



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**“PURIFICACIÓN DE FIBRONECTINA  
OVINA Y SU PARTICIPACIÓN EN LA  
ADHESIÓN DE *Mannheimia haemolytica*  
SEROTIPO A2 CON CÉLULAS  
BUCEOPITELIALES DE OVINO”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

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

**MIGUEL ANGEL LÓPEZ GONZÁLEZ**

**ASESOR: M. C. CYNTHIA GONZÁLEZ RUÍZ.  
COASESOR: M. C. NIDIA MARIBEL LEÓN SICAIROS.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Proyecto financiado por CONACYT-MÉXICO,  
N° G38590-B**

## **DEDICATORIAS:**

A mi mama:

A la persona que más quiero y admiro por el amor, esfuerzo y dedicación que incondicionalmente me has brindado para sacar a su familia adelante y hacer de sus hijos personas de bien, a pesar de las situaciones adversas y momentos difíciles que se han presentado; por apoyarme y confiar en mí siempre y en todo momento; por comprenderme y aceptarme como soy. Gracias mami, todos tus sacrificios han valido la pena.

¡Te amo mamá!

A mi abuela:

Por estar pendiente de mí en todo momento y cuidarme durante toda mi vida, por todo tu apoyo, cariño y confianza. Gracias Titi.

¡Te quiero mucho!

A mi hermano:

Por haber compartido tu niñez, adolescencia, amigos y juegos, por apoyarme a tu manera y ser una persona que admiro por la responsabilidad, dedicación y perseverancia que siempre has demostrado para salir adelante y cumplir con todas tus metas. Gracias Esteban.

¡Te quiero mucho!

A Alina:

Por estar conmigo, apoyarme y confiar en mí siempre, aun en los momentos difíciles, por hacerme más fuerte ante la vida, por tu comprensión y paciencia. Gracias por compartir conmigo logros, alegrías y tristezas, pero sobre todo, gracias por creer en mí. Espero que sigamos disfrutando al máximo estar juntos y aprovechemos así las oportunidades que se nos presenten en la vida.

¡Te amo mi niña!

A Heriberto:

Por el apoyo que siempre me has brindado, por escucharme siempre que lo he necesitado y por demostrarme que para salir adelante y cumplir las metas que uno se propone no se necesita un título, si no ser perseverante y echarle ganas.

¡Gracias amigo!

A Cynthia:

Por darme la oportunidad de participar en este proyecto, por la paciencia y esfuerzo que entregaste para que este trabajo se concluyera satisfactoriamente, y sobre todo, por creer al igual que yo, que todos tenemos la capacidad de realizar los proyectos y metas que nos proponemos siempre y cuando tengamos el interés y las ganas para llevarlos a cabo.

¡Mil Gracias!

A mis amigos:

A Enrique, José, Michelle, Pilar, Adytia, Karin, Marcos, Neli, Fernando y Martha. Gracias por su amistad y apoyo, y por compartir conmigo durante 4 años alegrías, tristezas y angustias, dentro y fuera del salón de clases.

A Rubén, Israel, Juan, Ernesto, Alejo, Blanquita y a todas las personas que de alguna manera me brindaron su incondicional amistad y apoyo.

¡Mil Gracias!

## **AGRADECIMIENTOS:**

A la M.C. Cynthia González Ruíz y a la Dra. Nidia León Sicaños por su tiempo orientación y ayuda, pero sobre todo, por su paciencia dedicación y empeño para sacar adelante este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya, investigadora del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV por su asesoría, apoyo y por haberme facilitado las instalaciones, material y equipo de su laboratorio para la realización de este trabajo.

Al Dr. Víctor Rubén Tenorio García del Departamento de Bacteriología del CENID Microbiología por su orientación, apoyo y por haberme facilitado material y equipo para realizar este trabajo.

Al personal del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV especialmente a los integrantes del Laboratorio 52 por su amable y desinteresada ayuda para llevar a cabo este trabajo.

Al M.C. Delfino Godínez Vargas y a la Bióloga Magda Reyes López del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV por su tiempo, orientación y ayuda durante la realización de este trabajo.

Al M.C. Jorge A. Cuellar Ordaz y al M.V.Z. Marcos Sánchez Pérez de la FES-C por su apoyo en la obtención del plasma ovino.

A todos los académicos que aportaron sus conocimientos y experiencia para mi formación como profesionista.

A la U.N.A.M, mi escuela, por darme la formación académica necesaria para desarrollarme como profesionista

<b>ÍNDICE DE MATERIAS.</b>	<b>PAGINA</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>I.1 Proteínas de la matriz extracelular</b>	<b>1</b>
<b>I.2 Fibronectina.</b>	<b>2</b>
<b>I.2.1 Composición de la fibronectina.</b>	<b>2</b>
<b>I.2.2 Funciones de la fibronectina.</b>	<b>3</b>
<b>I.2.3 Interacción de los Módulos de Fibronectina en la Adhesión Celular y Proteica.</b>	<b>3</b>
<b>I.2.4 Procesos de adhesión de microorganismos a fibronectina.</b>	<b>6</b>
<b>I.3 <i>Mannheimia haemolytica</i>.</b>	<b>7</b>
<b>I.3.1 Características generales.</b>	<b>7</b>
<b>II. Justificación</b>	<b>8</b>
<b>III. Hipótesis</b>	<b>8</b>
<b>IV. Objetivos</b>	<b>8</b>
<b>V. Estrategia experimental.</b>	<b>9</b>
<b>VI. Material y Métodos</b>	<b>10</b>
<b>VI.1 Obtención de plasma ovino</b>	<b>10</b>
<b>VI.2 Purificación y obtención de fibronectina ovina</b>	<b>10</b>
<b>VI.3 Cuantificación de fibronectina purificada</b>	<b>10</b>
<b>VI.4 SDS-PAGE</b>	<b>10</b>
<b>VI.5 Obtención anticuerpos contra fibronectina</b>	<b>11</b>
<b>VI.6 Purificación de Anticuerpo Anti-fibronectina</b>	<b>12</b>
<b>VI.7 DOT-BLOT</b>	<b>12</b>
<b>VI.8 Obtención de células bucoepiteliales y paquete bacteriano</b>	<b>13</b>
<b>VI.9 Tinción de Células con FITC y RITC</b>	<b>14</b>
<b>VI.10 Tinción de Bacterias con FITC y RITC</b>	<b>14</b>
<b>VI.11 Microscopía Confocal</b>	<b>14</b>
<b>VI.12 Citometría de Flujo</b>	<b>15</b>

<b>VII. Resultados</b>	<b>16</b>
<b>VIII. Discusión</b>	<b>29</b>
<b>IX. Conclusión</b>	<b>32</b>
<b>X. Bibliografía</b>	<b>34</b>
<b>XI. Abreviaturas</b>	<b>39</b>

<b>INDICE DE FIGURAS.</b>	<b>PAGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Unión de la célula con proteínas de la MEC que presentan la secuencia RGD.	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Módulos que componen a la Fn.	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Sitios de unión de los 3 tipos de módulos de Fn a diferentes macromoléculas.	<b>5</b>
<b>Figura 4.</b> SDS-PAGE al 7.5% teñido con Azul de Comassie.	<b>18</b>
<b>Figura 5.</b> DOT-BLOT 1. Incubado con AcIgG/Fn y Ac secundario.	<b>19</b>
<b>Figura 6.</b> DOT-BLOT 2. Incubado con AcIgG/Fn y Ac secundario.	<b>20</b>
<b>Figura 7.</b> DOT-BLOT 3. Incubado con Suero preinmune y Ac secundario.	<b>20</b>
<b>Figura 8.</b> Microscopía Confocal. Proceso de tinción CBEO, <i>M. haemolytica</i> A2, AcIgG/Fn	<b>22</b>
<b>Figura 9.</b> Microscopía Confocal. Interacción de <i>M. haemolytica</i> A2 con Fn y CBEO.	<b>23</b>
<b>Figura 10.</b> Microscopía Confocal. Inhibición de la adhesión con AcIgG/Fn	<b>24</b>
<b>Figura 11.</b> Microscopía Confocal de los ensayos de inhibición de la adhesión con tripsina.	<b>25</b>

<b>INDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS.</b>	<b>PAGINA</b>
<b>Tabla 1.</b> Calendario de inmunización.	<b>11</b>
<b>Tabla 2.</b> Fracciones obtenidas de la Fnop a D.O de 280nm	<b>16</b>
<b>Gráfica 1.</b> Fracciones obtenidas de Fnop a una D.O. de 280nm	<b>17</b>
<b>Gráfica 2.</b> Porcentaje de CBEO que presentan colocalización con Fn.	<b>27</b>
<b>Gráfica 3.</b> Porcentaje de Bacterias que presentan colocalización con Fn de la superficie celular.	<b>28</b>

## RESUMEN.

La adhesión de los microorganismos a tejidos del huésped, es un paso crucial para las infecciones. Dicha adhesión, esta mediada por moléculas específicas microbianas llamadas adhesinas. Algunas de estas moléculas de adhesión tienen interacción específica con estructuras de la matriz extracelular. Se ha descrito que la fibronectina, glicoproteína adhesiva extracelular y multifuncional, se encuentra en dicha matriz en forma de multidímeros y es usada como componente de adhesión para muchos microorganismos, entre los cuales se encuentran bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, micoplasmas, hongos y protozoarios, facilitándoles a estos la colonización al tejido del hospedero. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la fibronectina interactúa en la adhesión de *Mannheimia haemolytica* A2 a células bucoepiteliales de ovino. El modelo de adhesión, se realizó en células bucoepiteliales de ovino y fibronectina ovina purificada, la cual se obtuvo mediante una columna de sefarosa acoplada a gelatina. La proteína obtenida se cuantificó mediante el método de Bradford y para comprobar su pureza, se realizó SDS-PAGE, observándose uno de los dímeros de la molécula de Fn plasmática a nivel del marcador de 250 kDa. Se obtuvieron anticuerpos anti-fibronectina ovina, mediante la inmunización en conejos de la proteína purificada. Posteriormente, se realizó la purificación de la IgG anti-fibronectina, mediante una columna de sefarosa acoplada a proteína A. Con el fin de comprobar la especificidad de los anticuerpos IgG anti-fibronectina ovina, se realizaron ensayos de Dot-Blot. Se trabajó con una cepa de *M. haemolytica* A2 obtenida a partir de muestras representativas de lesión pulmonar de un animal muerto por proceso neumónico. La cepa bacteriana se mantuvo en agar sangre y para los ensayos posteriores se creció en medio líquido BHI. Se realizaron ensayos de adhesión por medio de la incubación de las células con *M. haemolytica* A2. Así mismo se desarrollaron ensayos de inhibición de la adhesión, por medio de la incubación previa con anticuerpos IgG anti-fibronectina ovina y con tripsina. Las muestras obtenidas de los ensayos de adhesión y de inhibición de la adhesión fueron fijadas en laminillas para ser observadas en el microscopio confocal. La microscopía confocal reveló múltiples colocalizaciones en las superficies celulares entre la fibronectina y la bacteria, lo cual indica una posible adhesión entre la fibronectina de la superficie celular y *M. haemolytica* A2. La microscopía confocal de las muestras previamente incubadas con tripsina no reveló colocalizaciones en las superficies celulares, lo cual sugiere que el componente de adhesión de *M. haemolytica* A2 puede estar localizado en la matriz extracelular. Finalmente, se realizó la técnica de Citometría de flujo, para determinar el porcentaje de bacterias de la superficie celular adheridas a fibronectina. Los resultados de la técnica de Citometría de flujo revelaron que de un total de 1937 CBEO analizadas (100%), se obtuvo un promedio de 284 CBEO (14.63%) que adhirieron bacterias a través de Fn en su superficie. Los resultados obtenidos sugieren que posiblemente *M. haemolytica* A2 tenga un receptor específico a la fibronectina de la matriz extracelular de las células bucoepiteliales de ovino. *M. haemolytica* es un comensal de vías respiratorias superiores, por lo que su permanencia en estas estructuras podría estar conferida a la adhesión de la fibronectina en la matriz de los epitelios con los que entra en contacto, para finalmente culminar en un proceso neumónico, si las condiciones así lo permiten.

## I. INTRODUCCIÓN.

### I.1 PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

Las células sintetizan macromoléculas que son secretadas a los espacios extracelulares. Al conjunto de estas moléculas se les denomina matriz extracelular (MEC). La función de este conjunto de moléculas son: separar grupos celulares adyacentes y prevenir cualquier tipo de interacción entre ellas, funcionar como el sustrato a través del cual las células deben migrar o bien, pueden servir como inductoras de patrones de diferenciación en algunos casos de grupos celulares <sup>1</sup>.

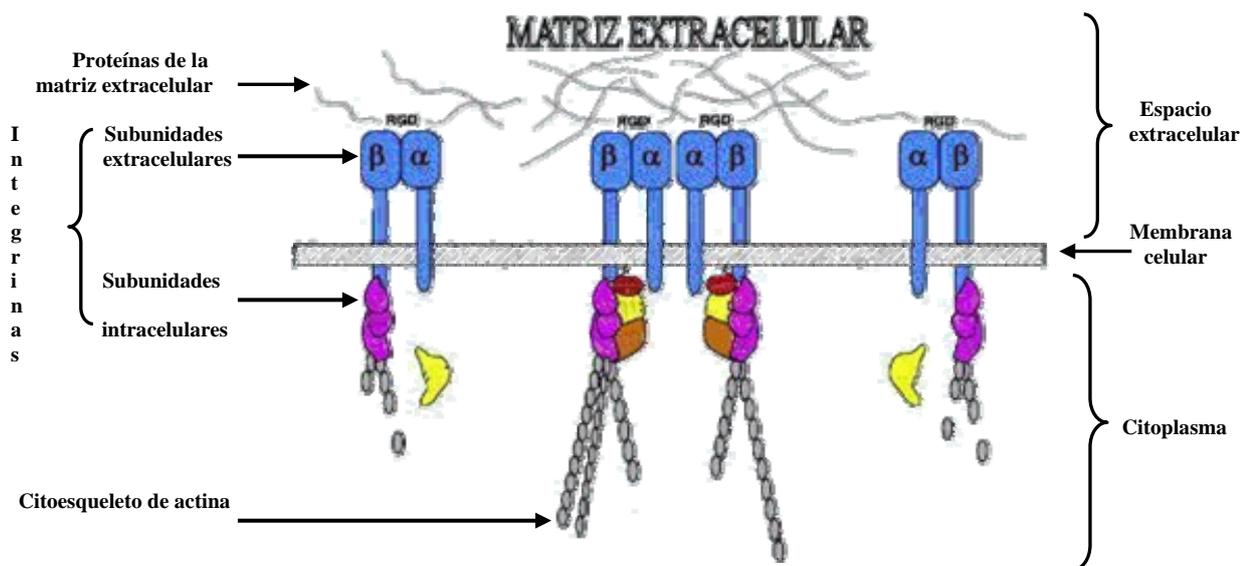
La MEC tiene efectos importantes en la célula, por ejemplo en la morfología y en la expresión de algunos genes. Los defectos en la organización de la MEC contribuyen a que se desencadene enfermedad y defectos en el desarrollo. Proteínas como la fibronectina (Fn), la laminina y el colágeno, intervienen en mecanismos de adhesión célula-MEC, estimulación de la movilidad hacia los sitios de inflamación y activación de los fagocitos. También intervienen en la hemostasis vascular interactuando con las plaquetas expuesta en el sitio de lesión vascular. Dentro de ellas destacan el factor Von Willebrand, colágena, Fn, vitronectina, tromboplastina y laminina <sup>2</sup>.

