



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN QUE
CODIFICA PARA UNA METALOPROTEASA EN *Avibacterium
paragallinarum*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ROGELIO FRANK JIMÉNEZ ORTEGA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ERASMO NEGRETE ABASCAL

SINODALES:

Dr. SERGIO VACA PACHECO

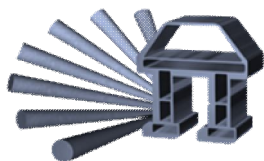
M en C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

M en C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA

Biol. ALINA URIBE GARCÍA

Esta tesis fue realizada con apoyo del PAPIIT
Proyecto IN216010 y PAPCA FES I - UNAM

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2012.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

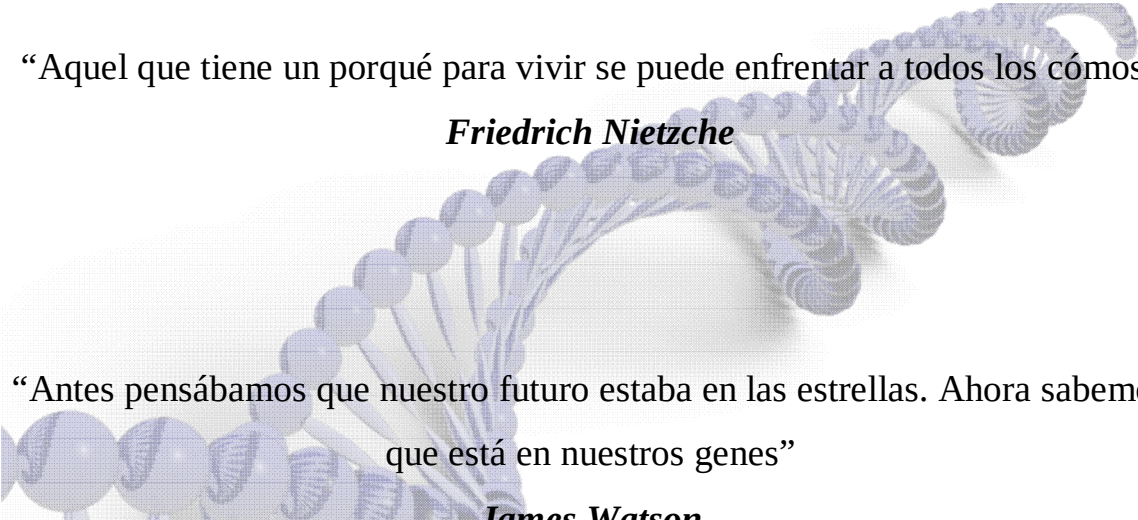
Restricciones de uso

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.



“Aquel que tiene un porqué para vivir se puede enfrentar a todos los cómo”

Friedrich Nietzsche

“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas. Ahora sabemos
que está en nuestros genes”

James Watson

Dedicatorias

A mis padres Laura Ortega y Rogelio Jiménez quienes me han apoyado en todo momento y han sido una fuente de inspiración para alcanzar cada una de mis metas, de la forma más sincera les agradezco y les dedico este trabajo.

A mi abuelo Álvaro Ortega (†), a quien siempre consideré como un padre, una persona digna de seguir como ejemplo y que me abrió las puertas de su casa en todo momento, a ti te prometí que sería un profesionista y esta tesis también es tuya! Gracias por estar siempre conmigo (papá Sánchez).

A mi abuela María del Carmen (†), quien nunca dudo de mi capacidad y siempre supo que terminaría todos mis proyectos, gracias por estar siempre que te necesité.

A mis hermanos, Emma, Julio y Mario.

A mi entrenador y amigo Adalberto González quien me apoyo en mi etapa deportiva, de quien recibí muchos consejos para superarme como deportista y persona, te agradezco por dejarme ser parte de tu equipo y por mostrarme de lo que puedo ser capaz cuando llevo una disciplina.

A mis amigos de la carrera Marco, Uriel y Horacio. Con quienes siempre me he divertido como nunca y con quienes he pasado muy buenas aventuras como la de Hidalgo, muchas gracias por estar siempre ahí.

A todos mis amigos del 03, Ana, Monse, Carilú, Fio, Jessica, Karla (Hoch), Karla, Pilar, Ximena, Oscar y Valerio, por hacer tan agradables los días de clases.

Y por último a mis amigos y compañeros del laboratorio, Mónica, Brenda, Karina, Sonia, Fernando, Ismael, Carlos, Miguel y los nuevos Aldo y Marilú, por sus consejos, correcciones y sobre todo por hacer mas amena la estancia en el laboratorio.

Agradecimientos

A mis directores de Tesis; el Dr. Erasmo Negrete Abascal y Sergio Vaca Pacheco, por la confianza depositada en mi para la realización de este proyecto y principalmente por la paciencia, gracias por sus consejos, observaciones y comentarios.

A la UNAM por permitir mi formación académica, profesional y deportiva dentro de sus aulas.

Al Dr. Candelario Vázquez, ya que con su apoyo y el de la BUAP pudo realizarse este proyecto de investigación.

Al laboratorio de Analisis Clínicos de la FES Iztacala por su colaboración con este proyecto.

A mis sinodales, M. en C. Gloria Paniagua, M. en C. Irma Dueñas, M. en C. Alina Uribe, por su cometarios y consejos para la realización de esta tesis.

