



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

**“MICROVESICULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE
Actinobacillus seminis MUESTRAN ACTIVIDAD
PROTEOLITICA”**

ACTIVIDAD DE INVESTIGACION

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
ARTURO JIMENEZ PACHECO

ASESORES: DR. ENRIQUE SALAS TELLEZ
DRA. ALMA L. NUÑEZ DEL ARCO



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.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por darme fuerzas en esos momentos difíciles que se presentaron en mi vida y por darme otra oportunidad de lograr un sueño que se veía inalcanzables gracias Dios mío y gracias virgencita.

A MIS PADRES

Por todos esos momentos de felicidad, de tristeza y angustia que pasaron desde que me dieron vida y por darme la oportunidad de realizarme como profesionista.

A MI FAMILIA

ANGELICA, BENNY, KAREN Y ARTURO.

Por que son y serán lo más importante de mi vida. Son la fuerza para estar aquí y para seguir adelante con todas las ganas de seguir superándome día con día gracias.

Quisiera hacer una lista de personas a las cuales agradecería todo esto pero nunca acabaría por que son bastantes pero sobre todo son parte de mi vida solo te puedo decir que cuando recibas esta tesis sabrás lo importante que significas para mí muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores Enrique Salas Tellez, Alma L. Nuñez Del Arco por dedicarme el tiempo necesario para la realización de este trabajo.

A la FES-Cuautitlan por el tiempo de formación que recibí.

INDICE

INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	4
AISLAMIENTO DE MICROBESICULAS	4
MICROSCOPIA ELECTRONICA	5
ELECTROFORESIS Y ZIMOGRAMA	5
DETERMINACION DE LIPOPOLISACARIDO (LPS)	6
RESULTADOS	7
DISCUSION	9
FIGURAS	12
BIBLIOGRAFIA	15

Microvesículas de membrana externa de *Actinobacillus seminis* muestran actividad proteolítica.

Introducción

La epididimitis ovina es un proceso infeccioso que afecta a los carneros, esta enfermedad es contagiosa y progresiva de curso agudo o crónico, la inflamación del epidídimo puede dar como resultado degeneración testicular e infertilidad. Esta enfermedad tiene un impacto importante en la economía debido a los efectos desfavorables que ocasiona en la fertilidad del rebaño (Salas y col., 2004(#)).

Actinobacillus seminis y *Brucella ovis* son considerados los principales agentes causales de la epididimitis y la infertilidad ovina. Existe poca información acerca de *A. seminis* en comparación con *B. ovis* en cuanto a la forma en que logra la infección. *A. seminis* fue aislado inicialmente de semen de carneros con epididimitis (1); otros aislamientos se han reportado (2,3,4,5,6). Se ha considerado a *A. seminis* como un microorganismo que forma parte de la microflora normal de las membranas mucosas de los ovinos; localizándose en la pubertad en la mucosa peniana y del epidídimo, de donde la bacteria invade causando una epididimitis ascendente la que puede progresar en orquitis causando una infertilidad irreversible (5).

En el proceso de la división celular en las bacterias Gram negativas, la membrana externa es capaz de liberar microvesículas al medio de cultivo (7, 8), las cuales principalmente están formadas de proteínas de membrana externa, en asociación de toxinas, proteasas, etc (9). La liberación de estas microvesículas se ha considerado como un nuevo mecanismo de secreción, en donde la bacteria puede causar daño al huésped debido a diversos factores que están contenidos en estas microvesículas. Se han reportado diversos microorganismos productores de microvesículas, entre ellos: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Bacteroides burgdorferi*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Avibacterium paragallinarum*, entre otros (8, 3, 9, Ramon-Rocha y col, 2006).

Las proteasas microbianas han sido consideradas como un factor de virulencia en la patogénesis de una variedad de enfermedades causadas por microorganismos. Dichas proteasas extracelulares pueden abandonar la bacteria dentro de las microvesículas (8). Se ha demostrado la producción de microvesículas en *Actinobacillus seminis* (11).

El objetivo del presente estudio es conocer si las microvesículas de *A. seminis* presentan actividad proteolítica.

Material y Métodos

Bacteria y condiciones de crecimiento

Actinobacillus seminis ATCC 15768 y una cepa de campo fueron crecidas por 48 h a 37 C en placas de agar tripticaseína soya suplementado con 10 % de sangre ovina.