La MEC rodea a todas las células y está, regula dinámicamente funciones celulares incluyendo la adherencia, el crecimiento y la diferenciación celular. También proporciona un soporte estructural estable para las células y sirve de marco para la arquitectura del tejido <sup>2,3</sup>. Los constituyentes principales de la MEC son el colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. Existe gran variedad de estas moléculas; el número de colágenos descritos es mayor de 19 y existe un número similar de glicoproteínas adhesivas <sup>4</sup>. La MEC puede servir como sustrato no sólo para adhesión de células del organismo entre sí, si no también para la adhesión de microorganismos colonizadores <sup>5</sup>. La adhesión de microorganismos a tejidos del organismo es un paso crucial para las infecciones. Muchos de los procesos de adhesión que se presentan entre los microorganismos y sus células blanco están mediados por la interacción entre las adhesinas de los microorganismos, las proteínas de la MEC y los receptores celulares llamados integrinas <sup>6</sup>.

Las integrinas son una familia de receptores heterodiméricos transmembranales que ponen en contacto a la célula eucariótica con el medio ambiente externo. Los dominios extracelulares adhieren componentes de la MEC, usualmente a través del reconocimiento del tripéptido RGD el cual está constituido por tres aminoácidos: arginina, glicina y aspartato. Sirve como sitio de unión y fue identificado por primera vez en la Fn <sup>7</sup>. Estos blancos cambian en los dominios citoplasmáticos, alternando su interacción con proteínas del citoesqueleto que pueden regular la adhesión celular, crecimiento y migración. Al mismo tiempo generan señales dentro de la célula que pueden alterar el estado de activación de algunas integrinas, afectando su afinidad por ligandos extracelulares. Estas integrinas son capaces de transmitir sus señales a través de la membrana en ambas direcciones, dentro y fuera de la célula <sup>8</sup>. Las integrinas están formadas por una pequeña subunidad denominada  $\beta$ , rica en disulfuro y una subunidad más larga denominada  $\alpha$ ; ambas son de alto peso molecular y se ubican en la superficie celular de mamíferos. Se han reportado al menos 21 integrinas diferentes <sup>9</sup>.

Múltiples integrinas reconocen a cada una de las principales glicoproteínas de la MEC <sup>10</sup>. Por ejemplo, en el caso de la Fn, la región IIIICS (también conocida como región V) es reconocida por la integrina  $\alpha 4\beta 1$  <sup>11, 12</sup> y la secuencia RGD es reconocida por la integrina  $\alpha 5\beta 1$  <sup>13</sup>. En la Figura 1, se muestra la interacción de la célula con las regiones de la MEC que presentan la secuencia RGD.

**Figura 1.** Unión de la célula con proteínas de la MEC que presentan la secuencia RGD. Giancotti & Ruoslahti, Science 285: 1029 (1999).



Representación esquemática de la interacción entre las proteínas de la MEC hacia los receptores transmembranales de las integrinas que presentan la secuencia RGD y sus respectivas subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  expuestas extracelularmente. Dichas estructuras, se encargan de integrar el medio externo con el citoesqueleto de actina a nivel intracelular.

## I.2 FIBRONECTINA (Fn).

### I.2.1 Composición de la Fn.

La Fn es una glicoproteína adhesiva, extracelular y multifuncional, de alto peso molecular (450-500 kDa aprox.). Está presente en muchos tejidos, a nivel de la MEC, en forma insoluble como multidímero y en la mayoría de fluidos orgánicos, como en el caso de la sangre que se encuentra en forma de dímero unido por puentes disulfuro de aproximadamente 250 kDa <sup>14, 15</sup>.

La Fn plasmática y celular contiene cerca del 5% de carbohidratos, los cuales están unidos a residuos de asparagina <sup>16</sup>. Existen al menos 20 formas de Fn celular y plasmática <sup>17</sup>. La Fn plasmática, es sintetizada principalmente por los hepatocitos <sup>18</sup>.

Muchos tipos de células producen Fn insoluble, incluyendo fibroblastos, condrocitos, monocitos, células endoteliales, mioblastos y astrocitos. Estas incorporan Fn celular a la MEC. Además la Fn presenta quimiotactismo hacia fibroblastos y macrófagos; es decir, es el movimiento o la migración dirigida de estas células hacia la Fn, bajo la influencia de un estímulo químico<sup>18</sup>.

### **I.2.2 Funciones de la Fn.**

La adhesión de Fn a la MEC, juega un papel central en procesos como reparación de heridas y embriogénesis. La importancia de la Fn en eventos de migración celular durante la embriogénesis ha sido documentada en varios textos, por ejemplo, se ha descubierto que la migración de células del mesodermo durante la gastrulación puede ser bloqueada por medio de la secuencia del tripéptido RGD, el cual bloquea los receptores celulares de la Fn (integrinas); también se ha descubierto que la inoculación de anticuerpos anti-Fn (Ac/Fn) en embriones de pollo, bloquea la migración de células pericárdicas<sup>19</sup>.

Las matrices de Fn son vitales en el desarrollo y regeneración de tejidos de vertebrados, además modulan la formación de neoplasias. La Fn interactúa con las células en el control de la adherencia celular, la organización citoesquelética y señalización intracelular<sup>14</sup>.

La Fn también participa como opsonina de vida media la cual interviene en los procesos de defensa inmunitaria. La adhesión de linfocitos a Fn, es fundamental para su migración y localización en órganos linfoides y sitios de inflamación. La adhesión a Fn está mediada por receptores celulares que incluyen integrinas  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 5\beta 1$  y proteoglicanos. Los proteoglicanos forman parte de la colágena, pero también existen algunos que se expresan en superficies celulares y permiten que ellas se unan a la MEC. Entre estas moléculas se encuentra el Syndecan<sup>14</sup>.

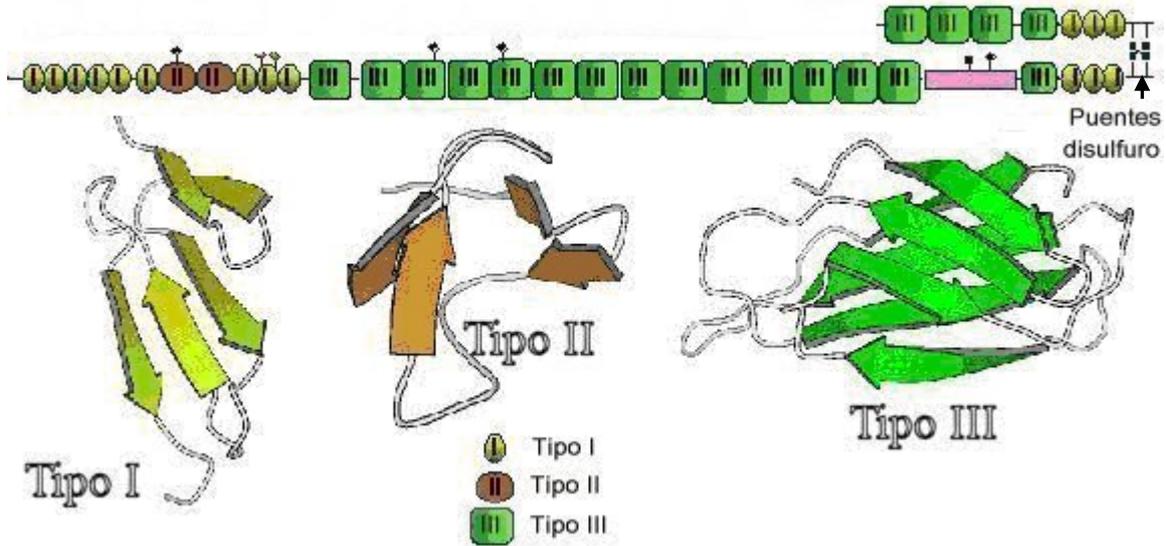
### **I.2.3 Interacción de los Módulos de Fn en la Adhesión Celular y Proteica.**

La Fn es una glicoproteína de funcionamiento múltiples que se compone de tres diferentes tipos de módulos (F1, F2 y F3), los cuales son múltiples dominios con diferentes sitios de adhesión para otras proteínas de la MEC y para receptores de células de superficie, cada módulo constituye una unidad independiente. La Fn humana contiene 12 módulos tipo I, 2 tipo II y hasta 18 tipo III. El número de módulos tipo III depende del tejido y/o de las condiciones celulares. Además la Fn tiene una región particular, designada como IIICS (también conocida como región V)<sup>20</sup>. Este módulo junto con dos módulos tipo III llamados EDB y EDA o EIIIB y EIIBA, se regulan para el empalme alternativo del RNAm de la Fn. El módulo de IIICS codifica dos sitios de unión de las integrinas, y está implicado en la adhesión de heparina<sup>21</sup>.

El conocimiento de los mecanismos por medio de los cuales los módulos interaccionan y presentan sus superficies funcionales es vital para el entendimiento de las relaciones estructurales y funcionales de las proteínas modulares<sup>20</sup>. La Figura 2 muestra los tres tipos de módulos que componen a la Fn.

## Figura 2. Módulos que componen a la Fn.

Kenneth Ingham, Adjunct Professor, Dept. of Biochemistry & Molecular Biology,  
George Washington University School of Medicine



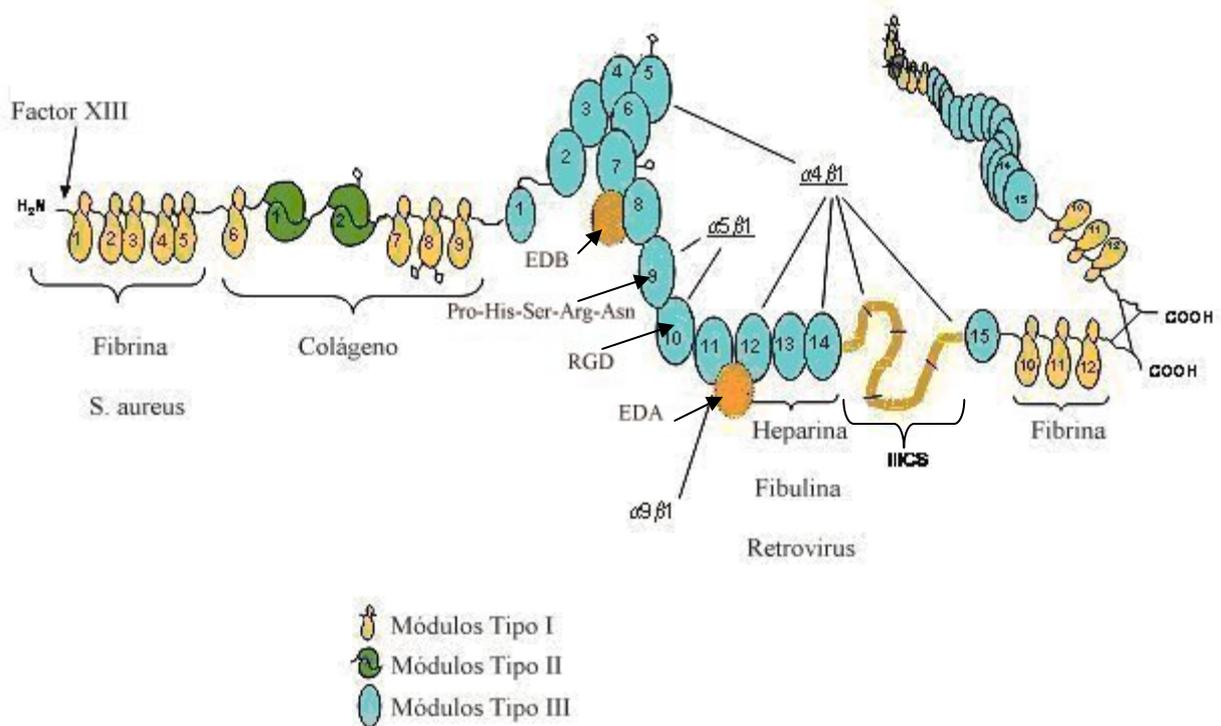
Representación esquemática de la Fn en forma de dímero unida por puentes disulfuro. En la parte superior se aprecian los módulos que conforman su estructura. Los módulos son: 12 módulos Tipo I o F1, 2 módulos Tipo II o F2 y 15 módulos Tipo III o F3 éstos últimos, varían en número dependiendo del tejido y/o condiciones celulares. En la parte inferior se aprecia un esquema tridimensional de los tres tipos de módulos.

Módulos homólogos a los de Fn se han encontrado en otras proteínas, especialmente los de tipo III, siendo encontrados en el 2% de las proteínas animales<sup>22</sup>.

Aparentemente es común que una superficie de unión de Fn requiera más de un módulo para una adecuada interacción. El dominio de unión a colágeno contiene módulos F1 y los dos únicos módulos F2<sup>20,21</sup>. Los módulos F3, los cuales son los más abundantes dentro de la molécula de Fn, tienen como función mediar las interacciones proteína-proteína y actúan como espaciadores, por tanto aseguran la correcta posición de los sitios funcionales<sup>23</sup>, además en estos se encuentran sitios de unión a integrinas y a heparina<sup>21</sup>.

La Fn presenta esta variedad de módulos, debido a que tiene que funcionar conjuntamente con diversas células, colágenos, proteoglicanos y otras macromoléculas como fibrina y heparina. La Fn realiza estas funciones conjuntas ya que su actividad de adhesión en estos módulos está dada por la secuencia RGD la cual reconoce células de superficie<sup>24</sup>. En la Figura3 se muestran los sitios de unión a diferentes macromoléculas.

**Figura 3.** Sitios de unión de los 3 tipos de módulos de Fn a diferentes macromoléculas.  
 Kenneth Ingham, Adjunct Professor, Dept. of Biochemistry & Molecular Biology,  
 George Washington University School of Medicine



Representación esquemática de la Fn en la que se aprecian los sitios de unión para diferentes proteínas e integrinas. La adhesión a fibrina requiere la interacción de los módulos Tipo I: 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11 y 12. La proteína de unión de *S. aureus* interactúa con los módulos Tipo I: 1, 2, 3, 4 y 5. Para la adhesión de colágeno se necesita la interacción de esta proteína con los módulos Tipo I: 6, 7, 8 y 9, y con los únicos dos módulos Tipo II. Para la adhesión de la heparina, fibulina y para algunos retrovirus se requiere la interacción con los módulos Tipo III: 12, 13 y 14. Para la adhesión celular, las subunidades de la integrina  $\alpha 5 \beta 1$ , interactúan con la secuencia Pro-His-Ser-Arg-Asn situada en el noveno módulo Tipo III y la secuencia RGD situada en el décimo módulo Tipo III. Finalmente, para la adhesión de las subunidades de la integrina  $\alpha 4 \beta 1$  interactúan el segmento IICS o región V y los módulos tipo III: 5, 12 y 14.

La actividad adhesiva a la célula requiere un sitio de adhesión definido por una secuencia de aminoácidos Prolina-Histidina-Serina-Arginina-Asparagina, situada en el noveno módulo tipo III. Esta secuencia actúa sinérgicamente con el sitio RGD. El análisis de la adherencia de la célula con los fragmentos de la Fn, sugiere que la posición y orientación de los sitios Prolina-Histidina-Serina-Arginina-Asparagina y el sitio RGD pueden ser importantes para la función de adhesión de la célula<sup>25,26,27</sup>. Además, el segmento IICS contiene una región adhesiva de la célula, independiente de las regiones sinérgicas de RGD<sup>28,29,30</sup>. Dos secuencias no adyacentes del péptido dentro de la región de IICS contienen actividad adhesiva a la célula: un Leucina-Ácido Aspártico-Valina (LDV) cerca del amino terminal y de un Arginina-Ácido Glutámico-Ácido Aspártico-Valina (REDV) cerca del carbono Terminal<sup>20</sup>.

