, siendo más intensa en un rango de pH de 7 a 9; las proteasas de la cepa 2509-00, fueron activas en el mismo intervalo de pH, con una actividad mayor a pH 9 (fig. 6).

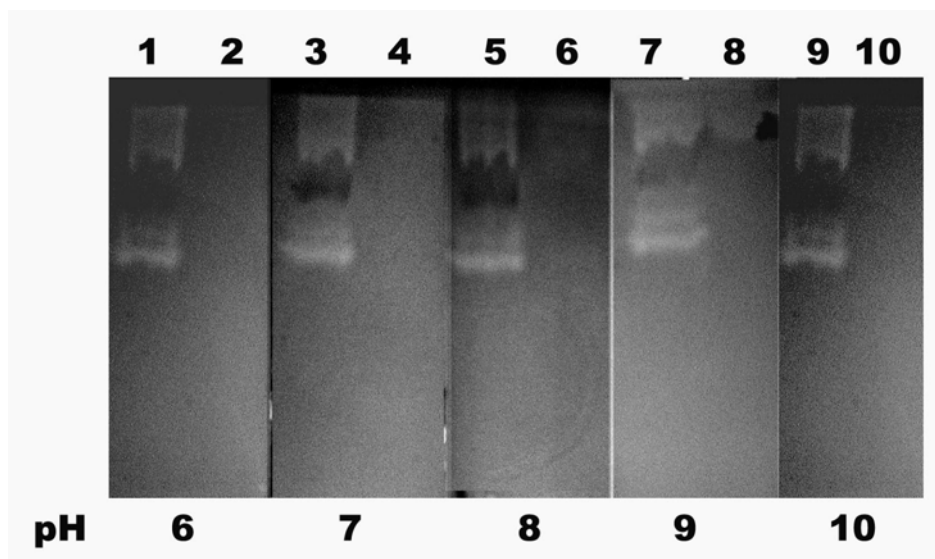


Figura 6. pH óptimo de actividad proteolítica. Carriles 1, 3, 5, 7 y 9: proteasas de la cepa 2491-01; carriles 2, 4, 6, 8, 10: proteasas de la cepa 2509-00.

### 7.5 Estabilidad al calor

La actividad proteolítica de la cepa 2509-00 se mantuvo estable hasta los 50°C, comenzó a disminuir a los 60°C y fue inhibida totalmente a los 70 y 80°C. Un comportamiento similar fue observado con la actividad proteolítica de la cepa 2491-01 (fig. 7a y 7b).