Aislamiento de microvesículas

Las células bacterianas fueron cosechadas a partir de placas de 48 h de crecimiento empleando Solución Salina Fisiológica: posteriormente se centrifugaron a 10,000 x g por 20 min a 4 C para sedimentar las células, el sobrenadante colectado se filtro a través de una membrana de 0.22 µm (Millipore), para remover las células residuales. Las microvesículas fueron recobradas por ultracentrifugación a 150 000 X g por 3 h a 4°C (8, 9). Las muestras fueron conservadas en congelación (-20 C) hasta su uso. El proceso se repitió varias veces para ambas cepas.

Microscopia electrónica.

Las microvesículas fueron observadas mediante tinción negativa. Se colocaron 25 µl de la muestra con microvesículas en rejillas de nickel recubiertas de Formvar, con un tiempo de adsorción de 20 min, y se tiñeron con ácido fosfotúngstico (Sigma chemical) al 25 % (p/v) durante 3 min a pH 8, y se observaron en el microscopio electrónico de transmisión JEM-2000 EX transmission a 40, 000 X.

Electroforesis y zimograma.

Las microvesículas fueron corridas en el PAGE-SDS preparando previamente una muestra 1:1 con el buffer de muestra de Laemmli y empleando un gel de poliacrilamida al 12 %, el cual se tiñó con azul de coomassie R-250 (Sigma Chemical) (12).

Para la determinación de la actividad proteolítica de las microvesículas, el PAGE-SDS se copolimerizó con 1 ml de gelatina de cerdo al 1% al gel de corrida (13). De la muestra de microvesículas preparada se colocó 2 µl por pozo, se corrió a 100 Volts a 4°C. El gel se colocó en triton X100 al 2.5 % durante 1 h, posteriormente se puso en Tris+CaCl₂ 1M durante 24 h a 37 °C. El gel fue teñido con azul de coomassie R-250 y se decoloró hasta hacer presentes las bandas de actividad enzimática.

Determinación del lipopolisacárido (LPS).

La presencia del LPS en las microvesículas fue determinada mediante la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL test) (QCL-1000 Chromogenic Limulus Amebocyte lysate, Bio-Whittaker, East Rutherford, New Jersey, USA).(14).

Resultados

Obtención de microvesículas

Las microvesículas de las cepas de *A. seminis* fueron obtenidas por ultracentrifugación. En la figura 1 se muestra las microvesículas obtenidas después de 48 horas de cultivo y observadas en el microscopio electrónico, estas estructuras presentaron un tamaño que vario entre los 100 a 150 nm.

PAGE-SDS de las microvesículas de *A. seminis*.

Se determino el perfil proteico de las proteínas contenidas en las microvesículas de las cepas de *A. seminis* las cuales fueron teñidas con azul de Coomassie. Los patrones fueron similares entre ambas cepas estudiadas y mostraron una amplia gama de proteínas entre los 15 y 200 kDa (Figura 2). Es posible observar la proteína de 75 kDa característica de *A. seminis*. en ambas cepas así como en las diferentes repeticiones.

Zimograma de las microvesículas de *A. seminis*.

La actividad proteolítica determinada en PAGE-SDS copolimerizado con gelatina puede ser observada en la figura 3. La cepas de referencia (ATCC 15768) y la de campo mostraron un perfil de actividad proteolítica similar. Se pueden observar cinco bandas de

actividad que muestran un peso aproximado de 79.5, 59, 40, 27 y 13.5 kDa.

Determinación del LPS en microvesículas de *A. seminis*.

A partir de las microvesículas obtenidas se realizó la determinación de la presencia de LPS mediante el LAL test. Se detectó LPS en las microvesículas de *A. seminis* ATCC 15768 y la cepa de campo, siendo de 0.45 y 0.4 UE/ml respectivamente.

Discusión

Las microvesículas liberadas en el medio y concentradas (figura 1) de *Actinobacillus seminis* mostraron un tamaño aproximado entre 100 a 150 nm, dichas vesículas fueron observadas a las 48 horas de cultivo. Se ha reportado que las microvesículas pueden variar en su tamaño de 20 a 500 nm, como se ha descrito en *Actinobacillus pleuropneumoniae* (9): *Actinobacillus sctinomycetemcomitans* (15), *Brucella melitensis* y *Brucella ovis* (3) y *Pseudomonas* (16), entre otros géneros.