El siguiente proyecto se realizó en el laboratorio de Genética de la
Unidad de Morfofisiología y Función, en la Facultad de Estudios
Superiores Iztacala.

Universidad Nacional Autónoma de México

Financiado por PAPIIT
Proyecto IN216010 y PAPCA FES I - UNAM

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. <i>Avibacterium paragallinarum</i>	2
2.2. Cuadro Clínico	2
2.3. Incidencia y distribución	3
2.4. Transmisión	3
2.5. Clasificación	4
2.6. Clasificación taxónomica	5
2.7. Morfología y tinción	5
2.8. Requerimientos de crecimiento y medios de cultivo	6
2.9. Propiedades Bioquímicas	7
2.9.1. Tratamiento contra coriza infecciosa	8
2.9.2. Factores de virulencia	9
3. PROTEASAS	10
3.1. Clasificación de las proteasas	11
3.2. Serín proteasas	12
3.3. Aspártico proteasas	13
3.4. Cisteín proteasas	14
3.5. Metaloproteasas	15
3.6. Procesamiento de las metaloproteasas	16
3.7. Expresión y regulación de metaloproteasas	16
4. ANTECEDENTES	17
5. JUSTIFICACIÓN	18
6. OBJETIVOS	18
7. DIAGRAMA DE TRABAJO	19
8. MATERIAL Y MÉTODOS	20
8.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	20
8.2. Diseño de oligonucleótidos	20
8.3. Condiciones de amplificación	21
8.4. Aislamiento de ADN cromosómico	22
8.5. Preparación de células competentes	23
8.6. Clonación del producto de PCR y selección de las clonas transformantes	24

8.7. Secuenciación y análisis <i>in silico</i>	25
8.8. Manipulación de proteínas secretadas	25
8.9. Zimograma	25
8.9.1 Inmunoreconocimiento	25
9. RESULTADOS	26
9.1. Crecimiento de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	26
9.2. Oligonucleótidos	27
9.3. Clonación del producto de PCR y selección de las clonas transformantes	28
9.4. Secuenciación y análisis <i>in silico</i>	30
9.5. Secuencia de nucleótidos del gen <i>pepN</i> de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	33
9.6. Alineamiento múltiple del gen <i>pepN</i> de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	34
9.7. Secuencia de aminoácidos de la metaloproteasa de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	36
9.8. Zimograma	38
9.9. Inmunoreconocimiento	39
10. DISCUSIÓN	39
11. CONCLUSIONES	42
12. PERSPECTIVAS	42
13. APENDICES	43
14. BIBLIOGRAFÍA	46

RESUMEN

Avibacterium paragallinarum (*Haemophilus paragallinarum*) es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*, es la causante de la coriza infecciosa, una enfermedad que afecta el tracto respiratorio superior de pollos y gallinas provocando altas pérdidas económicas en la industria avícola, debido al retraso en el crecimiento, pérdida de peso, aumento de sacrificios de aves jóvenes y una disminución que va del 10 a más del 40% en la producción de huevo. Durante el proceso de infección, este microorganismo produce factores de virulencia que contribuyen a su patogenicidad, entre estos factores se encuentran las proteasas, enzimas capaces de degradar IgA e IgG que le permiten evadir la respuesta inmune de su hospedero.

En el presente trabajo se clonó y caracterizó el gen que codifica para una metaloproteasa en *Avibacterium paragallinarum*. Se obtuvo ADN cromosómico el cual sirvió como templado para realizar PCR utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias conservadas en genes *pepN* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida* que codifican para metaloproteasas. De esta reacción se obtuvo un producto de ~2500pb, el cual se clonó en el plásmido pBluescript Ks (-), generando el plásmido Ks-*pepN*-Avpg que fue utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5α. Para confirmar la presencia del inserto se realizó nuevamente PCR utilizando DNA plasmídico como templado. De este modo se confirmó la presencia del gen recombinado con el vector plasmídico. El producto obtenido de esta amplificación fue secuenciado y analizado *in silico*, obteniendo 2676 pb correspondientes al 100% de la de secuencia. Posteriormente el amplicón fue analizado por medio de BLAST y comparado con otras secuencias de genes *pepN*. Encontrando un 99% de similitud con el gen de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y en menor porcentaje con los genes de otros microorganismos.

Al traducirse *in silico* (891 aa), en la secuencia de aminoácidos se encontró un sitio conservado de unión al zinc, correspondiente a la secuencia consenso HEXXH que es característico de la familia de zincinas. Esto indicó la presencia de un gen *pepN*, que codifica para una metaloproteasa. En el genoma de *Avibacterium paragallinarum*, y que probablemente sea un factor de virulencia que participe durante el proceso de patogénesis en su hospedero.

INTRODUCCIÓN

Avibacterium paragallinarum

Avibacterium paragallinarum es una bacteria conocida anteriormente con el nombre de *Haemophilus paragallinarum* y actualmente se encuentra reclasificada en el género *Avibacterium* (Blackall *et al.*, 2005). Es el agente causal de la coriza infecciosa (CI), una enfermedad identificada por De Blieck en 1931 (Gayatri *et al.*, 2009), que afecta el tracto respiratorio superior de pollos, gallinas, faisanes y gallinas de guinea, causando altas pérdidas económicas en la industria avícola debido al retraso en el crecimiento, pérdida de peso, aumento de sacrificios en aves jóvenes y una disminución que va del 10 a más del 40% en la producción de huevo (Bragg *et al.*, 1997; Blackall, 1999).