#### I.2.4 Procesos de adhesión de microorganismos a Fn.

También se sabe que la Fn interviene en procesos de adhesión de microorganismos a diversos tejidos del huésped. La adhesión a Fn ha sido caracterizada en diferentes microorganismos, entre los cuales se encuentran bacterias Gram (+)<sup>31</sup>, Gram (-)<sup>32</sup>, micoplasmas<sup>33</sup>, hongos<sup>34</sup> y protozoarios<sup>35</sup>.

Las moléculas receptoras o adhesinas de *Staphylococcus aureus* y de otros microorganismos se han denominado componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la MEC (CMSRMAM)<sup>36</sup>.

La interacción de los CMSRMAM con moléculas de la MEC, es de interés creciente, ya que éste es un mecanismo de invasión de microorganismos. Estas moléculas interactúan con tejidos humanos y de animales, con proteínas del suero y con polipéptidos de la MEC<sup>37</sup>. Se sabe que el dominio N-terminal de fibronectina se une a los CMSRMAM de bacterias Gram (-) en tejidos del huésped<sup>37</sup>.

La interacción y adhesión de las bacterias a la Fn, están dadas por proteínas de unión a ella. La expresión de estas proteínas depende de la vía de entrada y capacidad de invasión de la bacteria, así como del tejido afectado o cepa utilizada<sup>38</sup>. Pero esta unión o la inhibición de la adhesión, se pueden ver afectadas por factores como pH, presencia o ausencia de fierro, calcio, lectinas o azúcares<sup>39</sup>. Se ha encontrado que la expresión de estas proteínas de unión produce inflamación sistémica, caracterizada por pérdida de peso, secreción de IL-6 y mortalidad en ratones<sup>40</sup>. Las proteínas de unión presentan sitios de unión repetidos de 35-40 residuos en su extremo C-terminal para unirse a la Fn, pero hay sitios fuera de este extremo que también interactúan con el ligando<sup>38</sup>.

Las proteínas de unión a Fn de *Streptococcus pyogenes* son importantes para el proceso infeccioso. Al menos una de estas proteínas exhibe diferentes sitios de unión, cada uno reaccionando con diferentes regiones de la molécula de Fn<sup>41</sup>.

Recientemente se ha discutido a detalle, la evidencia del papel de las proteínas de unión a Fn en la patogénesis de la infección de *S. aureus*<sup>42</sup>. La interacción de la Fn con *S. aureus* es un claro ejemplo del papel que juega esta proteína con algunas bacterias, ya que la Fn actúa como ligando entre las CMSRMAM, proteína de unión A y proteína de unión B del *S. aureus*, y la  $\beta$  integrina de la célula hospedera para favorecer la colonización de la bacteria<sup>43</sup>.

Las proteínas de unión a Fn se han caracterizado también en micobacterias<sup>44</sup>. La proteína de unión a Fn de *Campylobacter jejuni* es una proteína de membrana externa de aproximadamente 37 kDa. En *Neisseria meningitidis* se han descrito dos proteínas de membrana externa que son Opa y Opc, esta última interactúa con componentes de la MEC y proteínas del suero<sup>32</sup>.

Algunas cepas de *Salmonella enteritidis* también expresan organelos de superficie descritos como fimbrias delgadas, que unen Fn<sup>45</sup>.

### **I.3 *Mannheimia haemolytica*.**

#### **I.3.1 Características generales.**

*M. haemolytica* es un cocobacilo Gram (-), hemolítico, no móvil, mesofílico, aeróbico o anaeróbico facultativo, oxidasa positivo e indol negativo <sup>46</sup>.

Se subdivide en dos biotipos, A y T, basados en características bioquímicas y a la fermentación de arabinosa y trealosa, respectivamente <sup>47</sup>.

Los estudios taxonómicos actuales basados en análisis genotípico y fenotípico proponen una reclasificación de los 17 serotipos que forman el complejo de *M. haemolytica* en tres especies genéticas distintas: los serotipos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 16 y 17 fueron descritos como *M. haemolytica* biotipo A <sup>48</sup>; los serotipos 3, 4, 10 y 15 fueron descritos como *Pasteurella trehalosi* biotipo T <sup>49</sup>; y el serotipo A11 fue descrito como *Mannheimia glucosida* <sup>50</sup>.

*M. haemolytica* es el agente etiológico principalmente aislado en la pasteurelosis neumónica y es considerada uno de los más importantes patógenos en rumiantes <sup>50</sup>. *M. haemolytica* causa una pleuroneumonía en rumiantes de todas las edades, septicemia en corderos, mastitis, artritis, meningitis e infecciones del oído medio en ovinos, mientras que las cepas de *P. trehalosi* son responsables de pasteurelosis sistémica aguda en corderos <sup>51</sup>.

En cepas de *M. haemolytica* que afectan a rumiantes se han identificado diversos antígenos los cuales potencializan su patogenicidad. Entre estos se encuentran: la leucotoxina, que es una toxina de la familia de las RTX, formadora de poros, con actividad específica contra leucocitos, lipopolisacárido, proteínas de membrana externa, proteínas reguladas por hierro, fimbrias, enzimas degradativas (neuraminidasa, proteasas, metaloproteasas), aglutinantes serotipo-específicos y “adhesinas”; además de la cápsula y plásmidos de resistencia a antibióticos. Todos estos mecanismos juegan un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, la leucotoxina es considerada el factor de patogenicidad primario más importante <sup>52</sup>.

Si bien el papel de las proteínas de membrana externa como factor de virulencia no está del todo establecido. Diversos estudios han confirmado su importancia en la patogénesis de las infecciones resaltando su potencial participación en la respuesta de anticuerpos en la protección antibacteriana, además de que participan como transportadoras de materiales a través de la membrana (porinas) y en la adhesión a la célula hospedera <sup>53</sup>.

Recientemente se ha descubierto una proteína de unión a inmunoglobulina de 74kDa de *M. haemolytica* serotipo A1, la cual se adhiere a Fn bovina. Éste es un descubrimiento importante debido a que se piensa que la proteína de unión a inmunoglobulina podría ser utilizada por la bacteria como un mecanismo potencial de adhesión hacia las células alveolares del pulmón de los bovinos. El estudio de la respuesta inmunológica provocada por esta proteína podría establecer un método de protección contra la infección de *M. haemolytica*, desempeñando así un papel importante en la preparación de futuras vacunas <sup>54</sup>.

## II. JUSTIFICACIÓN.

Se ha demostrado que la fibronectina interviene en procesos de adhesión de microorganismos a diversos tejidos del huésped. Esta adhesión ha sido caracterizada en diferentes tipos de bacterias Gram (+) y Gram (-). *Mannheimia. haemolytica* es el agente que comúnmente se asocia a problemas neumónicos en rumiantes. Determinar si usa como componente de adhesión a la fibronectina para unirse a sus células blanco, podría en un futuro ayudar a entender y a establecer el mecanismo por el cual la bacteria asegura su permanencia en el huésped como comensal, o bien como patógeno, una vez que se presentan las condiciones adecuadas para su invasión.

## III. HIPÓTESIS.

Si la fibronectina interviene en procesos de adhesión entre células, proteínas y microorganismos debido a las múltiples regiones de unión que conforman su estructura, es posible que pueda interactuar con *Mannheimia haemolytica* como ligando entre la bacteria y la célula, siendo este el paso inicial para su permanencia y posterior colonización en los tejidos del huésped.

## IV. OBJETIVOS.

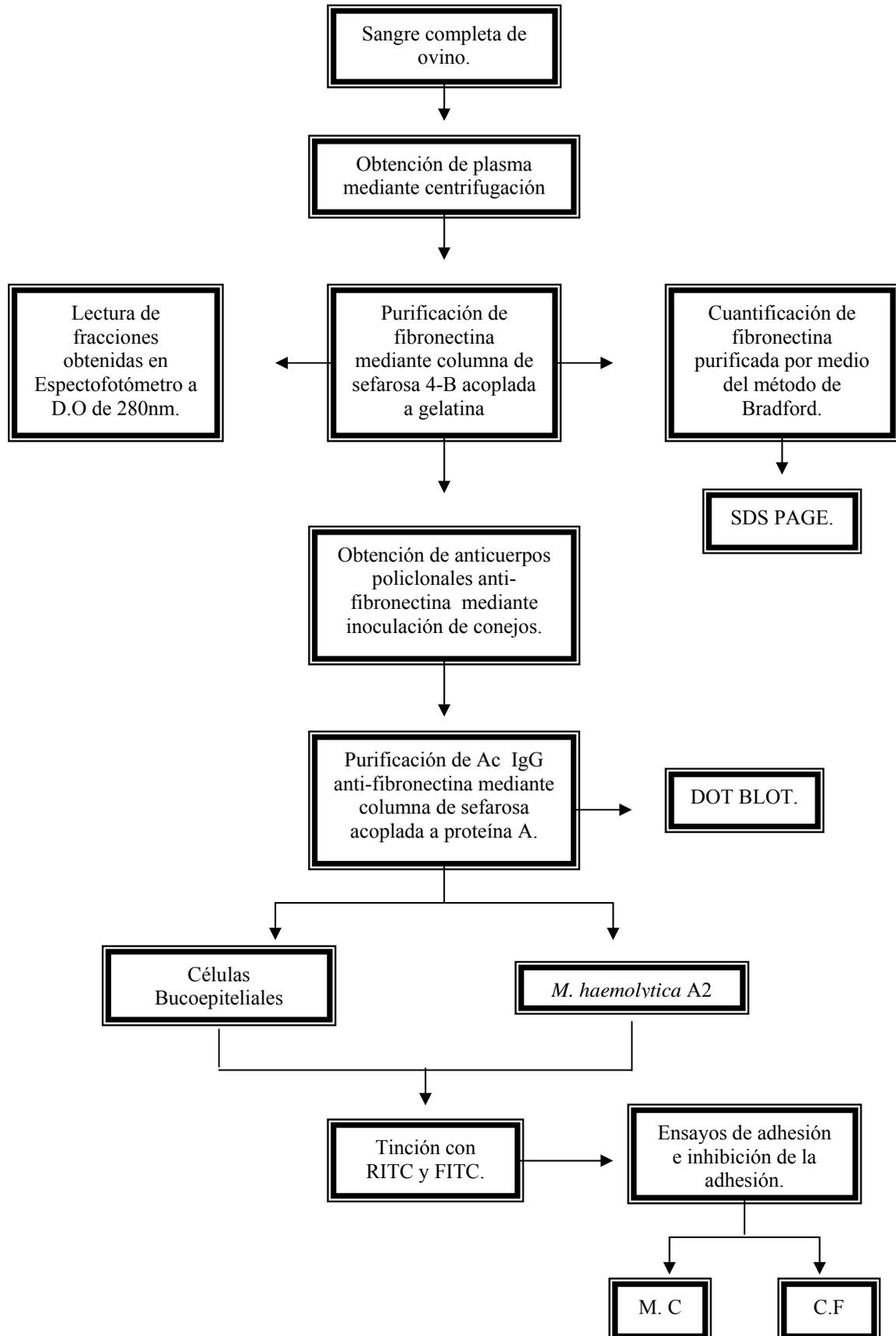
### Objetivo General.

- Determinar si fibronectina interactúa en la adhesión de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 a un modelo de células bucoepiteliales.

### Objetivos Particulares.

- Obtener y purificar Fn a partir de plasma de ovino.
- Obtener y purificar Ac policlonales contra Fn.
- Obtener células bucoepiteliales de ovino (CBEO) y estandarizar un modelo de adhesión a *M. haemolytica* A2.
- Determinar mediante microscopía confocal la participación de Fn en la adhesión de *M. haemolytica* serotipo A2 con CBEO.
- Determinar mediante Citometría de Flujo el porcentaje de bacterias adheridas a las CBEO usando la Fn de su superficie celular.

## V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **VI.1 Obtención de plasma.**

La muestra de sangre completa de ovino, se obtuvo por venopunción de la vena yugular, empleando aguja vacutainer de calibre 20. La sangre se colectó en 20 tubos vacutainer con EDTA (Ácido Etileno-Diamino-Tetracético) de 7ml<sup>55</sup>. La sangre obtenida se centrifugó (Beckman mod. GS-15R), a 3500rpm por 15min. a 4°C. Posteriormente se recolectó el plasma, en tubos falcón de 50ml colocando en cada tubo 25ml. de plasma, al cual se le agregó 250µl de PMSF (Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro) 0.1mM y posteriormente se congeló a -70°C hasta su uso<sup>35</sup>.

### **VI.2 Purificación de Fn ovina.**

La Fn se purificó mediante columna de sefarosa 4-B acoplada a gelatina, la cual se trabajó y se mantuvo a 4°C. El plasma obtenido previamente se descongeló a 4°C y se centrifugó a 10,000rpm por 15min. a 4°C. El plasma centrifugado se pasó dos veces por la columna mediante goteo lento. Posteriormente se realizó el lavado de la columna pasando a través de esta PBS 1X con urea 1M pH 7.4 y PMSF 0.1mM. Se continuó con la elusión de la Fn usando PBS 1X con urea 4M pH 7.4 y PMSF 0.1mM, colectando 15 fracciones de 40 gotas cada una en criotubos de plástico. Posteriormente las fracciones se leyeron en espectrofotómetro a 280nm D.O (densidad óptica) para determinar el pico de elusión máxima, usando como blanco PBS 1X. La columna se lavó pasando a través de esta PBS 1X pH 7.4 y finalmente se almacenó resuspendiendo la sefarosa en PBS 1X con azida de sodio al 2% pH 7.4<sup>35</sup>.

### **VI. 3 Cuantificación de Fn ovina purificada (Fnop).**

La cuantificación de la proteína purificada se realizó utilizando el método de Bradford<sup>56</sup>, desarrollándose una curva con la albúmina sérica bovina de 1-10µg por ml. utilizándose, 10µl de PBS 1X y 190µl de reactivo de Bradford, en placas de ELISA de fondo plano. Se colocaron 10µl de muestra de Fnop más 190µl de reactivo de Bradford, determinando así, la cantidad de proteína mediante la lectura de las placas en el lector de ELISA a 590nm y por regresión lineal<sup>56</sup>.

### **VI.4 SDS-PAGE.**

Para determinar la presencia de la Fnop, se utilizó SDS-PAGE por el método de Laemmli<sup>57</sup>. La Fnop se mezcló con amortiguador de muestra (4ml de agua destilada, 1ml de Tris-Hcl al 0.5M pH de 6.8, 0.8ml de glicerol, 1.6ml dodecil sulfato de sodio al 10%, 4 ml de β-mercaptoetanol y 0.2ml de azul de bromofenol al 0.5%) y se sometió a ebullición (95°C) durante 10min. Las muestras de Fnop se corrieron en SDS-PAGE al 7.5%. En el gel concentrador se colocó un peine de 10 carriles, una vez polimerizado, se retiró y depositó 20µl de la muestra, excepto en el primer carril en donde se depositó 15µl de marcador de peso molecular y en el último carril como control de peso, se depositó 20µl de muestra de albúmina sérica bovina (ABS), la cual previamente se

mezcló con el amortiguador de muestra y se sometió a ebullición con las mismas constantes para las muestras de Fnop. Los geles se corrieron a un voltaje de 100volts usando una solución buffer de corrida 1X (tris-glicina) pH 8.3 con SDS. Los geles se tiñeron con azul de Coomasie al 0.2% durante 1 a 4hr. a temperatura ambiente en agitación y se destiñeron por medio de una solución de lavado a base de ácido acético y metanol a diferentes concentraciones, hasta que se obtuvo la intensidad de bandas deseada. Posteriormente los geles se conservaron en ácido acético al 10% o bien se deshidrataron<sup>57</sup>.