Mayrand y Grenier en 1989 (17), señalan que las vesículas extracelulares son parte de la membrana externa de las bacterias y esto hace lógico el pensar en que posean los mismos componentes de éstas. La figura 2 muestra el perfil proteico de diferentes extracciones de vesículas de *A. seminis* ATCC y la cepa de campo determinadas en PAGE-SDS al 12%, un amplio rango de diversas proteínas de distintos pesos moleculares son observadas, dicho perfil se asemeja con el de la fracción subcelular de membrana externa de *A. seminis*, reportado con anterioridad (18), en donde se resalta la presencia de una proteína inmunogénica de 75 kDa que esta presente únicamente en la membrana externa de *A. seminis*, este hallazgo fue ratificado en las microvesículas extraídas de las cepas estudiadas. Aunado a lo anterior, se determinó la presencia de LPS en las microvesículas de *A.*

seminis ATCC 15768 y la cepa de campo, obteniéndose: 0.45 y 0.4 UE/ml respectivamente, lo que corrobora que las vesículas de *A. seminis* son estructuras que se originan de la membrana externa de esta bacteria.

En lo concerniente a la actividad proteolítica de las microvesículas, en este estudio se pueden observar en la Figura 3, bandas de 79.5, 59, 40, 27 y 13.5 kDa con actividad proteolítica. Acosta y col, en el 2003 (10), reportan la presencia de proteasas en sobrenadantes de cultivos de *A. seminis*, ellos identifican cuatro bandas de actividad proteolítica en los geles de acrilamida copolimerizados con gelatina, dichas bandas tienen un peso estimado de 80, 56, 45, 26 y 15 kDa. Dicha similitud se debe a que en los sobrenadantes que emplearon Acosta y col., 2003 (10), estaban presentes las microvesículas, ya que ellos no las eliminaron de sus sobrenadantes, por lo que la actividad proteolítica encontrada se debe a las proteasas contenidas en ellas, lo que corroboramos al probar sobrenadantes libres de microvesículas (datos no mostrados). Algo similar fue reportado por Zhou y col. en 1998 (8), en donde se demostró que la actividad endotoxica reportada en filtrados de cultivos de *Veillonella spp*, se debió a la presencia de microvesículas y actividad de LPS en ellas.

Es conocido que las superficies celulares bacterianas juegan un papel muy importante dentro de la patogénesis, ya que varios

componentes de virulencia forman parte de estas superficies (17). Es por ello que las microvesículas pueden contribuir al proceso patogénico y ser consideradas un importante factor de virulencia, como lo reporta Negrete y col., en el 2000 (9), en donde describe la presencia no solo de metaloproteasas sino también de toxinas Apx en las microvesículas liberadas por *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Es necesario continuar con la caracterización de las proteasas liberadas por *A. seminis* y dilucidar la importancia de éstas dentro de la patogénesis de la epididimitis ovina.

Finalmente, las microvesículas pueden resultar una fuente excelente para la subsecuente purificación y caracterización de moléculas con actividad antigénica que puedan ser empleadas para el conocimiento de la patogenicidad, desarrollo de inmunogenos y pruebas diagnósticas.

Figuras.

Figura 1. Microscopia electrónica de transmisión mostrando las microvesículas de *A. seminis*. Bar= 200 nm

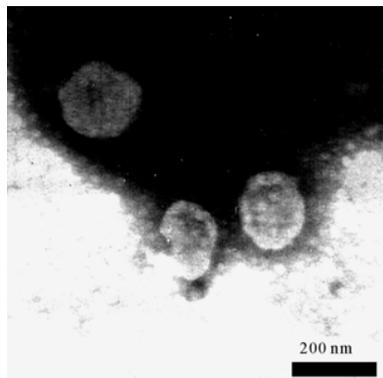


Figure 2. PAGE-SDS al 12% de las microvesículas de *A. seminis* teñidas con azul de Coomassie. Se colocaron 15 µg de proteína por pozo. Línea 1, muestra los marcadores de peso molecular (kDa); Líneas 2 a 6 microvesículas de *A. seminis* ATCC 15768 y de las líneas 7 a 10 la cepa de campo. Obsérvese la presencia de la proteína de 75 kDa específica de *A. seminis*.

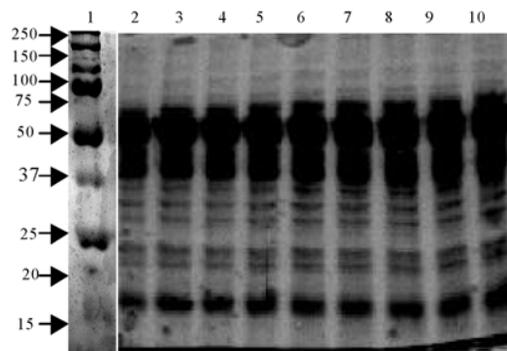
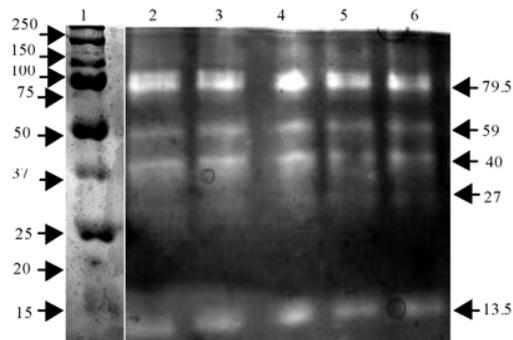