Cuando la CI se desarrolla en un hospedero sin otras enfermedades asociadas, se caracteriza por ser una enfermedad aguda de corto plazo, alcanzando un máximo de dos semanas, pero puede complicarse si existe una asociación con otros agentes bacterianos o virales como *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella gallinarum*, *Salmonella spp.*, y el virus de la bronquitis infecciosa, prolongando la enfermedad hasta siete semanas, ocasionando una coriza infecciosa complicada (Blackall, 1999; Soriano y Terzolo, 2004). Las aves con un cuadro clínico complicado no se recuperan fácilmente y suelen quedarles diversas secuelas, lo cual provoca el desecho de un número importante de aves (Soriano y Terzolo, 2004).

CUADRO CLÍNICO

Los signos clínicos más comunes son la secreción nasal, hinchazón facial, lagrimeo, anorexia, diarrea, estornudo y conjuntivitis (Fig. 1). La inflamación de barbillas puede ser particularmente evidente en machos, también se puede escuchar estertor traqueal cuando las aves tienen afectado el tracto respiratorio superior (Glisson, 1998; Soriano y Terzolo, 2004).

Las aves de corral pueden presentar diarrea, su consumo de agua y alimento generalmente se reduce y las gallinas de postura reducen la producción de huevo hasta en un 58.7% y la enfermedad se difunde rápidamente en donde exista contacto directo ave-ave (Luna, 2010).

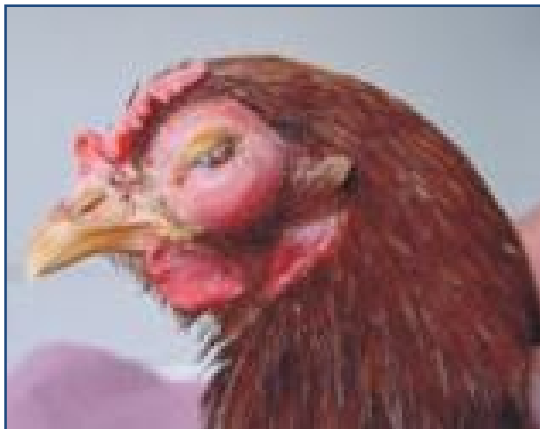


Figura 1. Pollo infectado con *Avibacterium paragallinarum*. Se observa inflamación del seno infraorbitario y edema de barbilla (Luna, 2010). Tomada de la revista Patología Veterinaria.

INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN

La presencia de *Avibacterium paragallinarum* o de la CI ha sido reportada en varios países del mundo considerándose un organismo cosmopolita, se ha identificado en Alemania, Argentina, Australia, Bulgaria, Canadá, Egipto, Gran Bretaña, Guatemala, Holanda, India, Indonesia, Irak, Japón y Suiza entre otros tantos, en Estados Unidos de América se han reportado brotes de CI en los estados de Alabama, California y Oregon mientras que en México los estados que se han visto afectados son: Estado de México, Michoacán, Morelos, Puebla, Sonora y Yucatán (Soriano y Terzolo, 2004; Zavala, 2011).

Aunque la CI es una enfermedad que puede existir en todas partes del mundo se considera exótica en Nueva Zelanda. Único país que parece estar libre de *Avibacterium paragallinarum*, además de otras enfermedades que atacan a las aves de corral como Tifoidea Aviar, Ornitobacteriosis y coriza de los pavos (Soriano y Terzolo, 2004).

TRANSMISIÓN

El éxito de la supervivencia y presencia de esta enfermedad (CI), se debe a que las aves al recuperarse de una infección causada por *Avibacterium paragallinarum* se convierten en portadores, y al ser introducidas a otros corrales propagan la enfermedad entre aves sanas (Gayatri *et al.*, 2009).

La propagación también se debe a que *A. paragallinarum* ha sido descrito en nueve serovariedades, y la protección ofrecida por las vacunas existentes es serotipo específica, lo cual hace ineficaz combatir la enfermedad mediante vacunación (Gayatri *et al.*, 2009).

Aunque *A. paragallinarum* no afecta a todo tipo de aves, puede utilizar a algunas especies como reservorios o portadores sin signos, estudios epidemiológicos sugieren que este microorganismo es introducido a granjas por vía aérea, debido a que los brotes de CI ocurren frecuentemente en otoño e invierno, estaciones que corresponden a periodos de migración de muchas especies de aves (Soriano y Terzolo, 2004).