### VI.5 Obtención de Ac IgG contra Fn ovina (AcIgG/Fn).

Los AcIgG/Fn ovina se obtuvieron inoculando conejos con la Fnop usando hidróxido de aluminio como adyuvante. Los conejos se inocularon por vía subcutánea (S.C), en la primera inoculación y las siguientes se realizaron por vía intramuscular (I.M). Se llevaron a cabo 5 inoculaciones, con un intervalo de 7 días entre cada una de ellas. Previo a la inoculación, se realizó un sangrado en blanco obteniendo la sangre de la vena marginal de la oreja (M.O). La inoculación se realizó en base al calendario de inmunización que se presenta en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Calendario de inmunización.

DÍA.	INÓCULO.	MUESTRA INOCULADA.	VÍA.
0	Sangrado en blanco.		M.O
1	Fnop.	0.5ml de muestra/0.5ml de adyuvante.	S.C
7	Fnop.	0.5ml de muestra/0.5ml de adyuvante.	I.M
14	Fnop.	0.5ml de muestra/0.5ml de adyuvante.	I.M
28	Fnop.	0.5ml de muestra/0.5ml de adyuvante.	I.M.
35	Fnop.	0.5ml de muestra/0.5ml de adyuvante.	I.M

Vías de inoculación: M.O: Marginal de la oreja, S.C: Subcutáneo, I.M: Intramuscular, Fnop: fibronectina ovina purificada.

Posteriormente se realizó el sangrado final de los conejos por punción cardiaca. La obtención del suero se realizó mediante la centrifugación de la sangre a 3500rpm, 15min. a 4°C. El suero obtenido se mantuvo almacenado a - 20°C hasta su uso <sup>58</sup>.

## **VI.6 Purificación de AcIgG/Fn.**

Para la purificación de los AcIgG/Fn se usó una columna de sefarosa acoplada a proteína A <sup>59</sup>. Se pesó 0.1g de sefarosa acoplada a proteína A y se depositó en microtubo de 1.5ml. Posteriormente se activó la sefarosa mediante un lavado con agua desionizada. Después del lavado, se dejó sedimentar la sefarosa por 15min. y el sobrenadante fue retirado <sup>59</sup>.

Ya activada y húmeda, la sefarosa acoplada a proteína A se le agregó 300µl del suero obtenido de la inmunización de los conejos con Fnop (suero inmune) y 300µl de TRIS-HCL 5mM pH 7.0 dejándolo en agitación suave por 2hrs. Posteriormente se realizó un lavado mediante centrifugación en una microcentrífuga (Sorvall mod. Heraeus), a 5000rpm, 5min. a 4°C. Al término de la centrifugación el sobrenadante fue desechado <sup>59</sup>.

Para realizar la elusión de los AcIgG/Fn purificados, se le agregó 1000µl de ácido cítrico 0.1M pH 3.0 y se dejó en movimiento a 4°C por 1hr. Transcurrido el tiempo, se sometió a centrifugación a 5000rpm por 5min. a 4°C, se retiró el sobrenadante, el cual contenía el AcIgG/Fn purificado y a este se le agregó 100µl de TRIS-HCL 2M pH 9.0 conservándolo a 4°C. A la sefarosa acoplada a proteína A se le agregó buffer de unión y se mantuvo a 4°C hasta su próximo uso <sup>59</sup>.

## **VI.7 DOT-BLOT.**

Para determinar la funcionalidad del AcIgG/Fn purificado se hicieron 3 ensayos de DOT-BLOT. El objetivo del primer ensayo fue demostrar que el AcIgG/Fn purificado reconocía Fnop. Para este ensayo se usó una membrana de nitrocelulosa dividida en 6 cuadros, en cada uno de los cuales se colocó por goteo, 10µl de muestras diferente siguiendo el orden que se presenta a continuación: Como control negativo se usaron 10µl de agua colocados en el primer cuadro. Como control positivo se emplearon 10µg/µl del suero inmune situado en el segundo cuadro, 10 µg/µl de AcIgG/Fn purificado situado en el tercer cuadro y 5 µg/µl del Ac. secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich) situado en el cuarto cuadro. En el quinto y sexto cuadros se utilizaron 5 µg/µl y 10 µg/µl de Fnop respectivamente. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente a la membrana se le agregó leche descremada al 5% por 1hr. para bloquear reacciones inespecíficas. Transcurrido el tiempo, se retiró la leche descremada y se sometieron a 3 lavados con PBS-TWEEN 20 al 0.05%, dejándolo actuar en cada uno de ellos por un tiempo de 10min <sup>60</sup>.

Después de haber retirado el PBS-TWEEN 20 del último lavado, se le agregó nuevamente 10ml. de PBS-TWEEN 20 al 0.05% con 100µl del AcIgG/Fn purificado, dejando interaccionar por 1hr. Posteriormente se sometieron a 3 lavados más con PBS-TWEEN 20 al 0.05% cada uno de ellos por un tiempo de 10min. Realizados los lavados, se les agregó 10ml de PBS-TWEEN 20 al 0.05% con 100µl del Ac.

secundario, dejándolo interaccionar por 1hr. a temperatura ambiente. Al cabo del tiempo se lavaron tres veces más con PBS-TWEEN 20 al 0.05%, por 10min cada uno <sup>60</sup>.

El revelado se realizó incubando la membrana por 10min. usando 0.02mg de diaminobenzidina diluida en 10ml de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.4 y 300µl de solución NICO (300µl de PBS 1x pH 7.4 con 0.02mg de Cloruro de Níquel y 0.02mg de Cloruro de Cobalto). Finalizado el tiempo se hicieron reaccionar con 100µl de Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30%, agregando finalmente 10ml de agua para detener la reacción <sup>60</sup>.

El propósito del segundo ensayo fue demostrar que el AcIgG/Fn purificado, no reacciona con el suero de conejo obtenido previa inmunización con fibronectina ovina purificada (suero preinmune). En este ensayo se usó una membrana de nitrocelulosa dividida en 4 cuadros en los cuales se colocaron por goteo 10µl de muestras diferentes en el siguiente orden: Como control negativo se usaron 10µg/µl de suero preinmune los cuales fueron colocados en el primer cuadro. Como controles positivos se emplearon 10 µg/µl del AcIgG/Fn purificado situado en el segundo cuadro, 10µg/µl del suero inmune situados en el tercer cuadro y por último 5µg/µl de un Ac secundario situados en el cuarto cuadro. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y ya secas se siguió la misma metodología antes descrita <sup>60</sup>.

Finalmente, con el objetivo de determinar si el suero preinmune reconocía a la Fnop, se realizó un tercer ensayo, Para este ensayo la membrana de nitrocelulosa fue dividida en 2 cuadros, en los cuales se colocó por goteo: 5µg/µl de Fnop en el primer cuadro y 10µg/µl de Fnop en el segundo. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente. Ya secas las gotas, la membrana fue incubada por 1hr. con leche descremada al 5%. Transcurrido el tiempo, se retiró la leche descremada y se realizaron 3 lavados con PBS-TWEEN 20 al 0.05%, cada uno de ellos por 10min <sup>60</sup>. Después se incubó con 10ml. de PBS-TWEEN 20 al 0.05% con 100µl del suero preinmune por 1hr. Posteriormente se continuó con la misma metodología antes descrita <sup>60</sup>.

## **VI.8 Obtención de Células Bucoepiteliales de ovino (CBEO) y paquete bacteriano.**

Las CBEO se obtuvieron por medio del raspado del vestíbulo bucal de ovinos con hisopos estériles, haciéndolo girar sobre la superficie epitelial del vestíbulo. El hisopo que contenía las CBEO fue sumergido en 5ml de Tris-HCL 0.1 M pH 7.3, haciéndolo girar dentro de la solución para que las CBEO quedarán suspendidas en esta solución y pudieran ser transportadas con refrigerante hasta su uso en el laboratorio. Posteriormente las CBEO fueron lavadas tres veces por centrifugación con Tris-HCL 0.1M pH 7.3 a 1365rpm, durante 15min a 4°C cada uno <sup>36</sup>.

El inóculo bacteriano que se utilizó, se hizo crecer en medio líquido BHI por 12hrs. a 37°C y se lavó tres veces en Tris-HCL 0.1M pH7.3 mediante centrifugación a 1365rpm durante 15min cada uno <sup>36</sup>.

Después del lavado de las CBEO y paquete bacteriano se resuspendieron nuevamente en Tris-HCL 0.1M pH 7.3 y midiendo que el nivel de absorbancia de los dos paquetes oscilara entre 4-6, determinando así, una concentración de  $1 \times 10^3$ , es decir, que por cada CBEO estaban presentes 1000 bacterias <sup>36</sup>.

## **VI.9 Tinción de CBEO con FITC y RITC.**

Para realizar la tinción de las CBEO con FITC (Isotiocianato de Fluoresceína), se tomaron 200µl del paquete celular en suspensión y se lavaron 3 veces más, con PBS 1X por centrifugación a 2500rpm por 10min. a 4°C. Posteriormente se les agregó 1ml. de paraformaldehído al 8%, dejándolas en agitación suave por 1hr. a 4°C. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 2500rpm por 5min <sup>36</sup>.

A las CBEO previamente fijadas se les agregó 500µl de PBS 1X con 2µg de FITC y se dejaron en agitación suave durante toda la noche a 4°C, manteniéndolas en microtubos de 1.5ml cubiertos, para evitar la exposición a la luz. Después se les realizaron 4 lavados con PBS 1X por centrifugación a 2500rpm por 10min. cada uno. Al término de los lavados se almacenaron a 4°C hasta su uso <sup>36</sup>.

Posteriormente, para teñir CBEO con RITC (Isotiocianato de Rodamina) se tomaron 200µl de la suspensión de células y se lavaron 3 veces con PBS 1X por centrifugación a 2500rpm por 10min. a 4°C. En seguida se les agregó 1ml. de paraformaldehído al 8%, dejándolas en agitación suave por 1hr. a 4°C. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 2500rpm por un tiempo de 5min <sup>36</sup>.

A las CBEO previamente fijadas se les agregó 500µl de PBS 1X con 2µg de RITC y se dejaron en agitación suave durante toda la noche a 4°C, manteniéndolas en microtubos de 1.5ml cubiertos para evitar la exposición a la luz. Posteriormente se les realizaron 4 lavados con PBS 1X por centrifugación a 2500rpm por 10min. cada uno. Al término de los lavados se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta su uso <sup>36</sup>.

## **VI. 10 Tinción de Bacterias con FITC y RITC.**

Para la tinción de las bacterias con FITC, se tomaron 200µl de la suspensión bacteriana y se continuó con la misma metodología usada previamente para teñir las CBEO. De la misma forma, se tomaron 200µl de bacterias en suspensión para ser teñidas con RITC siguiendo la misma metodología usada previamente para teñir las CBEO.

## **VI.11 Microscopía Confocal.**

Para observar la participación de la Fn en la adhesión bacteriana se estandarizaron varios ensayos de adhesión y de inhibición de la adhesión.

Para realizar los ensayos de adhesión se tomaron las CBEO previamente teñidas con FITC y las bacterias previamente teñidas con RITC, mezclándolas en microtubos de 1.5ml cubiertos y se incubaron en agitación suave por 1hr. a 37°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X por centrifugación a 2500rpm por 10min. a 4°C. Terminados los lavados se les agregó, 1000µl de Tritón-100X para permeabilizar la membrana celular al 0.5% dejando en agitación suave por 15min. a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 2500rpm por 5min. a 4°C y posteriormente se eliminó el sobrenadante. Después se agregaron 980µl de PBS 1X y 20µl de AcIgG/Fn y se dejó en agitación suave por 2hrs. a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS 1X por centrifugación a 2500rpm por 10 min. a 4°C. Al término de los lavados se agregaron 100µl de PBS 1X y 1µl de Ac anti-conejo acoplado a CY5 (Ac secundario-CY5) y se dejó en agitación suave por 2hrs. a temperatura ambiente.

Finalmente las CBEO con las bacterias se lavaron 2 veces con PBS 1X por centrifugación a 2500rpm por 10min. a 4°C y se procesaron para ser analizadas con microscopía óptica de Nomarsky y por microscopía confocal.

El primer ensayo de inhibición de la adhesión, se realizó con la finalidad de que el AcIgG/Fn, bloqueara la interacción directa entre la Fn y la adherencia bacteriana en la superficie celular. Se incubaron las CBEO previamente teñidas con FITC y el AcIgG/Fn en agitación suave por 1hr. a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados con PBS 1X por centrifugación a 2500rpm por 10min. a 4°C. Después se agregaron las bacterias previamente teñidas con RITC y se incubaron en agitación suave por 1hr. a 37°C. Posteriormente se continuó el ensayo siguiendo el mismo procedimiento usado en el ensayo de adhesión descrito anteriormente.

En el segundo ensayo de inhibición de la adhesión, las CBEO previamente teñidas con RITC fueron incubadas con tripsina en agitación suave por 1hr. a 37°C. La finalidad de utilizar tripsina, fue para eliminar o barrer la mayor cantidad posible de proteínas de la MEC contenida en la superficie de éstas. Tratando de inhibir así, la adhesión bacteriana. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados con PBS 1X por centrifugación a 2500rpm por 10min. a 4°C. Después se agregaron las bacterias previamente teñidas con FITC y se incubaron en agitación suave por 1hr. a 37°C. Posteriormente se continuó el ensayo, siguiendo el mismo procedimiento usado en el ensayo de adhesión descrito anteriormente.

## **VI.12 Citometría de flujo.**

Para determinar el porcentaje de bacterias adheridas a las CBEO usando la Fn de su superficie, se realizó la técnica de Citometría de flujo <sup>61</sup>.

Para realizar esta técnica se tomaron  $1 \times 10^4$  CBEO en 200µl, previamente teñidas con RITC (10 µg/ml) y  $1 \times 10^{11}$  bacterias marcadas previamente con un Ac. policlonal (1:100) desarrollado en un trabajo previo<sup>62</sup>, anti-*M. haemolytica* A2 teñido con CY5 (1:100), mezclándolos en microtubo de 1.5ml cubierto e incubándolos en agitación suave por 1hr. a 37°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X por centrifugación a 2500rpm por 10min. a 4°C. Después se agregaron 40µl de AcIgG/Fn humana (1:20), donado por la Q.F.B Elizabeth Franco del Dpto. de Biomedicina Molecular del CINVESTAV; marcado con FITC incubando en agitación suave por 2 hrs. a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron dos lavados con PBS 1X por centrifugación a 2500rpm por 10min., 4°C y las muestras se resuspendieron en 500µl de PBS 1X para ser leídas en un Citómetro de flujo (FAC Sort Becton & Dickinson) <sup>61</sup>.