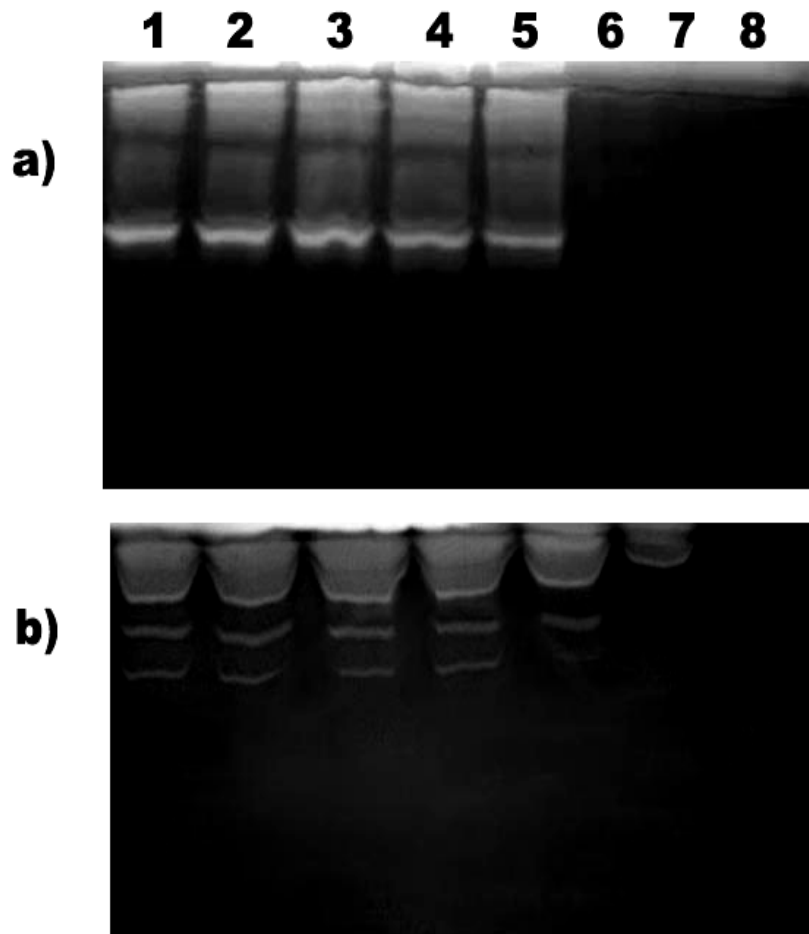


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica. a) *G. anatis* 2491-01; b) *G. anatis* 2509-00. Carril 1: control (4°C); 2: muestra incubada a temperatura ambiente; 3: 37°C, 4: 40°C, 5: 50°C, 6: 60°C, 7: 70°C y 8: 80°C.

## 7.6 Tipo de proteasa

Las proteasas de la cepa 2491-01 fueron inhibidas totalmente con EDTA 20 mM, mientras que la actividad de las proteasas de la cepa 2509-00 se inhibió parcialmente con el mismo agente y a la misma concentración, sin embargo fue inhibida totalmente con EDTA 40mM, la actividad de las proteasas de las dos cepas no fue afectada con pHMB 10mM o PMSF 5mM (fig. 8).

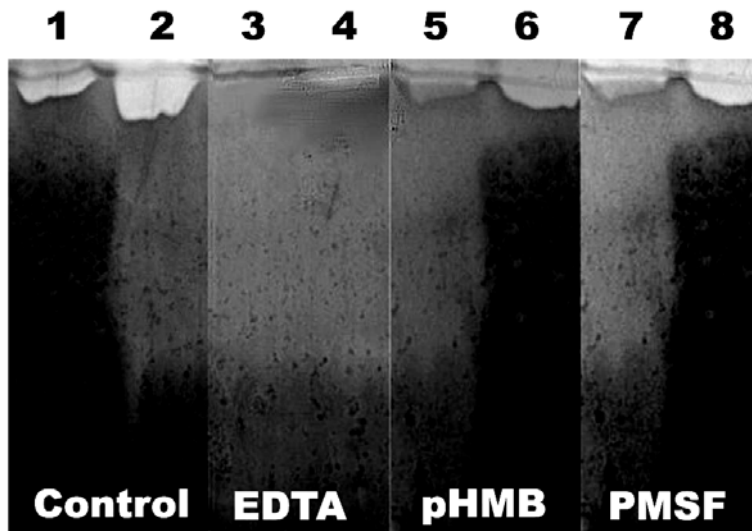


Figura 8. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica de *G. anatis*. Carriles 1, 3, 5 y 7: proteasas de la cepa 2491-01; carriles 2, 4, 6 y 8: proteasas de la cepa 2509-00.

## 7.7 Degradación de IgG de pollo

Se evaluó la degradación de IgG de pollo por las proteasas de *G. anatis* después de cada tiempo de incubación, se utilizaron como control las proteasas de la cepa de referencia *G. anatis* F149<sup>T</sup> (CCUG15563<sup>T</sup>). La IgG de pollo fue degradada por las enzimas proteolíticas de las dos cepas de campo y de la cepa de referencia a partir de las 24 h de incubación a 37°C; esta actividad se incrementó a las 48 y 72 h, sin embargo fue más intensa para la cepa 2491-01 (fig. 9).