CLASIFICACIÓN

La enfermedad causada por *A. paragallinarum* en aves de corral fue diagnosticada por primera vez en 1931 por De Blicke, quien describió un padecimiento que afecta las fosas nasales, vías respiratorias superiores, senos paranasales y tráquea, al que denominó coriza infecciosa. Más adelante la bacteria fue llamada *Haemophilus gallinarum*, ya que el organismo requeriría tanto de hemina (factor X), como del NAD (factor Y) para su crecimiento. Una característica de *Haemophilus*. En 1932 McGaughey reportó que sus aislamientos fueron dependientes de NAD pero no de hemina por lo que Biberstein y White en 1969 sugirieron que las cepas que no requieren hemina para el crecimiento aisladas a partir de pollos debían ser llamadas *Haemophilus paragallinarum* (Bragg *et al.*, 1997): para el 2005 Blackall realizó una caracterización fenotípica ampliada de la cepa tipo de *Haemophilus paragallinarum*, que es NAD-dependiente, y de ocho cepas NAD-independientes, al comparar secuencias 16S rARN entre una cepa NAD dependiente y cuatro NAD independientes, estas cinco secuencias, así como otros siete taxones de *Pasteurellaceae* fueron sometidas a análisis filogenético, estableciendo que *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella avium* y *Pasteurella volatium* forman un grupo monofilético con un 96% de similitud, por lo que estas cepas bacterianas fueron transferidas a un nuevo género llamado *Avibacterium* (Bragg *et al.*, 1997; Blackall *et al.*, 2005; Luna, 2010).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Superreino: *Procaryotae*
Reino: *Eubacteria*
División: *Gracilicutes*
Clase: *Proteobacteria*
Familia: *Pasteurellaceae*
Género: *Avibacterium* (Antes *Haemophilus*)
Especie: *Avibacterium paragallinarum*

MORFOLOGÍA Y TINCIÓN

Avibacterium paragallinarum es una bacteria Gram negativa, no esporulada, pleomórfica, presenta una morfología cocobacilar con tendencia a la formación de cadenas cortas y de algunos filamentos, mide de 1 a 3 μm de longitud y 0.4-0.8 μm de ancho (Fig. 2) (Qin Zhao *et al.*, 2010). En cultivos líquidos es frecuente encontrar formas pleomórficas y en frotis directos de mucus nasal es común encontrar formas bacilares más largas, con presencia de gránulos en su interior, que se visualizan con azul de metileno (Zavala, 2011; Luna, 2010). Bajo ciertas condiciones de cultivo es una bacteria móvil, lo cual fue demostrado con pruebas bioquímicas, genéticas y de microscopía electrónica (Negrete *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2005).

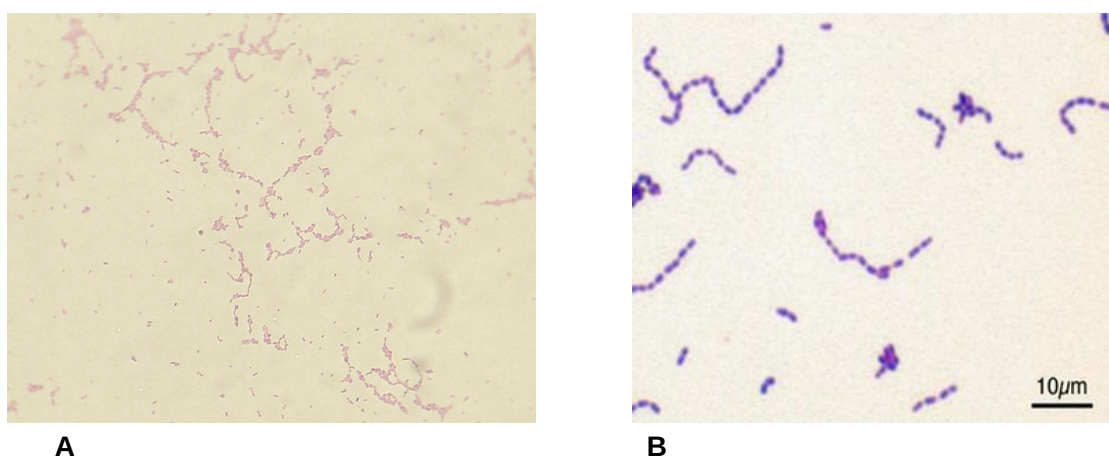


Fig.2. Tinción de Gram de *Avibacterium paragallinarum*. En la fotografía **A** se observa un acercamiento a 40X y en **B** a 100X. Tomadas en el laboratorio de Genética y en el Microscopía de la FES Iztacala UNAM.

Las colonias de *A. paragallinarum* normalmente crecen en forma de pequeñas gotas de rocío son no hemolíticas, circulares, convexas de superficie lisa, no pigmentadas, de 0.3 mm de diámetro en medios adecuados y crecen adyacentes a una colonia nodriza que les proporcionara el NAD: en sentido oblicuo transmiten luz, las colonias mucoides son iridiscentes mientras que las colonias rugosas no presentan iridiscencia (Blackall y Soriano, 2008). Cuando se utilizan medios de cultivo con base sangre hemolizada, las colonias son mucho más grandes, de 3-5mm de diámetro (Soriano y Terzolo, 2004).

Las colonias de *A. paragallinarum* sufren degradación y pierden su forma definida, después de 48-60h, en medios de cultivo sólidos, pero estas colonias al colocarse en un medio nuevo recuperan su forma típica. (Blackall y Soriano, 2008).

REQUERIMIENTOS DE CRECIMIENTO Y MEDIOS DE CULTIVO

A. paragallinarum y otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* requieren el factor de crecimiento Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), también conocido como factor V, este puede ser utilizado en su forma reducida (NADH) con una concentración de 1.56-25 µg/ml o en su forma oxidada (NAD) en una concentración de 20-100 µg/ml (Soriano y Terzolo, 2004).