## VII. RESULTADOS.

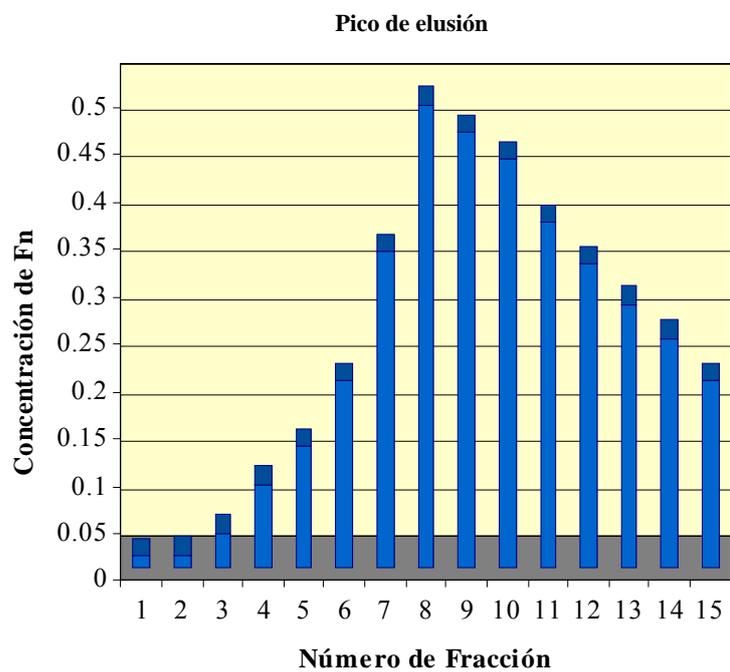
### PURIFICACIÓN DE F<sub>n</sub> OVINA.

La purificación de F<sub>n</sub> ovina se hizo por afinidad de la F<sub>n</sub> a la sefarosa acoplada a gelatina. Se obtuvieron fracciones, a las cuales se les determinó su D.O a 280nm. En la Tabla 1, se aprecia, el patrón de elusión de las muestras, en donde se puede apreciar que partir de la fracción 5 se comienza a obtener una buena concentración de proteína, teniendo su máximo pico, en la fracción 8. Estos resultados se aprecian en la Gráfica 1. La cuantificación de la F<sub>nop</sub> se realizó mediante el método de Bradford<sup>56</sup> y regresión lineal. Determinando así, que por cada 10µl de muestra analizada había 40µg de F<sub>nop</sub> en promedio.

**Tabla 2.** Fracciones obtenidas de la F<sub>nop</sub> a D.O de 280nm

Nº de tubo	D.O (280nm)
1	0.012
2	0.013
3	0.037
4	0.088
5	0.128
6	0.197
7	0.333
<b>8</b>	<b>0.489</b>
9	0.46
10	0.431
11	0.364
12	0.32
13	0.278
14	0.242
15	0.198

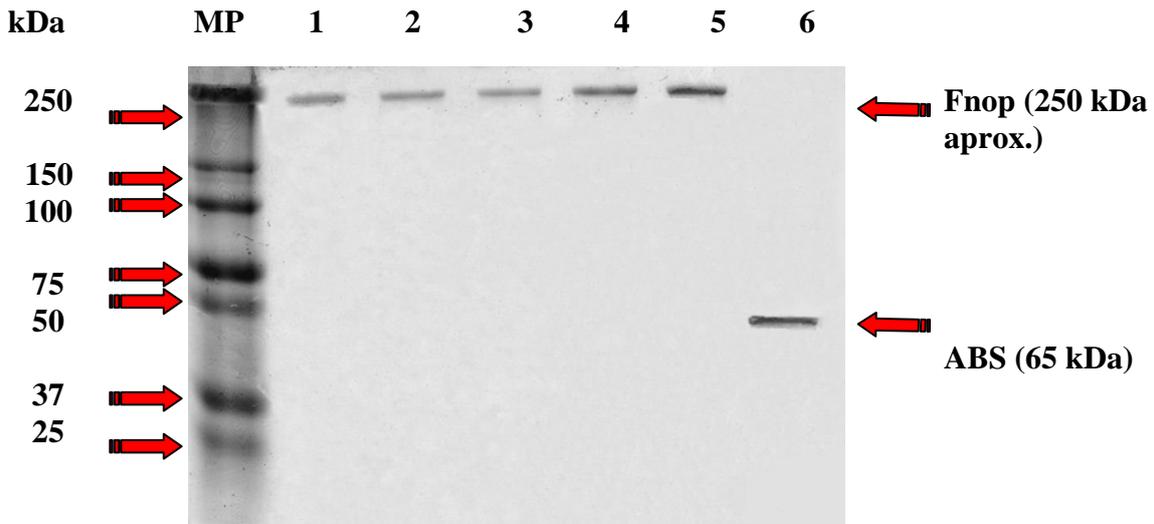
**Gráfica 1.** Fracciones obtenidas de Fnop a una D.O. de 280nm.



## SDS-PAGE.

Para determinar la presencia de Fnop, las fracciones con mayor concentración de Fnop se corrieron en SDS-PAGE al 7.5%, observando uno de los dímeros de la molécula de Fn plasmática, el cual tiene un peso aproximado de 250 kDa, lo cual corresponde con el primer marcador de peso molecular. (Figura 4).

**Figura 4.** SDS-PAGE al 7.5% teñido con Azul de Coomassie.



Marcadores de Peso Molecular (MP), Carril 1-5: Fnop, Carril 6 ABS. Sobre el gel de policrilamida se aprecian las bandas de Fnop sin residuos contaminantes, las cuales se encuentran a nivel del marcador de peso molecular más alto (250kDa). Se utilizó ABS como control de peso molecular (65kDa).

## DOT-BLOT.

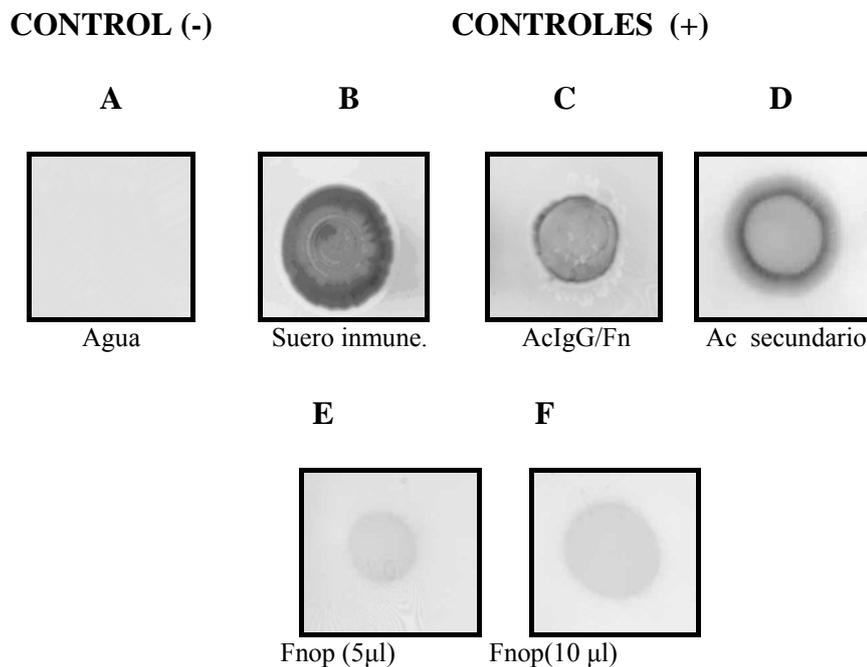
Con el fin de comprobar la especificidad y funcionalidad del AcIgG/Fn, se realizaron 3 ensayos de DOT-BLOT. En la Figura 5 se presentan los resultados del primer DOT-BLOT, en esta figura se aprecia que el agua (A) usada como control negativo no fue reconocida por ningún anticuerpo. El suero inmune (B) fue reconocido por el anticuerpo secundario, presentando mayor reconocimiento en comparación con las otras muestras usadas como controles positivos, debido a que este suero contiene una gran cantidad de anticuerpos y proteínas inespecíficas que fueron reconocidos por el Ac secundario. El AcIgG/Fn (C) fue reconocido por el Ac secundario debido a que este Ac es isoantígeno. El Ac secundario (D) presentó reacción debido a que éste está acoplado a peroxidasa de rábano y entra en contacto con la diaminobenzidina y la solución NICO. Finalmente, la Fnop (E y F) fue reconocida por el AcIgG/Fn tal y como se esperaba, sin embargo la reacción fue débil revelando que la inmunización de los conejos despertó una respuesta inmune baja, obteniendo títulos bajos de AcIgG/Fn.

Los resultados del segundo DOT-BLOT presentados en la Figura 6, muestran que el suero preinmune (A) fue reconocido por el Ac secundario, ya que este suero

contiene una gran cantidad anticuerpos y proteínas inespecíficas que son reconocidos por el Ac secundario, sin embargo este reconocimiento fue muy bajo por lo que no se consideró significativo. El AcIgG/Fn (B) y el suero inmune (C) fueron reconocidos por el Ac secundario debido a las mismas circunstancias mencionadas en el primer ensayo.

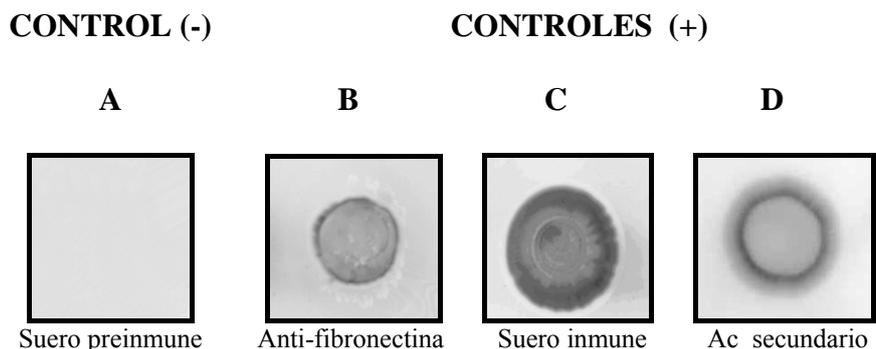
Finalmente los resultados del tercer DOT-BLOT, en el cual la membrana de nitrocelulosa se incubó con suero preinmune y con el Ac secundario son presentados en la Figura 7., en la cual se muestra que el suero preinmune no reconoció a la Fnop debido a que el suero no presentaba ningún Ac dirigido en contra de la Fnop. De la misma forma el Ac secundario no reconoció a la Fnop debido a que este es un Ac anti-conejo.

**Figura 5.** DOT-BLOT 1. Incubado con AcIgG/Fn y Ac secundario.



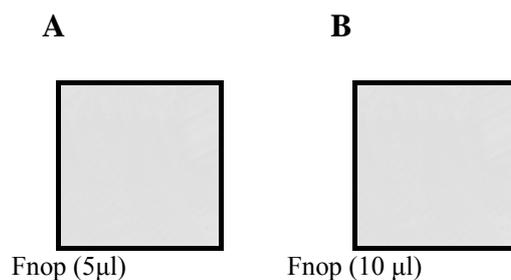
A: Agua usada como control negativo, B: Suero inmune reconocido por el Ac secundario. C: AcIgG/Fn reconocido por el Ac secundario. D: Ac secundario. E y F: Fnop reconocida por el AcIgG/Fn.

**Figura 6.** DOT-BLOT 2. Incubado con AcIgG/Fn y Ac secundario.



A: Suero preinmune usado como control negativo. B: AcIgG/Fn reconocidos por el Ac secundario. C: Suero inmune reconocido por el Ac secundario. D: Ac secundario.

**Figura 7.** DOT-BLOT 3. Incubado con Suero preinmune y Ac secundario.



A y B: Fnop no reconocida por el Suero preinmune y Ac secundario

## MICROSCOPIA CONFOCAL.

Para determinar la interacción entre la Fn y *M. haemolytica* A2 en la adhesión de esta a CBEO, se realizaron ensayos de adhesión, incubando *M. haemolytica* A2 con CBEO y ensayos de inhibición de adhesión usando AcIgG/Fn y Tripsina. Para realizar estos ensayos se emplearon bacterias teñidas con RITC (rojo) y FITC (verde), CBEO teñidas con RITC y FITC; AcIgG/Fn, Tripsina y Ac anti-conejo acoplado a CY5 (azul). Las muestras obtenidas de los ensayos se procesaron en laminillas para ser observadas en el microscopio confocal (Figura 8).

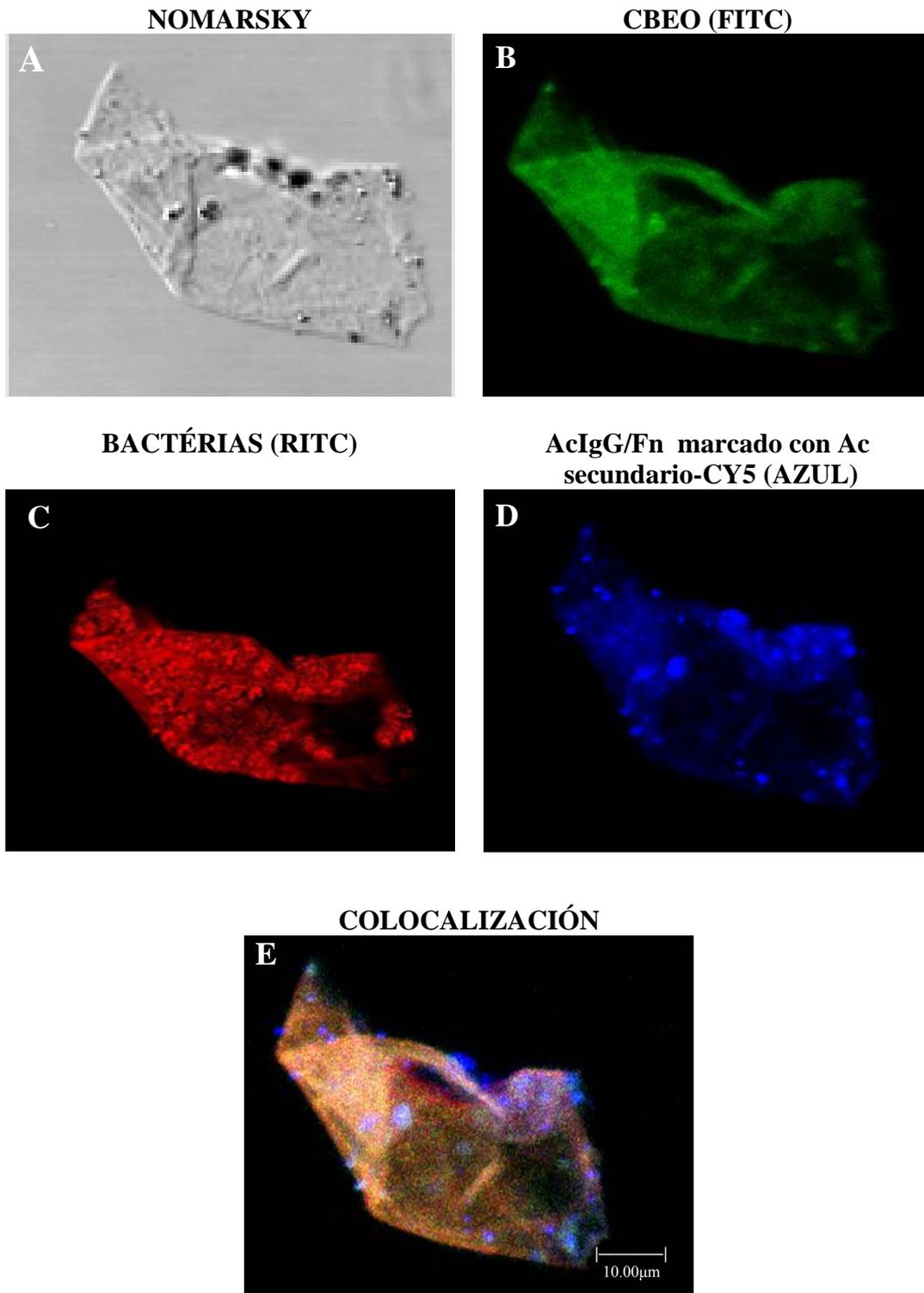
Los resultados obtenidos de los ensayos de adhesión se presentan en la Figura 8 y en la Figura 9. En estos ensayos, las bacterias mostraron cierta interacción con la Fn para adherirse a la superficie celular de las CBEO, esta interacción se evidenció por las colocalizaciones observadas en tono violeta en las superficies celulares.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la adhesión incubando previamente las CBEO con AcIgG/Fn se presentan en la Figura 10. En este ensayo no se observaron colocalizaciones en la superficie celular de las CBEO ya que

probablemente, el AcIgG/Fn ocupó los sitios de unión de la Fn en las superficies celulares, bloqueando así, la interacción de la proteína sobre las CBEO y las bacterias.