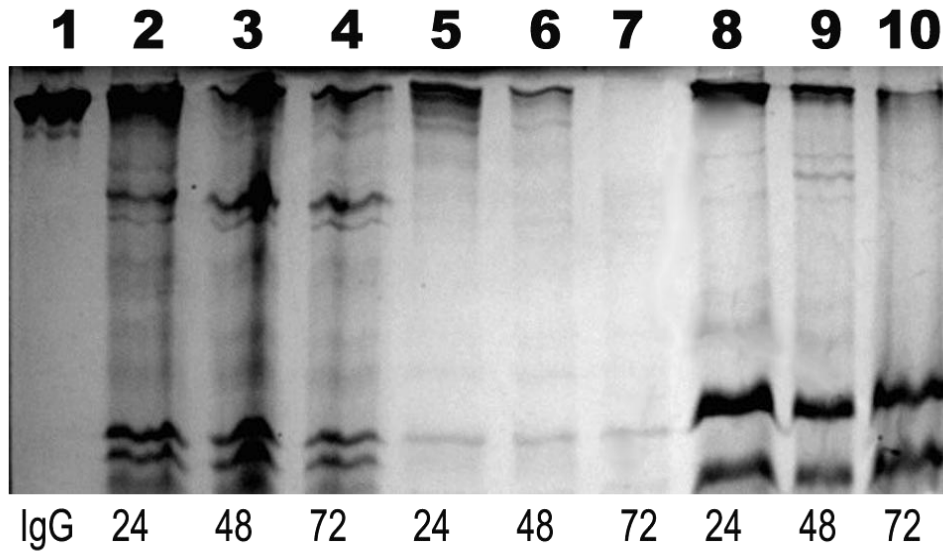


Figura 9. Degradación de IgG de pollo por las proteasas de *G. anatis*. Carril 1: IgG de pollo, carriles 2-4: proteasas de *G. anatis* (cepa de referencia), carriles 5-7: proteasas de *G. anatis* 2491-01, carriles 8-10: proteasas de *G. anatis* 2509-00.

### 7.8 Inmunorreconocimiento

Se observó una reactividad cruzada intensa entre las proteasas de las dos cepas de campo de *G. anatis* con el anticuerpo dirigido contra la proteasa de *A. pleuropneumoniae* (fig. 10).

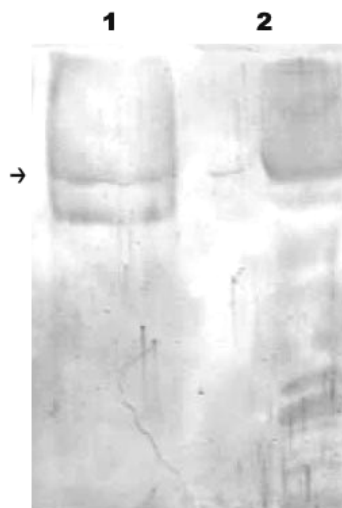


Figura 10. Inmunorreconocimiento de proteasas de *G. anatis* por antiproteasa de *A. pleuropneumoniae*. Carril 1: *G. anatis* 2491-01, carril 2: *G. anatis* 2509-00.



## 8. DISCUSIÓN

En México una de las industrias más importantes es la avícola, para el año 2001 la producción de carne de pollo fue de 1 879 276 toneladas, en el mismo año el consumo nacional *per capita* de esta carne fue de 18.79/kg/persona/año; por otro lado la producción de huevo fue de 1 829 659 toneladas y el consumo *per capita* fue de 18.29/kg/persona/año. En la actualidad los métodos de producción de huevo y carne de pollo han logrado mayor eficiencia a menor costo, lo que permite que la fuente de proteína animal con más accesibilidad para la población sea la de ave (Castañeda, 2002).

Existen factores que afectan esta eficiencia y repercuten negativamente en la avicultura del país, uno de los factores de mayor impacto son las enfermedades infecciosas. Entre los patógenos que afectan a las aves se encuentran las bacterias, las cuales producen una gran variedad de enfermedades, teniendo mayor impacto las de tipo respiratorio y entérico (Castañeda, 2002).

Las repercusiones que ocasiona *G. anatis* en la industria avícola nacional son considerables tomando en cuenta las exigencias de un mercado que cada día es más competido y que por lo tanto demanda la obtención de los costos de producción más competitivos (Campogarrido *et al.*, 2004).