Este factor de crecimiento (NAD) es esencial, debido a que *A. paragallinarum* no puede sintetizarlo. La vía del NAD consta de un sistema de absorción con una mínima actividad de síntesis y por lo tanto este organismo lo obtiene fuentes extracelulares. Como la mucosa de la región nasofaríngea y las vías respiratorias superiores y genitales, los cuales son los nichos que pueden ser ocupados por la mayoría de las especies de la familia *Pasteurellaceae* debido a que las células epiteliales y algunos eritrocitos pueden contener de 30-60µM de NAD y los leucocitos hasta 400µM, pero también existen algunas excepciones como variantes inusuales de crecimiento y cepas independientes de NAD⁺ aisladas de México y el sur de África (Bragg *et al.*, 2002; Gerlach y Reidl, 2006; Blackall *et al.*, 2011).

A. paragallinarum puede crecer sin problemas en el medio Infusión cerebro corazón (BHI), suplementado con 1-10 µM de NAD o este factor puede ser aportado por una cepa nodriza como *Staphylococcus spp.* También es esencial 1.0-1.5% de cloruro de sodio (NaCl), algunas

cepas crecen mejor cuando se adiciona 1-5% de suero inactivado de pollo o de caballo al medio de cultivo (Soriano y Terzolo, 2004).

El crecimiento bacteriano en base de agar con 10% de sangre desfibrinada de bovino u ovino se da después de 16-24 horas, incubando a 37° C, otros medios de cultivo pueden ser infusión de carne de pollo (MCI), medio de mantenimiento (HMM), agar de Casman, base de agar para gonococos, agar medio de prueba (TMA), o agar Columbia, con la adición del factor V en su forma reducida (Blackall *et al.*, 1997), otro método de preparación es la adición de sangre equina hemolizada al 7%, que se prepara por convección térmica a través de agua (Baño María) a 56° C durante 40 minutos en agitación, esta sangre a diferencia de la no hemolizada, no necesita la adición de NAD debido a que durante la hemólisis se libera el Factor V de los eritrocitos y no requiere la adición de dicho componente en el medio de cultivo (Blackall *et al.*, 1999; Soriano y Terzolo, 2004; Zavala, 2011). El crecimiento óptimo se da a un pH de 6.9 a 7.6 con una temperatura de 37 a 40° C (Soriano y Terzolo, 2004; Zavala, 2011).

La mayoría de las variedades de *A. paragallinarum* se desarrollan en el tracto respiratorio superior de los pollos y gallinas *in vivo*, mientras que *in vitro* pueden crecer bien en cualquiera de los medios de cultivo antes mencionados en una atmósfera con condiciones de microaerobiosis o anaerobiosis, favorecidas por la presencia de CO₂ del 5 al 10%. También puede utilizarse el método de un frasco con una vela o sobres comerciales o mezclas gaseosas (Soriano y Terzolo, 2004).

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Lo que permite distinguir al género *Avibacterium* es la capacidad de reducir nitratitos a nitritos, la fermentación de la glucosa, la actividad negativa de la oxidasa, la falta de producción de indol, la presencia de la enzima fosfatasa alcalina, la hidrólisis de la urea o de la gelatina y la ausencia de la enzima catalasa (Blackall y Soriano, 2002).

En la tabla 1 se muestran las propiedades bioquímicas de *A. paragallinarum* y otras bacterias Gram negativas patógenas para las aves.

Tabla 1. Diferencias entre *Avibacterium paragallinarum* y otras bacterias Gram negativas patógenas para las aves. Tabla tomada de Soriano y Terzolo, (2004).

Reacción	<i>Avibacterium paragallinarum</i>	<i>Pasterella multocida</i>	<i>Riemerella anatipestifer</i>	<i>Pasteurella gallinarum</i>	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>
Reducción de Nitrato	+	+	-	+	-
Catalasa	-	+	+	+	-
Oxidasa	-	+	+	+	+
Ureasa	-	-	+	-	-
Indol	-	+	-	-	-
β-Galactosidasa	+	-/+	-	+/-	+
Lisina-descarboxilasa	-	-		-	-
Omitina-descarboxilasa	-	-		-	-

TRATAMIENTO CONTRA CORIZA INFECCIOSA

Una forma de control y protección contra la coriza infecciosa es por medio de vacunas que contienen bacterias inactivadas, empleando cepas vivas atenuadas o no patógenas: sin embargo, este tratamiento requiere de mayor investigación debido a que su objetivo de ofrecer protección cruzada contra todas las serovariedades de *A. paragallinarum* aun no ofrece seguridad completa ya que cada una presenta peculiaridades que las hacen distintas unas de otras y hay que tenerlas en cuenta al momento de elegir la más conveniente para alcanzar el mayor grado de defensa contra la infección (Dávila, 2009). La aplicación de estas vacunas se lleva a cabo por vía subcutánea detrás del cuello alcanzando un 32% de protección, vía intramuscular en la pechuga con un 50% de protección y por vía intramuscular en el muslo con un 82% de protección (Blackall y Terzolo, 1995; Dávila, 2009).