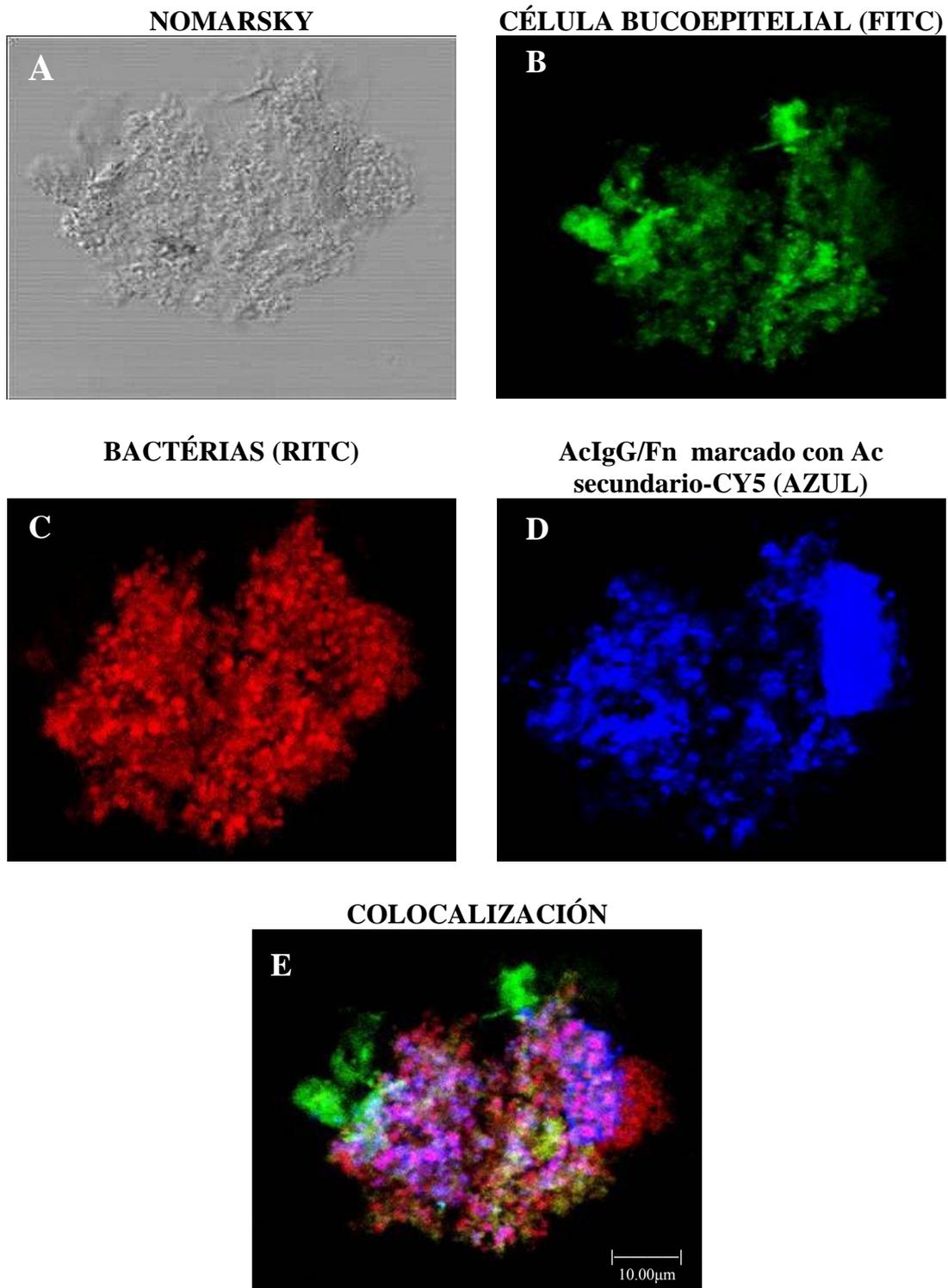
Finalmente, los resultados de los ensayos de inhibición de la adhesión incubando previamente CBEO con tripsina, se presentan en la Figura 11, en la cual no se observan colocalizaciones en la superficie celular de las CBEO, ya que la tripsina barrió parcialmente con las proteínas de la matriz extracelular, y por lo tanto, la Fn de las superficies celulares fue eliminada en parte, bloqueándose así, la interacción de la proteína sobre las CBEO y las bacterias.

**Figura 8.** Microscopía Confocal. Proceso de tinción CBEO, *M. haemolytica* A2, AcIgG/Fn.



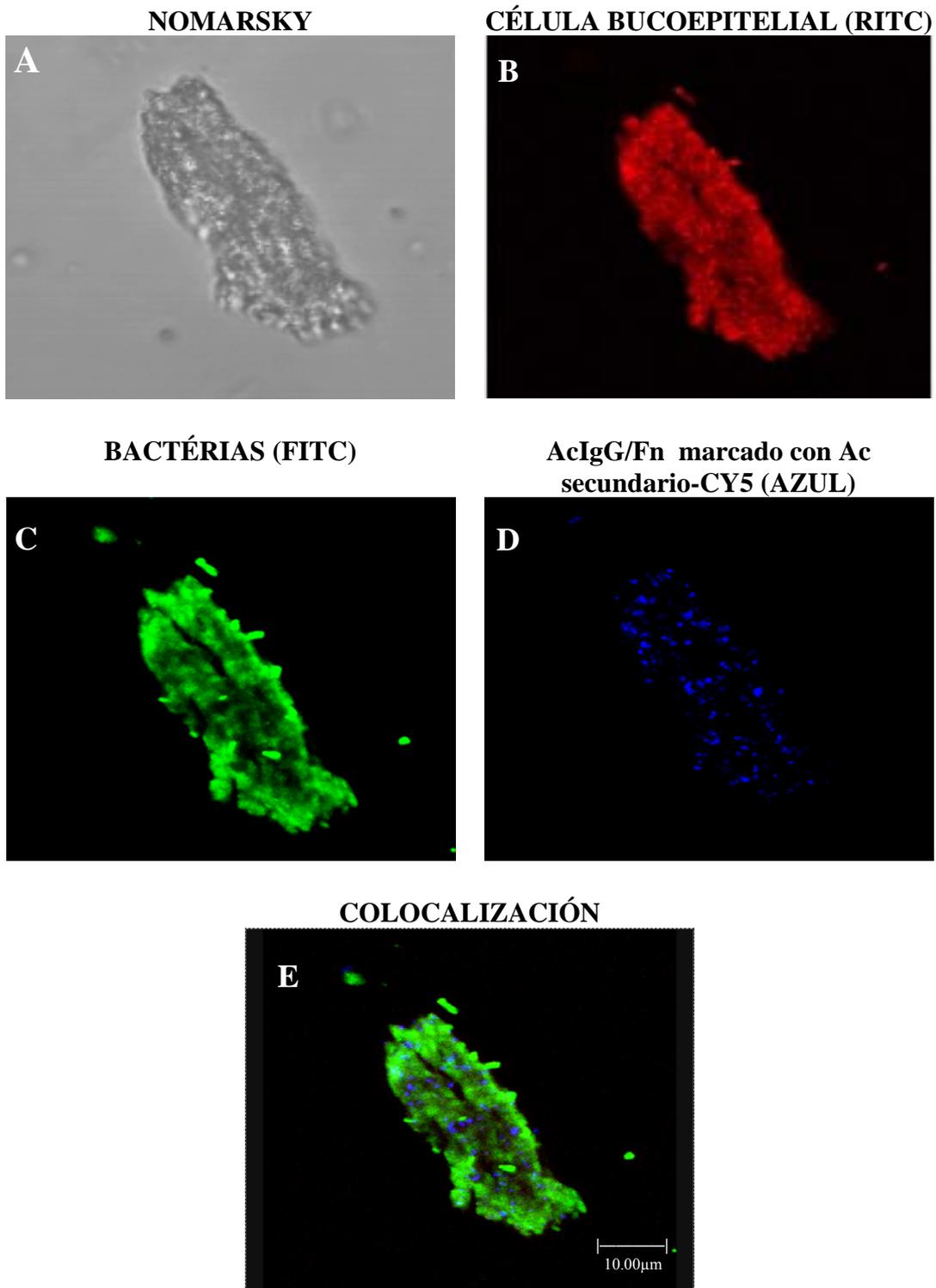
**Microscopía Confocal.** **A:** CBEO en la que se aprecian focos localizados de bacterias adheridas a la superficie celular. **B:** CBEO teñida con FITC (verde). **C:** *M. haemolytica* A2 teñidas con RITC (rojo). **D:** AcIgG/Fn marcado con Ac secundario-CY5 adherido a la Fn de la superficie celular (azul). **E:** Colocalización de la CBEO, *M. haemolytica* A2 y Fn. En esta imagen se observan múltiples colocalizaciones en la superficie de la CBEO en las que interactúan la CBEO, Bacterias y Fibronectina (violeta). |——| 10.00µm.

**Figura 9.** Microscopía Confocal. Interacción de *M. haemolytica* A2 con Fn y CBEO.



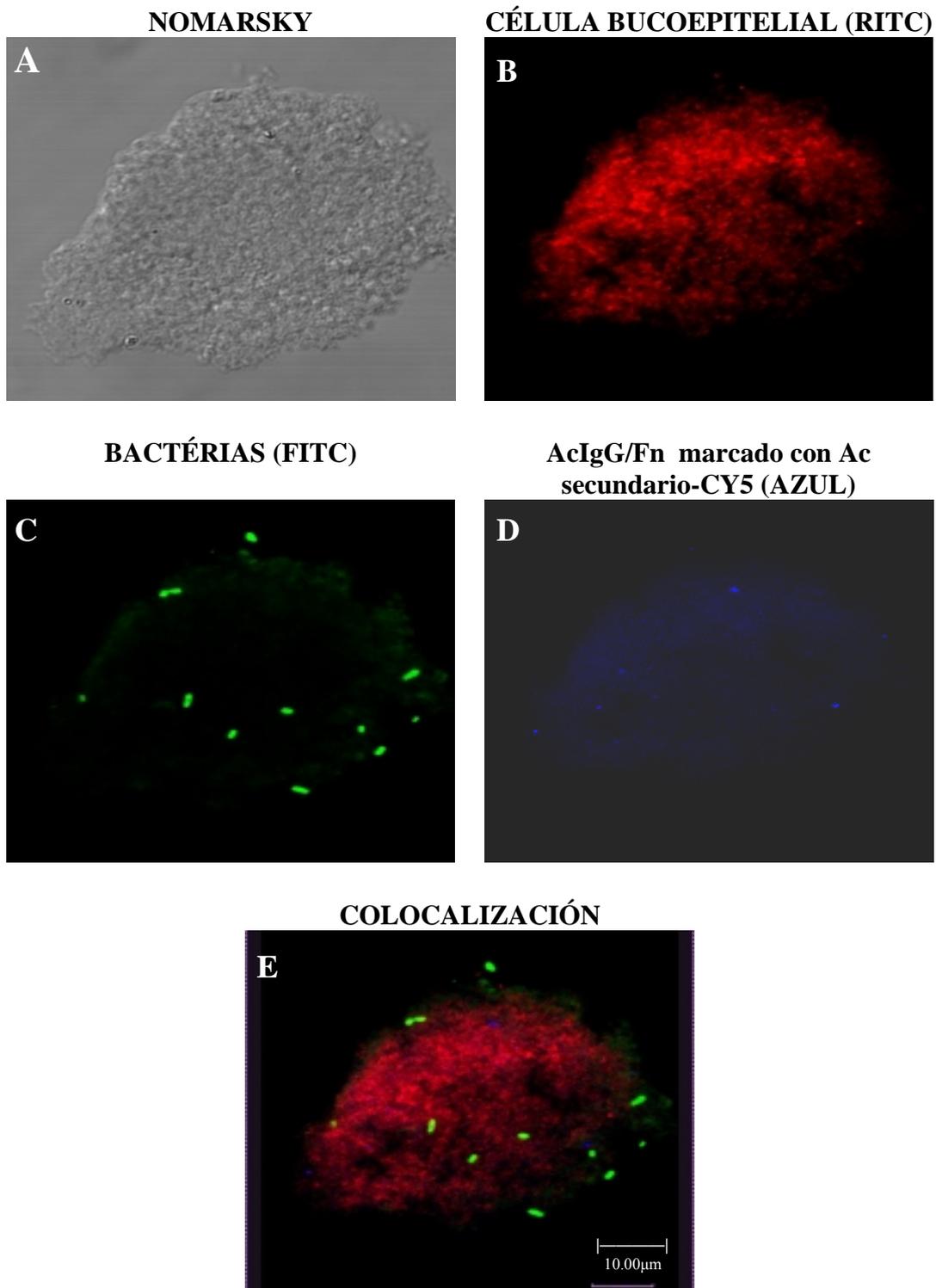
**Microscopía Confocal.** **A:** CBEO en la que se aprecian focos localizados de bacterias adheridas a la superficie celular. **B:** CBEO teñida con FITC (verde). **C:** *M. haemolytica* A2, teñidas con RITC (rojo). **D:** AcIgG/Fn marcado con Ac secundario-CY5 adherido a la Fn de la superficie celular (azul). **E:** Colocalización de la CBEO, *M. haemolytica* A2 y Fn. En esta imagen se observan múltiples colocalizaciones en la superficie de la CBEO en las que interactúan la CBEO, Bacterias y Fibronectina (violeta). |——| 10.00µm.