Por este motivo es necesario determinar y comprender los mecanismos que permiten a esta bacteria producir las enfermedades que provocan grandes pérdidas económicas a esta industria, y así determinar cuales son las medidas que se deben tomar para disminuir la morbilidad y la mortalidad en las parvadas, tanto de engorda como de postura, y para ello se considera de importancia conocer los factores de virulencia de *G. anatis*.

Los factores de virulencia de las bacterias proveen una ventaja en el ecosistema competitivo del ambiente parasitario y son importantes en la colonización y crecimiento en los tejidos de sus hospederos. (Narayanan *et al.*, 2002).

Durante su crecimiento, las bacterias pueden liberar una variedad de enzimas extracelulares o productos, algunos de los cuales pueden ser importantes en la patogénesis. Las proteasas desempeñan muchas funciones fisiológicas y son factores esenciales para el control homeostático en eucariontes y procariontes, sin embargo, las proteasas producidas por ciertas bacterias patógenas están implicadas como factores de virulencia que pueden actuar como factores tóxicos para el hospedero, promoviendo la invasión y la colonización. (Otulakowski *et al.*, 1983; Miyoshi y Shinoda, 2000).

Al igual que las proteasas reportadas anteriormente en *M. haemolytica* A1 (Otulakowski *et al.*, 1983; Abdullah *et al.*, 1992; Sutherland *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1994; Mellors y Lo, 1995; Tabatabai, 1995; Cladman *et al.*, 1996), las proteasas obtenidas a partir de los sobrenadantes libres de células de las cepas de campo de *G. anatis* presentaron actividad sobre glicoproteínas, en este caso sobre caseína (fig. 5) y gelatina.

Se observó que las proteasas de *G. anatis* presentaron mayor degradación sobre caseína, la capacidad para degradar este sustrato ya había sido reportada para el caso de la glicoproteasa de *M. haemolytica*, a pesar de que la caseína no es un antígeno de superficie celular (Mellors y Lo, 1995).

La actividad proteolítica presentó un peso molecular muy alto (200 kDa) comparado con el peso reportado para la proteasa de *M. haemolytica* A1 aislada de bovinos, para la cual se determinaron pesos moleculares de 35.2 kDa (Abdullah, 1991) y 64 kDa (Tabatabai, 1995). Esto podría indicar que se trata de proteasas diferentes a las descritas de *M. haemolytica*.

Para conocer qué tipo de proteasas son secretadas por *G. anatis* fueron probados distintos agentes inhibidores. Debido a que la actividad proteolítica no fue alterada por

pHMB o PMFS y fue inhibida por EDTA, se determinó que se trataba de una metaloproteasa, ya que este agente es un quelante que secuestra el ión metálico del sitio catalítico de este tipo de proteasas. Para *M. haemolytica* ya se había reportado la presencia de una metaloproteasa (Abdullah *et al.*, 1991 y 1992), al igual que para otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* como *A. pleuropneumoniae*, el cual es el agente etiológico de la pleuropneumonía porcina (Negrete Abascal *et al.*, 1998), y *P. multocida*, el cual es responsable de algunas enfermedades en animales, como el cólera aviar, la septicemia hemorrágica en el ganado vacuno y la rinitis atrófica en cerdos (Negrete Abascal *et al.*, 1999).

En cuanto a la estabilidad térmica, las proteasas de *G. anatis* mantuvieron su actividad a partir de la temperatura ambiente hasta los 50°C, ésta comenzó a disminuir a los 60°C y fue inhibida totalmente a partir de 70 °C, indicando la capacidad de estas enzimas para resistir la temperatura de los organismos que infecta, la cual es de 40°C, incluso podrían resistir un aumento de temperatura de su hospedero en el caso de una infección.