El éxito de vacunas contra la coriza infecciosa no siempre es el esperado ya que suelen presentarse brotes de la enfermedad después de su aplicación, inclusive con vacunas elaboradas específicamente contra alguna de las serovariedades del microorganismo, con lo que se busca conseguir una respuesta inmune específica (Dávila, 2009). Sin embargo. Se ha determinado la eficacia de una vacuna inactivada autógena para el serotipo A de *A. paragallinarum* aplicada con aceite mineral o con hidróxido de aluminio como adyuvantes a

una concentración de 10^{10} unidades formadoras de colonias, induciendo la formación de anticuerpos más rápido que con tratamientos comerciales (Chukiatsiri *et al.*, 2009).

FACTORES DE VIRULENCIA

Las enfermedades infecciosas, son el resultado de un complejo conjunto de interacciones entre el agente causal y la respuesta del hospedero, muchos factores están involucrados en el establecimiento de una infección bacteriana incluida la habilidad del microorganismo de adherirse a membranas mucosas y multiplicarse en los tejidos del hospedero (Byarugaba *et al.*, 2007).

Uno de los factores de virulencia de *A. paragallinarum* que se ha descrito *in vitro* es la cápsula. compuesta de polisacáridos polianiónicos altamente hidratados, la cual determina el acceso de ciertas moléculas hacia la membrana celular mediante la adherencia a superficies, además incrementa la tolerancia a la desecación (Boyce *et al.*, 2000; Byarugaba *et al.*, 2007; Gyles *et al.*, 2010). Se ha demostrado que las cepas bacterianas encapsuladas son más virulentas que las no encapsuladas y originan inflamación aguda en la cavidad nasal y en los senos paranasales (Swata *et al.*, 1985).

A. paragallinarum era considerada una bacteria no móvil e incapaz de formar flagelo: sin embargo. Recientemente se ha demostrado que posee un gen *fliC*, y bajo ciertas condiciones *in vitro* es capaz de formar un flagelo polar constituido de la proteína flagelina. Con un peso molecular de aproximadamente 73 kDa. La cual muestra reacción cruzada con diferentes sueros anti flagelina. La presencia de flagelo puede ser un factor importante durante la patogénesis de este microorganismo (Serrano, 2007).

Las hemaglutininas también son consideradas factores de virulencia, éstas son antígenos de la membrana externa que están implicados en la serotipificación, inmunidad y patogenicidad, y juegan un papel importante en la colonización, al participar en la adhesión a células epiteliales (Hobb *et al.*, 2002).

Otro factor implicado en la virulencia es la secreción de toxinas RTX, una familia de proteínas sintetizadas por bacterias Gram negativas, que presentan numerosos sitios de unión al calcio, algunas han sido descritas con actividad de proteasa, lipasa y bacteriocina: su función es la formación de canales permeables a iones en la membrana de fagocitos y otras células blanco, produciéndoles un desequilibrio osmótico y muerte celular. Se han reportado para *A. paragallinarum* proteínas de 110-120 kDa las cuales pueden estar implicadas en la

patogénesis que causa este organismo (Thompson y Sparling, 1993; Mena *et al.*, 2004; Gómez, 2005; Linhartová *et al.*, 2010).

Bajo condiciones normales de crecimiento o estrés, algunas bacterias Gram negativas son capaces de producir vesículas de membrana, mecanismo asociado a la liberación de otros factores de virulencia que pueden dañar tejidos del hospedero. Las microvesículas también ayudan a colonizar tejidos, a eliminar otras cepas bacterianas. Promueven la adhesión de bacterias no adherentes favoreciendo la formación de biopelículas, además están relacionadas con la comunicación bacteria-bacteria o bacteria-hospedero así como con la transmisión de información genética (Negrete *et al.*, 2000; Ramón *et al.*, 2006).

La producción de hemocinas también juega un papel importante durante la colonización debido a que estas moléculas inhiben el crecimiento de otras bacterias Gram negativas asociadas al tracto respiratorio de las aves (Tamsin *et al.*, 2003).

Las proteasas están presentes en todo organismo vivo, estas son enzimas que catalizan la hidrólisis de proteínas o péptidos. Las proteasas encontradas en varios miembros de la familia *Pasteurellaceae* son: como en la mayoría de los organismos patógenos. Metaloproteasas extracelulares que contienen zinc, y se ha demostrado que juegan un papel importante en la virulencia. En la familia *Pasteurellaceae* se ha reportado la secreción de metaloproteasas en *Pasteurella multocida* (Negrete *et al.*, 1998), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Negrete *et al.*, 2004), *Gallibacterium anatis* (García *et al.*, 2005), y *A. paragallinarum* (Rivero *et al.*, 2005).

PROTEASAS

Las proteasas son enzimas proteolíticas y factores esenciales que participan en una gran cantidad de funciones fisiológicas, biotecnológicas y comerciales. Los avances en las técnicas analíticas han demostrado que las proteasas hacen modificaciones muy específicas y selectivas de proteínas, como la activación de formas zimógenas por proteólisis limitada; por ejemplo la coagulación de la sangre y la lisis de coágulos, también el procesamiento y transporte de proteínas secretoras a través de membrana: además, las proteasas ejecutan una gran variedad de funciones que se extienden del nivel celular hasta todo el organismo, son responsables de los complejos procesos implicados en la fisiología normal de la célula así como de condiciones patofisiológicas anormales. Su participación en procesos patogénicos de diversos microorganismos las ha convertido en un objetivo potencial para el desarrollo de agentes terapéuticos contra varias enfermedades (Mala *et al.*, 1998).