**Figura 10.** Microscopía Confocal. Inhibición de la adhesión con AcIgG/Fn



**Microscopía Confocal.** **A:** CBE0. **B:** CBE0 teñida con RITC (rojo). **C:** *M. haemolytica* A2 teñidas con FITC (verde). **D:** AcIgG/Fn marcado con Ac secundario-CY5 adherido a la Fn de la superficie celular (azul). **E:** Colocalización de la CBE0, *M. haemolytica* A2 y Fn con incubación previa con AcIgG/Fn. En esta imagen no se observan focos de colocalización, sin embargo, se aprecian algunos cuerpos bacterianos a la periferia de la célula, lo cual sugiere el bloqueo de la interacción de la Fn sobre la CBE0 y la bacteria, debido a que probablemente el AcIgG/Fn ocupó los sitios de unión en la Fn de las superficies celulares. |——| 10.00µm

**Figura 11.** Microscopía Confocal de los ensayos de inhibición de la adhesión con tripsina.



**Microscopía Confocal.** A: CBEO. B: CBEO teñida con RITC (rojo). C: *M. haemolytica* A2 teñidas con FITC (verde). D: AcIgG/Fn marcado con Ac secundario-CY5 adherido a la Fn de la superficie celular (azul) posterior a la incubación con tripsina. E: Colocalización de la CBEO, *M. haemolytica* A2 y Fn con incubación previa con tripsina. En esta imagen no se observan focos de colocalización, sin embargo, se aprecian algunos cuerpos bacterianos a la periferia de la célula, lo cual sugiere el bloqueo de la interacción de la Fn sobre la CBEO y la bacteria, debido a que la tripsina barrió a la Fn de las superficies celulares. |——| 10.00µm

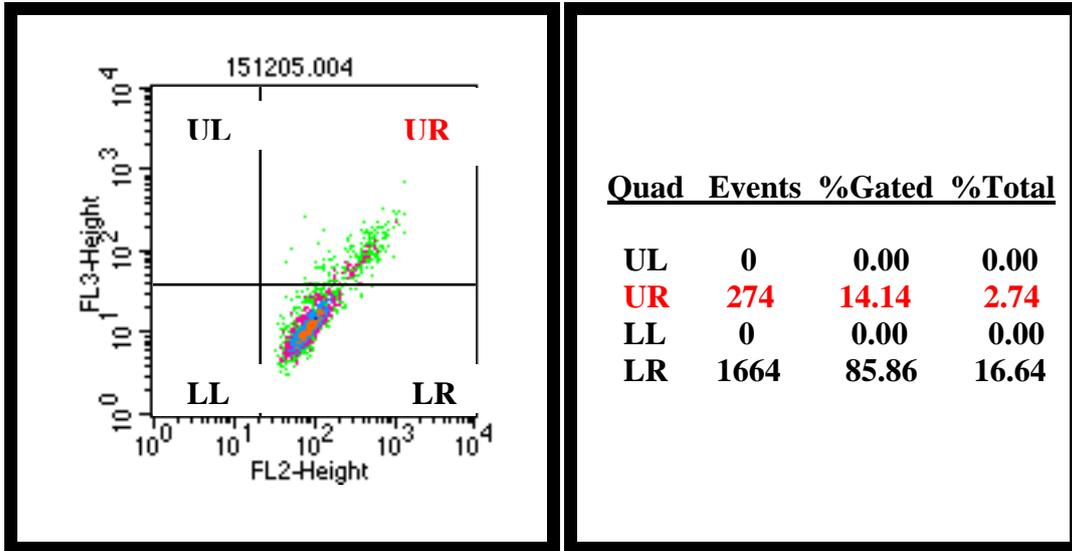
## **CITOMETRÍA DE FLUJO.**

En la Gráfica 2 se muestra la lectura que el citómetro realizó, para determinar el porcentaje de CBEO que presentan colocalización con Fn. Es decir, las células teñidas de rojo, evidenciado la molécula de Fn en verde sobre su superficie. El eje “Y” representa el canal de lectura para la Fn y el eje “X” representa el canal de lectura para las CBEO. Las células que se encuentran en el cuadrante superior derecho (UR) representan las CBEO que presentan doble marcaje, es decir son células que se tiñeron de rojo y sobre de ellas se localiza la proteína de Fn marcada de verde, determinándose que de 1938 células analizadas, 274 células presentaron doble marcaje, lo cual indica que del 100 % de células teñidas de rojo (RITC), el 14.14% de éstas, presentaron Fn teñida de verde (FITC) en su superficie celular.

En la Gráfica 3 se muestra la lectura que el citómetro realizó, para determinar el porcentaje de bacterias que presentan colocalización con la Fn de las superficies celulares. El eje “Y” representa el canal de lectura para Fn y el eje “X” representa el canal de lectura para las bacterias. Las bacterias que se encuentran en el cuadrante superior derecho (UR) representan las bacterias que interactúan con Fn en la adhesión bacteriana. Es decir, las bacterias marcadas en azul (CY5) que se encuentran adheridas a las células por medio de la Fn de las superficies celulares, determinándose que de un total de 1936 células analizadas, con Fn marcada en su superficie, 293 células presentaron adhesión bacteriana, lo cual representó el 15.12% del total de células analizadas.

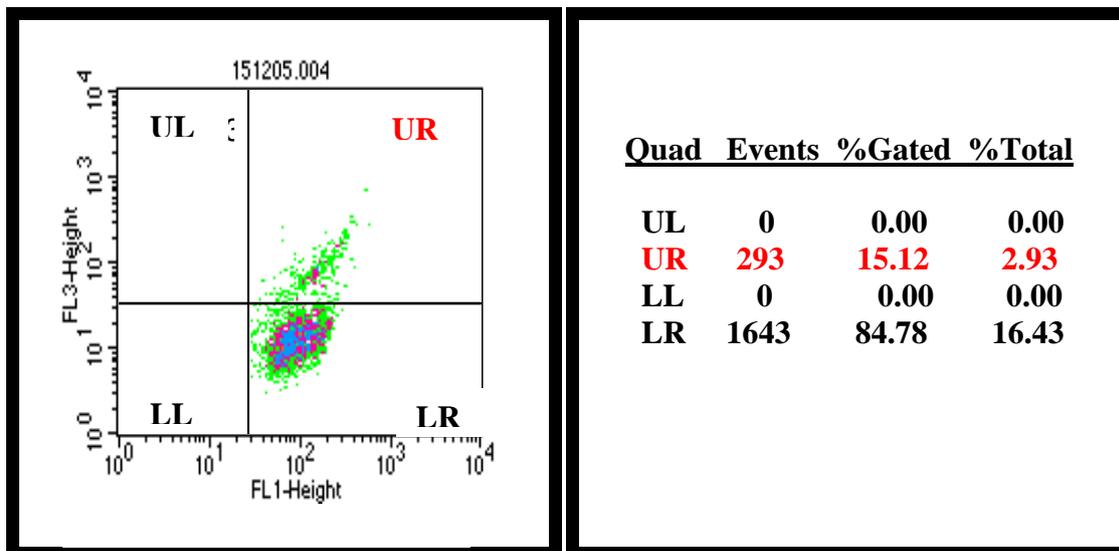
Finalmente, se obtuvo el promedio de células que presentaron bacterias adheridas por medio de Fn en sus superficies. De un total de 1937 CBEO analizadas (100%), se obtuvo un promedio de 284 CBEO (14.63%) que adhieren bacterias a través de Fn en su superficie.

**GRAFICA 2.** Porcentaje de CBEO que presentan colocalización con Fn.



Representación gráfica del porcentaje de CBEO teñidas con RITC que presentan colocalización con Fn teñida con FITC, analizadas mediante Citometría de flujo. El eje “Y” representa el canal de lectura para la Fn y el eje “X” representa el canal de lectura para las células. El cuadrante superior derecho (UR) representa las células que presentan doble marcaje (células teñidas de rojo evidenciando la Fn teñida de verde en su superficie), las cuales representan el 14.14% del un total de 1938 células analizadas que corresponde al 100%.

**GRAFICA 3.** Porcentaje de Bacterias que presentan colocalización con Fn de la superficie celular.



Representación gráfica del porcentaje de *M. haemolytica* A2 teñidas con CY5 que presentan colocalización con la Fn de las superficies celulares teñida con FITC, analizadas mediante citometría de flujo. El eje “Y” representa el canal de lectura para la Fn de las superficies celulares y el eje “X” representa el canal de lectura para las bacterias. El cuadrante superior derecho (UR) representa las CBEO que presentan doble marcaje (Fn en la superficie celular teñida de verde unida a las bacterias teñidas de azul), las cuales representan el 15.12% de un total de 1936 células analizadas que corresponden al 100%.

## VIII. DISCUSIÓN.

La adhesión bacteriana a las células del hospedero es uno de los primeros pasos que se dan en el proceso de infección. Esta adhesión dota a las bacterias de la capacidad de resistir mecanismos de eliminación, además de que la asociación les permite expresar factores de virulencia que afectan a tejidos y células <sup>63</sup>.

La adhesión de algunos organismos patógenos a la Fn en las superficies celulares se ha descrito en bacterias <sup>31,32</sup>, parásitos <sup>33</sup> y hongos <sup>34</sup>. El reconocimiento de ésta y de los sitios de adhesión celular puede ser el primer paso para su posterior migración e invasión a los tejidos <sup>35</sup>.

Sin embargo, se ha descubierto que algunos organismos patógenos, principalmente bacterias Gram (-), necesitan de la degradación de Fn en la MEC para poder adherirse a sus células blanco. Woods D. E; y col. en 1981 <sup>64</sup> reportaron que la adherencia de bacterias Gram (-) es mayor en células pobres en Fn en comparación con aquellas que presentan mayor cantidad de la misma. Por otro lado, en trabajos realizados por Abraham S. N; y col. en 1983 <sup>65</sup>, donde se evaluó la adhesión de *S. pyogenes*, *E. coli*, y *P. aeruginosa* a CBE de humano, se determinó que la adhesión de *E. coli*, y *P. aeruginosa* era inhibida en células con gran cantidad de Fn en su superficie celular, mientras que en *S. pyogenes* la adhesión aumentaba.

En el presente trabajo se evaluó la participación de Fn ovina purificada en la adhesión de *M. haemolytica* A2 a células bucoepiteliales de ovino (CBEO). Dejando por entendido, que la CBE, no es la célula blanco de la bacteria. Pero sí podrían participar en la permanencia de la misma en vías respiratorias superiores, favoreciendo así, su condición de comensal.

Los resultados obtenidos en la microscopía confocal revelaron múltiples colocalizaciones en las superficies celulares entre Fn y las bacterias. Lo cual indica la posible presencia de un receptor específico de *M. haemolytica* A2 a alguno de los módulos de Fn que se encuentra en la MEC de las CBEO.

Sin embargo, la cantidad de Fn que pudiera existir entre las células alveolares del pulmón y las CBE, podría variar considerablemente. Por lo que posiblemente a nivel del tracto respiratorio bajo, los componentes de adhesión entre la bacteria y su célula blanco (N-1) sean de otra índole. Estudios realizados por Franklin A.L, y col. en 1987 <sup>66</sup>, donde se evaluó la adhesión de *P. aeruginosa* a células traqueales de humano, se determinó que el número, distribución y naturaleza de los sitios de adhesión de la bacteria, eran diferentes entre las células traqueales y los sitios de unión en las CBE estudiados en trabajos previos. Dicha situación, nos hace pensar que *M. haemolytica*, una vez que alcanza el tracto respiratorio bajo, hecha mano de sus múltiples antígenos para adherirse a la célula alveolar; sin dejar de tomar en cuenta la posible interacción de algún componente de la MEC en la membrana celular del N-1 y la bacteria.

Se debe resaltar que los resultados de microscopía confocal revelaron, que a la inspección de los diferentes campos, las células mostraban patrones variables de colocalización entre la Fn y las bacterias. Zetter, B. R; y col. en 1979 <sup>67</sup>, realizaron trabajos con CBE de humano y demostraron que la cantidad de Fn es variable entre cada CBE. En tanto que, los trabajos realizados por Abraham S. N; y col. en 1983,

corroboraron los resultados presentados por Zetter, B. R; y col., además, revelaron que la distribución de la Fn en la superficie celular de las CBE, es en forma de parches. Esto podría explicar, la distribución de las colocalizaciones observadas entre *M. haemolytica* A2 y la Fn.

Por otro lado, tanto en los resultados de los ensayos de inhibición de la adhesión por competencia entre AcIgG/Fn y la bacteria, así como en los ensayos realizados utilizando tripsina, no se observaron colocalizaciones en las superficies celulares. Sin embargo, las imágenes muestran algunos cuerpos bacterianos a la periferia de la célula. Lo cual indica que bloquear los posibles sitios de unión con el AcIgG/Fn así como barrer parcialmente con la MEC mediante tripsina inhibe parcialmente los componentes de adhesión que se encuentran sobre la CBE, principalmente Fn, que podrían interactuar en este caso con *M. haemolytica* A2.

En los trabajos realizados por Woods, D.E., y col. en 1981 se describió el efecto de la tripsina en CBE de humano, revelando que el componente más alterado de la MEC, era la Fn. Konkel, M. E.; y col. en 1997, descubrieron que el tratamiento previo con tripsina inhibe la adhesión de *C. jejuni* en humanos. De la misma forma Hamer R. C.; y col. en 2004, realizaron ensayos de inhibición de la adhesión en *A. pleuropneumoniae* usando un modelo de CBE de porcino con tripsina obteniendo el mismo resultado expuesto en los trabajos de Konkel, M. E.; Es importante recalcar, que la inhibición observada en el ensayo de Hamer, no se presentó en un 100%.

En nuestro trabajo, se obtuvieron resultados similares, lo cual pudo deberse, a que la bacteria interactúa con algún otro componente de la membrana celular directamente, o bien, que exista algún tipo de atracción electrostática entre la célula y la bacteria una vez que se ha barrido con la MEC, dejando expuestos posibles sitios de unión, entre *M. haemolytica* A2 y la CBE, haciendo que éstas permanezcan a la periferia de las células. Como sucede en la mayoría de las Gram (-). Si bien, en las imágenes de confocal no se aprecia una inhibición de la adhesión al 100%, si hay una disminución considerable de este efecto sobre de las células observadas (95%).

En otros casos, algunos géneros bacterianos, requieren del barrido total de la MEC, para adherirse directamente a algún componente de la membrana celular, tal y como lo demuestran nuevamente los trabajos de [Franklin A. L.](#); y col. en 1987, en donde realizaron ensayos de adhesión de *P. aeurogenosa* a células traqueales de humano usando tripsina. Los resultados obtenidos demostraron que la eliminación de la Fn localizada en la MEC de las células traqueales promovió la adhesión de esta bacteria. Este podría ser el caso de *M. haemolytica* A2, una vez que se han incubado por cierto tiempo con las células que han perdido su MEC. Esto a su vez, podría estar sucediendo a nivel pulmonar, una vez que la bacteria llega a la unión bronquioalveolar, sitio donde se origina la lesión pulmonar.

Los antecedentes descritos en trabajos previos, así como los resultados observados en este trabajo, en relación a los ensayos de adhesión e inhibición de la adhesión, permiten pensar que la adhesión de *M. haemolytica* A2 a las CBEO se favorece con la presencia de Fn que se encuentra en la MEC, pero su presencia (Fn) en este lugar no es contundente, para la adhesión de la bacteria en vías respiratorias superiores y por lo tanto para el desarrollo de la enfermedad.

Por otro lado, el análisis de la citometría de flujo, mostró que solo el 14.65% (284 células) de CBEO analizadas, de un total de 1937 correspondió a células que presentaron Fn en su superficie y además que adhirieron bacterias. Esta variación se debe en gran parte a la cantidad de Fn distribuida en cada célula observada, la cual varía entre célula y célula, dadas las características en cuanto al patrón de distribución que tiene la Fn en su superficie, así como lo heterogéneo de la muestra al momento de llevarse a cabo la colección de la misma. Las principales células que se arrastran son las más superficiales, pero no se puede descartar la presencia de células de estratos más profundos. Debemos considerar también los lavados a los que se someten las células, durante las metodologías desarrolladas, pudiendo ser éste, otro de los factores que favorecen esta variación, lo cual explica la cantidad de bacterias que se adhirieron a la Fn sobre las células.

No podemos dejar de considerar a la Fn como una opción viable para la bacteria que la utiliza como componente de adhesión, asegurando así, su permanencia como comensal en vías respiratorias superiores y una vez que se crean las condiciones adecuadas para el desarrollo de la enfermedad, *Mannheimia haemolytica* A2 echa mano de sus múltiples antígenos, para seguir avanzando hasta el pulmón, permaneciendo y colonizando éste órgano, hasta culminar en el desarrollo de la enfermedad.