Las proteasas obtenidas a partir de los cultivos de *G. anatis* presentaron actividad en un rango amplio de pH, con valores de 3 a 10, sin embargo la actividad óptima se presentó a un pH de 7-9 para el caso de la cepa 2491-01, considerándose proteasas neutras o ligeramente alcalinas, mientras que las proteasas de la cepa 2509-00 fueron más activas a pH 9, por lo que pueden considerarse proteasas alcalinas. La glicoproteasa de *M. haemolytica* también es activa en un rango amplio de pH: 4.5 a 8, aunque es óptimamente activa en un pH de 7.4. Se ha sugerido que un rango tan amplio de actividad podría proveer ventajas al microorganismo como la facilidad de sobrevivir en distintas condiciones ambientales, si las proteasas mantienen su actividad en este rango, serían un factor de virulencia secretado para sobrevivir, evadiendo la respuesta inmune e invadiendo los tejidos del hospedero. El rango amplio de pH puede ayudar a la bacteria a sobrevivir en las primeras fases de un proceso patológico en tejido epitelial con diferente pH, o en el que haya alteración del pH por liberación del

contenido de los organelos de las células de los tejidos afectados del hospedero (Luna, 2003).

La actividad de la proteasa de *G. anatis* también se presentó sobre IgG de pollo (fig. 9). Para *M. haemolytica* ya se había determinado que sus proteasas son capaces de degradar IgG1 de bovino; debido a la capacidad para degradar estas moléculas, estas proteasas pueden interferir con la respuesta inmune del hospedero, facilitando la colonización de los tejidos y de las superficies mucosas (Lee y Shewen, 1996). Las enzimas bacterianas que degradan IgA e IgG pueden ayudar a los microorganismos a evitar su destrucción, después de la degradación los fragmentos resultantes Fab retienen su capacidad de unión al antígeno y por lo tanto, pueden bloquear los epítomos presentes en la superficie de los patógenos, impidiendo que sean reconocidos por otros factores de defensa inmunoespecíficos; mientras que las funciones efectoras mediadas por los fragmentos Fc son eliminadas. Así, las bacterias se proveen a sí mismas con nutrientes, mientras se previenen simultáneamente del ataque de las defensas del hospedero (Negrete- Abascal *et al.*, 1999).

Al observarse la presencia de reactividad cruzada entre las proteasas de *A. pleuropneumoniae* y *G. anatis*, se determinó que existen epítomos inmunogénicos en común entre estas dos especies, lo que sugiere que se trata de proteasas similares, lo cual podría presentarse entre otros miembros de la familia bacteriana a la cual pertenecen ambas especies.

Debido a las características presentadas por las proteasas secretadas por *G. anatis*, estas pueden desempeñar un papel importante en la virulencia y participar en la evasión de la respuesta inmune y la colonización de los tejidos del hospedero.

## 9. CONCLUSIONES

- La actividad proteolítica de *G. anatis* bv. haemolytica se presentó a un peso molecular mayor a 200 kDa.
- Las proteasas de las dos cepas de campo son activas desde pH 3 a pH 10, para la cepa 2491-01 la actividad fue mayor a pH 7-9 y para la cepa 2509-01 fue más intensa a pH 9.
- La actividad de las proteasas de *G. anatis* es estable hasta los 50°C y es inhibida totalmente a 70°C.
- La actividad proteolítica de *G. anatis* bv. haemolytica corresponde a la de una metaloproteasa, ya que fue inhibida con EDTA.
- Las proteasas de *G. anatis* son capaces de degradar IgG de pollo.
- Existen epítomos inmunogénicos comunes entre las proteasas de *G. anatis* y las de *A. pleuropneumoniae*

## 10. PERSPECTIVAS

- Determinar si las proteasas obtenidas de los cultivos libres de células de *G. anatis* son capaces de degradar otros sustratos, como glicoproteínas de superficie de células (leucocitos, eritrocitos, etc.) o componentes de los tejidos de los tractos respiratorio y reproductor de pollos.
- Clonar el gen de la metaloproteasa de *G. anatis*, obtener clonas que expresen actividad en otros microorganismos y producir dicha proteasa en cantidades significativas para purificarla mediante los métodos adecuados y caracterizarla; así como producir un antisuero específico que pudiera ser utilizado en determinar la participación de esta proteasa en patogénesis, además de que este pudiera ser un constituyente de una vacuna que permitiera prevenir las infecciones provocadas por *G. anatis* y por lo tanto reducir las pérdidas económicas para la industria avícola.
- Identificar y caracterizar los factores de virulencia que pudieran ser de importancia para *G. anatis* durante la patogénesis y compararlos con los factores ya reportados de *M. haemolytica*.