Las proteasas están entre las moléculas que realizan una gran cantidad de funciones en una amplia diversidad de microorganismos, pueden facilitar la invasión del huésped debido a la degradación catalítica del tejido conectivo, también ayudan a la evasión del sistema inmune del huésped por activación o degradación de las moléculas que participan en su defensa (Juárez, 2006).

En el campo de las enfermedades aviares, se sabe que *A. paragallinarum* y otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* son capaces de secretar proteasas, de las cuales se han caracterizado algunas y se ha destacado su posible participación durante la colonización de tejidos y desarrollo de enfermedades. Por ejemplo la colonización de superficies mucosas e invasión puede ser promovida por proteasas que degradan diferentes sustratos que *A. paragallinarum* encuentra en su huésped incluyendo IgA e IgG (Negrete *et al.*, 1999; García *et al.*, 2005).

CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS

De acuerdo a su mecanismo catalítico las proteasas se dividen en cuatro grupos principales: serín-, aspártico-, cisteín- y metallo-proteasas.

SERÍN PROTEASAS

Esta clase comprende la familia de la quimiotripsina que incluye enzimas como la quimiotripsina, tripsina y elastina. Y la familia de las subtilisinas que incluye las enzimas bacterianas como la subtilisina. Estas enzimas llevan a cabo la hidrólisis de un sustrato a través de una reacción de dos pasos en la que se forma un intermediario peptídico que se une a la enzima con la pérdida del aminoácido o fragmento del péptido; seguido por una desacilación debido a un ataque nucleofílico sobre el intermediario. Este ataque se lleva a cabo por una molécula de agua y da como resultado la hidrólisis del péptido (Fig. 3) (Mala *et al.*, 1998).

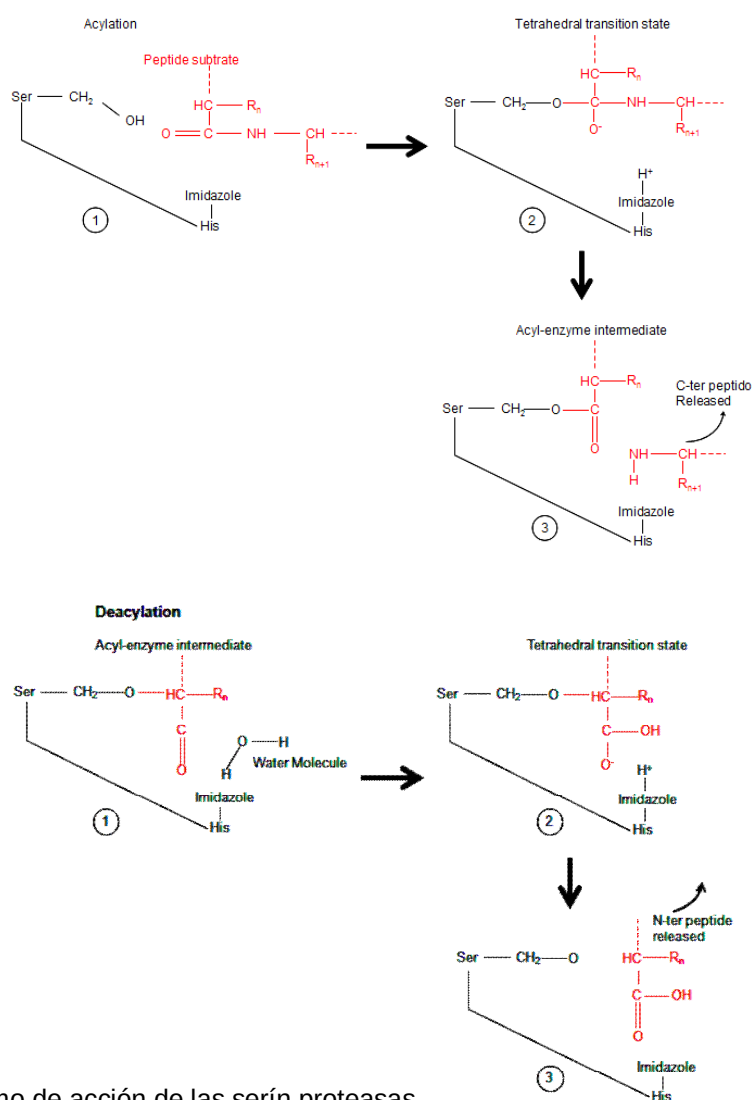


Fig. 3. Mecanismo de acción de las serín proteasas.

Tomada de Juárez (2006).