## IX. CONCLUSIÓN.

Son numerosas las investigaciones que apoyan la importancia de la adhesión de los microorganismos patógenos a sus células blanco, así como los mecanismos mediante los cuales éstos, aseguran su permanencia en el huésped, valiéndose de sus múltiples antígenos e interactuando con moléculas presentes en las superficies celulares, siendo la adhesión el paso inicial para su permanencia y posterior colonización de los tejidos del huésped.

- *Mannheimia haemolytica* A2 se adhiere a fibronectina (Fn) de la matriz extracelular (MEC), de células bucoepiteliales de ovino (CBEO), la cual se distribuye multifocalmente en la superficie de las mismas.
- Bloquear los posibles sitios de unión con el AcIgG/Fn así como barrer parcialmente con la matriz extracelular (MEC) mediante tripsina inhibe parcialmente los posibles componentes de adhesión entre *Mannheimia haemolytica* A2 y fibronectina (Fn).
- *Mannheimia haemolytica* A2 tiene un receptor específico a fibronectina (Fn) de la matriz extracelular (MEC) de las células bucoepiteliales de ovino (CBEO).
- La cantidad de fibronectina (Fn) contenida en la matriz extracelular de cada célula bucoepitelial de ovino (CBEO) de ovino es muy variable y más aún entre las diferentes células que se arrastran durante la colección de la muestra, influyendo esto, de manera directa, en la cantidad de bacterias que se adhieren a las mismas.
- *Mannheimia haemolytica* A2. utiliza otros componentes de su batería de antígenos, para adherirse a diferentes receptores localizados en la membrana celular además de la fibronectina (Fn) contenida en la matriz extracelular (MEC).
- La presencia de fibronectina (Fn) que se encuentra en la matriz extracelular (MEC) de las células bucoepiteliales de ovino (CBEO), podría asegurar la permanencia de *Mannheimia haemolytica* A2 como comensal a nivel de cavidad oral.
- La adhesión de *Mannheimia haemolytica* A2 a las células bucoepiteliales (CBEO) se favorece con la presencia de fibronectina (Fn) que se encuentra en la matriz extracelular (MEC), pero ésta, no es del todo contundente.

Establecer los mecanismos mediante los cuales *Mannheimia haemolytica* A2 se adhiere a las células epiteliales del huésped, podría en un futuro determinar el mecanismo por el cual la bacteria permanece en el mismo, como comensal de vías respiratorias superiores o bien como patógeno del pulmón. De tal manera que cuando se presenten las condiciones adecuadas para su invasión, pueda proliferar, desencadenando la enfermedad. El conocimiento de los mecanismos mediante los cuales logra esta adhesión podría en un futuro desempeñar un papel importante para el

desarrollo de nuevos biológicos que prevengan y controlen la Pasterelosis Neumónica en nuestro país.

## **X. BIBLIOGRAFIA.**

- 1.- Mercado E., Rosado A.; 1994. Moléculas de adhesión celular. *Ciencia*. 45:339-358.
- 2.- Adams J. C., Watt F. M.; 1993. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*. 117:1183-1198.
- 3.- Mosher D. F., J. Sottile, C. Wu. y McDonald J. A.; 1992. Assembly of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 810-818.
- 4.- Kreis T. y Vale R.; 1993. Guide book to the extracellular matrix and adhesion proteins. Oxford University Press. 176.
- 5.- Patti J. M., Allen B. L., Mc Gavin M. J., Höök M.; 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganism to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:585-617.
- 6.- Isberg R. R., Van Nhieu G. T.; 1994. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends. Microbiol.* 2:10-14.
- 7.- Ruoslahti E., Pierschbacher M. D.; 1986. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell*. 44(4):517-8.
- 8.- Chen Y. P., O'Toole T. E., Shipley T., Forsyth J., LaFlamme S. E., Yamada K. M., Shattil S, J., Ginsberg M. H.; 1994 "Inside-out" signal transduction inhibited by isolated integrin cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* 269(28):18307-10.
- 9.- Hynes R. O.; 1987. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell*. 48:549-554.
- 10.- Hall H. G., Farson, D. A. and Bissell, M. J.; 1982. Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay: a morphogenetic model in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79: 4672-4678.
- 11.- Wayner E. A., Garcia-Pardo, A., Humphries, M. J., McDonald, J. A. and Carter, W.G.; 1989. Identification and characterisation of the lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain in plasma fibronectin. *J. Cell Biol.* 109:1321-1330.
- 12.- Guan J. L. and Hynes, R.O.; 1990. Lymphoid cells recognise an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor  $\alpha 4\beta 1$ . *Cell*. 60:53-61
- 13.- Ruoslahti E. and Pierschbacher, M. D.; 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238:491-497.
- 14.- Hynes R. O.; 1990. "Fibronectins". Springer-Verlag Series in Molecular Biology, Springer-Verlag Inc, New York. 113-175
- 15.- Mosher D. F (ed); 1989. "Fibronectin" Academic Press, New York. 123-137
- 16.- Yamada K.; 1983. Cell surface interactions with extracellular materials. *Ann. Rev. Biochem.* 52:761-799.

- 17.- Pesciotta D. y Mosher D.;1994. Formation of fibronectin extracellular matrix. in: Extracellular matrix assembly and Structure. Academic Press. 315-350.
- 18.- Litvinov R. L. y Zubairov D. M.;1988. Effect of fibronectin on fibrinogen conversión into fibrin. *Biokhimiya*. 53:1203-1213.
- 19.- Schwarz bauner J. E.; 1991. alternative splicing of fibronectin: three variants, three functions. *Bioessays*. 13:527-533
- 20.- Piersh bacher, M. D. and Rouslahti. E.; 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicate by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*. 309:30-31
- 21.- Yamada K. M. and Kennedy, D. W.; 1984. Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function. *J. Cell Biol.* 99:29-36
- 22.- Peer B. and Russell F. D.; 1992. Proposed adcquisition of an animal protein domain by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 89:990-8994
- 23.- Campbell I. D. y Spitzfaden C.;1994. Building proteins with fibronectin type III modules. *Structure*. 2:333-337.
- 24.- Hynes R. O.; 1992. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69:11-25.
- 25.- Dufour S., Duband, J. L., Humphries, M. J., Obara. M., Yamada K.M., and Thiery, J.P.; 1988. Attachment, spreading and locomotion avian neural crest cells are mediated by multiple adhesion sites on fibronectin molecules. *EMBO J.*7: 2661-2671.
- 26.- Aota, S., Nomizu, M., and Yamada, K.M.; 1994. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J. Biol. Chem.* 269:24756-24761.
- 27.- Nagai T., Yamakawa N., Aota S., Yamada S. S., Akiyama S. K., Olden K., and Yamada K. M.; 1991. Monoclonal antibody characterization of two distant sites required for function of the central cell-binding domain of fibronectin in cell adhesion, cell migration and matrix assembly. *J. Cell Biol.* 114:1295-1306.
- 28- Humphries M. J., Akiyama S. A., Komoriya A, Olden K., and Yamada. K. M.; 1987. Neurite extension of chicken peripheral nervous system neurons on fibronectin: relative importance of specific adhesion sites in the central cell-binding domain and the alternatively-spliced type III connecting segment. *J. Cell Biol.* 106:1289-1297.
- 29.- Mould A. P. and Humphries M. J.; 1991. Identification of a novel recognition sequence for the integrin  $\alpha_4\beta_1$  in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *EMBO. J.* 10:4089-4095.

- 30.- Guan J. L., and Hynes R. O.; 1990. Lymphoid cells recognize an alternatively-spliced segment of fibronectin via the receptor  $\alpha_4\beta_1$ . *Cell*. 60:53-60.
- 31.- Sottile J., Schwaebbauer J., Selegue J., Mosher D. F.; 1991. Five type I modules of fibronectin form a functional unit that binds to fibroblasts and *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 266:12840-12843.
- 32.- Konkel M. E., Garbis S. G., Tipton S.L., Anderson D. E. Cieplak W. R.; 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* 24:953-963.
- 33.- Giron J. A., Lange M., Baseman J. B.; 1996. Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infect. Immun.* 64:197-208.
- 34.- Marcantonio E. E. y Hynes R. O.; 1988. Antibodies to the conserved cytoplasmic domain of the integrin beta1 subunit react with proteins in vertebrates, invertebrates and fungi. *J. Cell Biol.* 106:1765-1772.
- 35.- Talamas-Rohana P. y Meza I.; 1988. Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: Substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. *J. Cell Biol.* 106:1787-1794.
- 36.- Woods D. E., Straus D. C., Johanson W. G.; 1983. Factors influencing the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. *Rev. Infect. Dis.* 5:846-851.
- 37.- Foster T. J., Höök M.; 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6:484-488.
- 38- Schwarz-Linek U., Höök M., Potts J. R.; 2004. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol. Microbiol.* 52(3):631-641
- 39.- Rubiere-Huët J., Di Martino P., Hulen C.; 2004. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to fibronectin by PA-IL and monosaccharides: involvement of a lectin-like process. *Can J. Microbiol.* 50:305-312.
- 40.- Palmqvist N., Foster T., Fitzgerald J. R., Josefsson E., Tarkowski A.; 2005. Fibronectin-binding protein and fibrinogen-binding coupling factors play distinct roles in Staphylococcal arthritis and systemic inflammation. *J. Infect Dis.* 191(1):791-798.
- 41.- Ofek I., Kahane I., Sharon N.; 1996. Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. *Trends Microbiol.* 8:297-299
- 42.- Menzies, B. E., Kourteva, Y., Kaiser, A. B., and Kernodle, D. S.; 2002. Inhibition of staphylococcal wound infection and potentiation of antibiotic prophylaxis by a recombinant fragment of the fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect Dis.* 185:937-943.

- 43.- Fowler T., Wann E. R., Joh D., Johansson S, Foster T. J., Höök M.; 2000. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell  $\beta$ 1 integrins. *Eur J Cell Biol.* 79:672-679.
- 44.- Schorey J. S., Holsti M. A., Ratliff T. L., Allen P. M., Brown E. J.; 1996. Characterization of the fibronectin-attachment protein of *Mycobacterium avium* reveals a fibronectin-binding motif conserved among mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 21:321-329.
- 45.- House-Pompeo K., Xu Y., Jhon D., Speziale P., Höök M.;1996. Conformational Changes in the fibronectina binding MSCRAMMS are induced by ligand binding J. *Biol. Chem.* 271:1379-1384.
- 46.- Adlam, C.;1992. The structure, function and properties of cellular and extracellular components of *P. haemolytica*. In C. Adlam and J. Adlam and JI. Rutter (eds) *Pasteurella and pasteurellosis*. Academic Press, London 75-92.
- 47.- Younan, M., Fodor, L.; 1995. Characterization of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). *Res. Vet. Sci.* 58:98.
- 48.- Angen, Q., Quirie, M., Donachie, W., Bisgaard, M.; 1999. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Vet. Microbiol.* 65:283-290.
- 49.- Sneath, P. H. A., Stevens, M.; 1990. *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev. *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:141-153.
- 50.- Gilmour, N. J. L., Gilmour, J. S.; 1989. Pasteurellosis of Sheep. In: Adlam, C.F., Rutter, J.M., Eds. *Pasteurella and Pasteurellosis*. Academic Press, London. 223-262.
- 51.- Gilmour, N. J. L., Angus, K. W., Gilmour, J. S.; 1991. Pasteurellosis. In: Martin, W.B., Aitken, I.D. (Eds.), *Diseases of Sheep*. Blackwell, Oxford. 133-139.
- 52.- Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC.; 2002. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol.* 84:337-356.
- 53.- Davies R. L., Baillie S.; 2003. Citotoxic activity of *Mannheimia haemolytica* strains in relation to diversity of the leukotoxin structural gene lktA. *Vet Microbiol.* 92:263-279.
- 54.- Smith, R. A., Tabatabai, L. B., 2003. Fibronectin-Binding Activity And In Vitro Differential Expression Of *Mannheimia haemolytica* Immunoglobulin-Binding Protein. *The FASEB Journal*. V. 17. Abstract #632.8.
- 55.- Valdez P. J. C.; y Rodríguez R. I.; 1999. Manual de prácticas de Laboratorio Clínico. Segunda edición, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. México. pp 3-9.

- 56.- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. *Anal Biochemistry*. 72:248-254.
- 57.- Laemmli W. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- 58.- Hamer R. C., Godínez D., Enríquez V. and de la Garza, M.; 2004. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin. *Can J Vet Res*. 68(1): 33–41.
- 59.- Ey P. L., Prowse S. J., and Jenkin C. R.; 1978. Isolation of pure IgG, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry*. 16:329-439.
- 60.- Jarosik G. P y Lanod C. B.; 2000. Identification of a human lactoferrin-binding protein in *Gardnerella vaginalis*. *J. Infect. Immun*. 68:3443-3447.
- 61.- Stapleton, A. E., Fennell, C. L., Coder, D. M., Wobbe, C. L., Roberts, P. L. y Stamm, W. E.; 2002. Precise and rapid assessment of *Escherichia coli* adherence to vaginal epithelial cells by flow cytometry. *Cytometry* 50:31-37.
- 62.- González R. C.; 2002. Perfil serológico contra antígenos de *Mannheimia haemolytica* en corderos clínicamente enfermos de neumonía y desafiados experimentalmente. Tesis de Maestría, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. México.
- 63.- Beachey E. H.; 1981. Bacterial adherence: adhesin receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis*. 143:325-345.
- 64.- Woods D. E., Straus D. C., Johansson W. G., and Bass J. A.; 1981. Role of fibronectin in the prevention of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to buccal cells. *J. Infect. Dis*. 143:784-790.
- 65.- Abraham S. N., Beachey E. H., Simpson W. A.; 1983. Adherence of *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* to fibronectin-coated and uncoated epithelial cells. *Infect Immun*. 41(3):1261–1268.
- 66.- Franklin A. L., Todd T., Gurman G., Black D., Mankinen-Irvin P. M., Irvin R. T.; 1987. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to cilia of human tracheal epithelial cells. *Infect Immun*.; 55(6):1523-5.
- 67.- Zetter B. R., Daniels T. E., Cuadra-White, and Greenspan J. S.; 1979. LETS protein in normal and pathological human oral epithelium. *J. Dent. Res*. 58:484-488.

## **XI. ABREVIATURAS.**

**ABS:** Albúmina Sérica Bovina.

**Ac:** Anticuerpo.

**Ac/Fn:** Anticuerpo anti-fibronectina.

**AcIgG/Fn:** Anticuerpo IgG antifibronectina.

**Ac Secundario:** Anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano.

**CBE:** Célula Bucoepitelial.

**CBE0:** Célula Bucoepitelial de Ovino.

**CMSRMAM:** Componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la MEC.

**D.O:** Densidad Óptica.

**FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína.

**Fn:** Fibronectina.

**Fnop:** Fibronectina ovina purificada.

**I.M:** Vía de inoculación intramuscular.

**LDV:** Secuencia de aminoácidos conformada por Leucina-Ácido Aspártico-Valina.

**MEC:** Matriz Extracelular.

**M.O:** Vena Marginal de la Oreja.

**PMSF:** Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro.

**REDV:** Secuencia de aminoácidos conformada por Arginina-Ácido Glutámico-Ácido Aspártico-Valina.

**RGD:** Secuencia de aminoácidos conformada por Arginina-Glicina-Aspartato

**RITC:** Isotiocianato de Rodamina.

**S.C:** Vía de inoculación subcutánea.

**Suero inmune:** Suero obtenido de la inoculación de conejos con fibronectina ovina purificada.

**Suero preinmune:** Suero de conejo obtenido antes de la inmunización con fibronectina ovina purificada