## APENDICE I

### Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón)

En 1000 ml de agua destilada se disuelven 37 g de medio infusión cerebro corazón, se esteriliza a 15 lb/pulg<sup>2</sup> (121°C) durante 15 min.

### Agar BHI

Por cada 300 ml de medio se agregan 3.6 g de agar bacteriológico (1.2%) se esteriliza a 15 lb durante 15 min.

### Agar sangre 5%

Después de la esterilización y antes de ser vertido en cajas petri, a 300 ml de agar BHI se agregan 15 ml sangre.

### Gel separador 10% (10 ml)

H <sub>2</sub> O	4 ml
Acrilamida	3.3 ml
TRIS pH 8.8	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
NaCl 20%	0.2 ml
Persulfato de amonio (PSA) 10%	0.04 ml
TEMED	0.01 ml

### Gel concentrador (5ml)

H <sub>2</sub> O	3.4 ml
Acrilamida	0.83 ml
TRIS pH 6.8	0.63 ml
SDS 10%	0.05 ml
PSA 10%	0.15 ml
TEMED	0.15 ml

### **Colorante Azul de Coomasie**

Metanol	40%
Ácido acético	10%
Colorante azul brillante	0.25%

### **Buffer de acetatos**

*Soluciones stock:*

A: Ácido acético 0.2 M (11.55 ml en 1000 ml)

B: Acetato de sodio 0.2 M (16.4 g en 1000 ml)

x ml de A + y ml de B, diluidos en un total de 100 ml

x	y	pH
46.3	3.7	3
41.0	9.0	4
14.8	35.2	5
4.8	45.2	6

### **Buffer TRIS pH 7 y 8**

*Soluciones stock:*

A: TRIS 0.2 M (24.2 g en 1000 ml)

B: HCl 0.2 M (en 1000 ml)

50 ml de A + x ml de B, diluidos en un total de 200 ml

x	pH
44.2	7
26.8	8



## Buffer glicina-NaOH

*Soluciones stock:*








A: Glicina 0.2 M (15.01 g en 1000 ml)








B: NaOH 0.2 M (en 1000 ml)









50 ml de A + x ml de B, diluidos en un total de 200 ml









x	pH
8.8	9
32.0	10










## REFERENCIAS









-  **Abdullah K. M., Lo R. Y. C. and Mellors A.** 1991. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease gene. *J. Bacteriol.* 173: 5597-5603.
-  **Abdullah K. M., Udho E. A., Shewen P. E. and Mellors A.** 1992. A neutral glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-sialoglycoproteins. *Infect. Immun.* 60: 56-62.
-  **Addo P. B. and Mohan K.** 1985. Atypical *Pasteurella haemolytica* Type A from poultry. *Avian Dis.* 29: 214-217.
-  **Angen Ø., Mutters R., Caugant D. A., Olsen J. E. and Bisgaard M.** 1999. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:67-86.
-  **Bailey S.** 1991. Diagnóstico Microbiológico. Capítulo 29: Bacilos anaerobios facultativos y cocobacilos aerobios gramnegativos. Séptima edición. Editorial Panamericana. México. pp. 419-421.
-  **Barett A. J.** 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244: 1-15.
-  **Barett A. J.** 1995. Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 248: 183.