Figura 3. Zimograma de las microvesículas de *A. seminis*, se colocaron 2 μ l de muestra para poder hacer visible el bandeo de la actividad proteolítica. Línea 1, marcadores de peso molecular (kDa); Línea 2 y 3 cepa de campo de *A. seminis*: Líneas 4, 5 y 6 *A. seminis* ATCC 15768. A la derecha del gel se indica los pesos moleculares donde ocurrió actividad proteolítica.



Bibliografía

1. Baynes ID, Symmons, GC. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis* (n.sp). Australian Veterinary Journal 1960; 36: 454-459.
2. Livingston CW, Hardy WT. Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. American Journal of Veterinary Research 1964; 25: 660-663.
3. Gamazo C, Winter AJ, Moriyón L, Riezu-Boj JL, Blasco JM, Díaz R. Comparative análisis of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrana blebs form field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. Infect Immun 1989; 57: 1419-1426.
4. Low JC, Somerville D, Myline MJA, Kelvey WAC. Prevalence of *Actinobacillus seminis* in the semen of rams in the United kingdom. Veterinary Record 1995; 136: 268-269.
5. Mbai K, Munyua SJM, Gathumbi PK, Mbiuki SM. *Actinobacillus seminis* as a cause of ram infertility in Kenya. Small Ruminant Research 1996; 21: 227-231.
6. De la Puente-Redondo VA, García del Blanco N, Pérez-Martínez C, González-Rodríguez EF, Gutiérrez-Martín C. Isolation of *Actinobacillus*

seminis from the genital tract of rams in Spain. J Comp Path 2000; 122: 217-222.

7. Li Z, Clarke AJ, Reveridge T. A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa* subcellular distribution potential role in cell growth and division, and secretion in surface membrana vesicles. J. Bacteriol 1996; 178: 2479-2488.

8. Zhou L, Srisatjaluk R, Justus DF, Doyle RJ. On the origin of membrana vesicles in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiology Letters 1998; 163: 223-228.

9. Negrete-Abascal E, García RM, Reyes ME, Godínez D, De la Garza M. Membrana vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. FEMS-Microbiology 2000; 194: 109-113.

10. Acosta DJP, Tórtora PJ, Ontiveros CL, Hernández AL, Suárez GF, Tenorio GVB. Demostración de proteasas en sobrenadantes de cultivos de *Actinobacillus seminis*. 1er. Congreso de la Asociación Latinoamericana de Especialistas en pequeños rumiantes y Camelidos. Viña del Mar, Chile. 2003; 115-116.

11. Núñez AA, Salas TE, Tenorio GV, Díaz AE, de la Garza AM. Semipurification of a specific immunogenic protein of 75 kDa

Actinobacillus seminis. Internacional Pasteurellaceae Society

Conference, Banff Nacional Park, Canada, 2002; 160.

12. Laemmli UK. Cleavaje of structural protein during assembly of bacteriophage T4. Nature (London) 1970; 227:680-685.

13. Negrete-Abascal E.,G.V.Tenorio,J.J.Serrano,C.C.Garcia and A.M. De la Garza, 1994.Secreted Proteasas from Actinobacillus Pleuropneumoniae Serotype 1 Degrade Porcine Gelatin, Inmunoglobulin A. Can. J. Vet. Res., 58:83-86.

14. Young NS, Levin J, Prendergast RA. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin evidence for enzymatic mechanism. J Clin Invest 1972; 51: 1790-1799.

15. Meyer DH, Fives-Taylor PM. Evidence that extracellular components function to adhere of Actinobacillus actinomycetemcomitans to epithelial cells. Infect Immun 1993; 61: 4933- 4936.

16. Kadurugamuwa J, Beveridge T. Virulence factors are released from Pseudomonas aeruginosa in association with membrana vesicles during normal and exposure to gentamicin a novel mechanism of enzyme secretion. J Bacteriol 1995; 177: 3998=4008.

17. Maynard D, Grenier D. Biological activities of outer membrana vesicles. *Can J Microbiol* 1989; 35: 607-613.

18. Núñez AA, Salas TE, De la Garza AM, Díaz AE, Tenorio GV. Identification of an immunogenic protein of *Actinobacillus seminis* that is present in microvesicles. *Can J Vet Res* 2006; 70: 43-49.