-  **Bisgaard M.** 1977. Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis. Characterization of 213 strains. *Avian Pathol.* 6:285-292.
-  **Bojesen A. M., Nielsen S. S. and Bisgaard M.** 2003<sup>a</sup>. Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. *Avian Pathol.* 32:503-510.
-  **Bojesen A. M., Christensen H., Nielsen O. L., Olsen J. E. and Bisgaard M.** 2003<sup>b</sup>. Detection of *Gallibacterium* spp. in chickens by fluorescent 16S rRNA in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 41:5167-5172.
-  **Bojesen A. M., Nielsen O. L., Christensen J. P. and Bisgaard M.** 2004. In vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens. *Avian Pathol.* 32: 145-152.
-  **Campogarrido M. R., Vázquez M. E. y González C. P.** Diagnóstico y prevención de las infecciones por *Gallibacterium anatis* en aves. Memorias de la XXIX Convención Anual ANECA, Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero. México. 2004.
-  **Casaubon M. T., González C., Vázquez M. H., Urquiza O., Ruiz G., Quintana J. A. y Fehervari T.** Lesiones debidas a *Gallibacterium anatis* en gallinas de postura desafiadas experimentalmente. Memorias de la XXIX Convención Anual ANECA, Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero. México. 2004.
-  **Castañeda Ramírez A.** 2002. Tipificación de aislamientos de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like obtenidos de aves con enfermedad reproductiva y respiratoria. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México D. F.

-  **Cladman W. M., Watt M. A. V., Dini J. P. and Mellors A.** 1996. The *Pasteurella haemolytica* O-sialoglycoprotein endopeptidase is inhibited by zinc ions and does not cleave fetuin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 220:141-146.
-  **Christensen H., Bisgaard M., Bojesen A. M., Mutters R. and Olsen J. E.** 2003. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, "*Actinobacillus salpingitidis*" or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 275-287.
-  **Frank G. H. and Briggs R. E.** 1992. Colonization of the tonsils of calves with *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 53:431-434.
-  **Greenham L. W. and Hill T. J.** 1962. Observations of avian strain of *Pasteurella haemolytica*. *Vet. Rec.* 74:861-863.
-  **Gomori G.** 1955. Preparation of Buffers for use in enzyme studies. *Methods Enzymol.* 1:138-145.
-  **González-Pedrajo B. y Dreyfus G.** 2003. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. En: Flores Herrera O., Riveros Rosas H., Sosa Peinado A., y Vázquez Contreras E. (eds.). Mensaje Bioquímico, Vol. XXVII. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. UNAM. México. pp. 45-62.
-  **Hacking W. C. and Pettit J. R.** 1974. *Pasteurella haemolytica* in pullets and laying hens. *Avian Dis.* 18:483-486.
-  **Harbourne J. F.** 1962. A haemolytic cocco-baccillus recovered from poultry. *Vet. Rec.* 74: 566-567.

-  **Harry E. G.** 1962. A haemolytic coccobacillus recovered from poultry. *Vet. Rec.* 74:640.
-  **Häse C. C. and Finkelstein R. A.** 1993. Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol. Rev.* 57: 823-837.
-  **Highlander S.K.** 2001. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Front. Biosci.* 6: 1128-1150.
-  **Hu R. H., Mellors A. and Bhavanandand V. P.** 1994. Cleavage of epitectin, a mucin-type sialoglicoprotein, from the surface of human laryngeal carcinoma cells by a glycoprotease from *Pasteurella haemolytica*. *Arc. Biochem. Biophys.* 310. 300-309.
-  **Jacques M. and Mikael L. G.** 2002. Virulence factors of *Pasteurellaceae*, formidable animal pathogens. *A .S. M. News.* 68: 174-179.
-  **Lee C. W. and Shewen P. E.** 1996. Evidence of bovine immunoglobulin G1 (IgG1) protease activity in partially purified culture supernatant of *Pasteurella haemolytica* A1. *Can. J. Vet. Res.* 60: 127-132.
-  **Lee C. W., Lo R. Y. C., Shewen P. E. and Mellors A.** 1994. The detection of the sialoglycoprotease gene and assay for sialoglycoprotease activity among isolates of *Pasteurella haemolytica* A1 strains, serotypes A13, A14, T 15 and A16. *FEMS Microbiol. Lett.* 121:199-206.
-  **Lin M. Y., Cheng M. C., Huang K. J. and Tsai W. C.** 1993. Classification, pathogenicity and drug susceptibility of hemolytic gram-negative bacteria isolated from sick or dead chickens. *Avian Dis.* 37: 6-9.

-  **Lo R. Y. C.** 2001. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet. Microbiol.* 83: 23-35.
-  **Luna Rivero M. J. N.** 2003. Clonación del gen y caracterización parcial de una proteasa de *Pasteurella multocida*. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Puebla.
-  **Madigan M. T., Martinko J. M. y Parker J.** 1998. Biología de los Microorganismos. Capítulo 23: Principales enfermedades microbianas. 8ª edición. Prentice Hall, Madrid. pp. 942-943.
-  **Maeda H.** 1996. Role of microbial proteases in pathogenesis. *Microbiol. Immunol.* 40: 685-699.
-  **Mannheim W.** 1984. Family *Pasteurellaceae*. En: Holt J. G. (Editor en jefe) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. I. Williams and Wilkins. Baltimore. pp. 552-558.
-  **Mellors A. and Lo R. Y. C.** 1995. O-sialoglycoprotease from *Pasteurella haemolytica*. *Methods Enzymol.* 248: 728-739.
-  **Miyoshi S. and Shinoda S.** 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect.* 2: 91-98.
-  **Mushin R., Weisman Y. and Singer N.** 1980. *Pasteurella haemolytica* found in the respiratory tract of fowl. *Avian Dis.* 24: 162-168.
-  **Mwangota A. U., Muhammed S. I. and Thomson R. G.** 1978. Serological types of *Pasteurella haemolytica* in Kenia. *Cornell Vet.* 68: 84-93.

-  **Narayanan S. K., Nagaraja T. G., Chengappa M. M. and Stewart G. C.** 2002. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet. Microbiol.* 84: 337-356.
-  **Negrete-Abascal E., Tenorio V. R., Guerrero A. L., García R. M., Reyes M. E. y de la Garza M.** 1998. Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Can. J. Vet. Res.* 62: 183-190.
-  **Negrete-Abascal E., Tenorio V. R. y de la Garza M.** 1999. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Curr. Microbiol.* 38: 64-67.
-  **Nyarko K. A., Coomber B. L., Mellors A. and Gentry P. A.** 1998. Bovine platelet adhesion is enhanced by leukotoxin and sialoglycoprotease isolated from *Pasteurella haemolytica* A1 cultures. *Vet. Microbiol.* 61: 81-91.
-  **Otulakowski G. L., Shewen P. E., Udoh A. E., Mellors A. and Wilkie B. N.** 1983. Proteolysis of sialoglycoprotein by *Pasteurella haemolytica* cytotoxic culture supernatant. *Infect. Immun.* 42:64-70.
-  **Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. and Deshpande V. V.** 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597-635.
-  **Shaw D. P., Cook D. B., Maheswaran S. K., Lindeman C. J. and Halvorson D. A.** (1990). *Pasteurella haemolytica* as a co-pathogen in pullets and laying hens. *Avian Dis.* 34: 1005-1008.
-  **Sutherland D. R., Abdullah K. M., Cyopick P. and Mellors A.** 1992. Cleavage of the cell-surface O-sialoglycoproteins CD34, CD43, CD44, and CD45 by a novel glycoprotease from *Pasteurella haemolytica*. *J. Immunol.* 148: 1458-1464.

-  **Tabatabai L. B.** 1995. Fetuin is a substrate for *Pasteurella haemolytica* O-sialoglycoprotease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 981-987.
-  **Velasco M. E. y Yamasaki A.** 2001. Bacterias de interés veterinario. Portal Veterinaria. Disponible en: <http://www.portalveterinaria.com/sections>
-  **Veit H. P., Wise D. J., Carter, G. R. and Chengappa M. M.** 1998. Toxin production by *Pasteurella granulomatis*. *Ann. New York Acad. Sci.* 849: 479-484.
-  **Wang S., Clarke C. R. and Clinkenbeard K. D.** 1999. Role of Phospholipase D in *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in Phospholipase A<sub>2</sub> activity in bovine neutrophils. *Infect. Immun.* 67: 3768-3772.
-  **Watt M. A. V., Mellors A. and Lo R.Y. C.** 1997. Comparison of the recombinant and authentic forms of the *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease. *FEMS Microbiol. Lett.* 147:37-43.