ASPÁRTICO PROTEASAS

Algunas aspártico proteasas corresponden a la familia de las pepsinas, esta familia incluye enzimas digestivas como la pepsina, la cathepsina D lisosomal y ciertas proteasas fúngicas como la penicilopepsina y la rhizopuspepsina; así como proteasas virales como las proteasas del VIH. El ataque nucleofílico se realiza por dos transferencias simultáneas de protones: la primera a partir de una molécula de agua en los dos grupos carboxilo y la segunda en el oxígeno del grupo carbonilo del sustrato con la ruptura del enlace CO-NH; conduciendo a la formación de un intermediario tetraédrico no covalente neutro (Fig. 4) (Mala *et al.*, 1998)

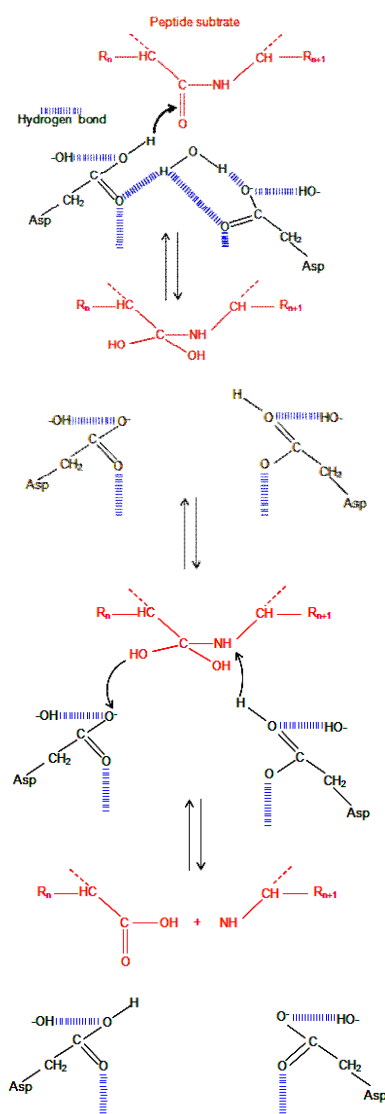


Fig. 4. Mecanismo de acción de las Aspártico proteasas.

Tomada de Juárez (2006).

CISTEÍN PROTEASAS

Este grupo incluye proteasas de plantas como: papaína, actinidina, bromelina, varias catepsinas lisosomales de mamíferos y diversas proteasas de parásitos como *Trypanosoma* y *Schistosoma* (Juárez, 2006).

La catálisis se realiza a través de la formación de un intermediario covalente e involucra un residuo de cisteína y uno de histidina. El nucleófilo es un ion tiolato en lugar de un grupo hidroxilo. El ion tiolato se estabiliza a través de la formación de un complejo ion- grupo imidazol de la histidina. El nucleófilo que ataca es el ión tiolato-imidazol en ambos pasos y ya no se requiere la molécula de agua (Fig. 5) (Mala et al., 1998).

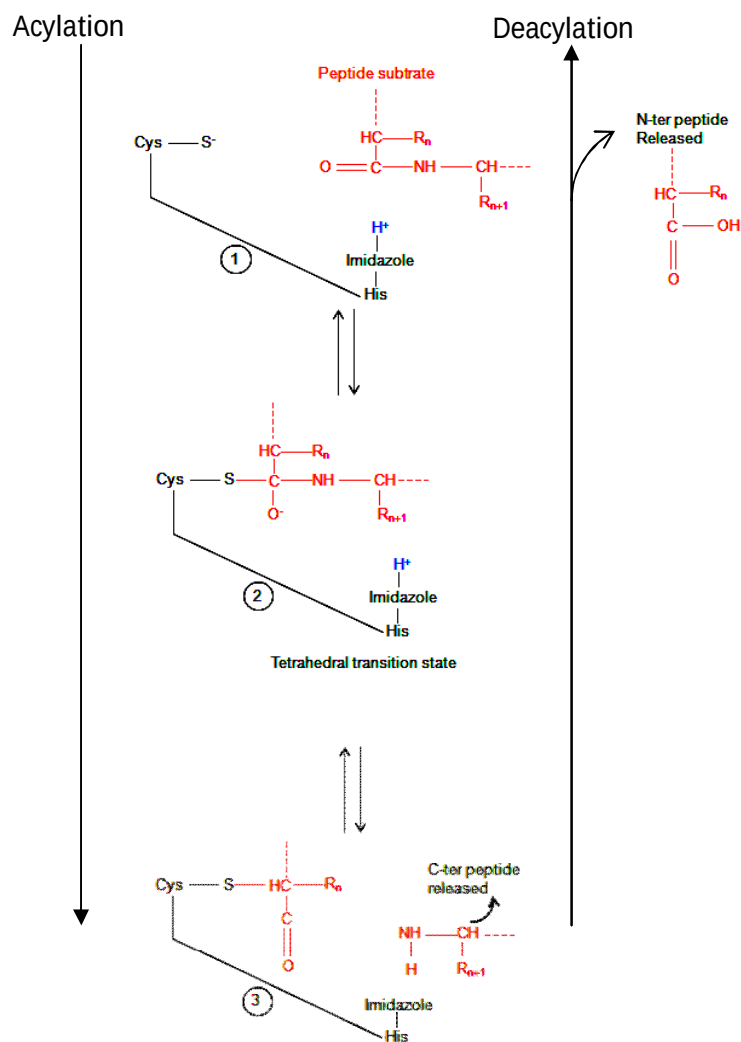


Fig. 5. Mecanismo de acción de las cisteín proteasas.

Tomada de Juárez (2006).

METALOPROTEASAS

También conocidas como peptidasas o hidrolasas son una clase de proteasas encontradas en bacterias y hongos, difieren ampliamente en sus características y su estructura pero la gran mayoría contiene un sitio de unión a zinc que es catalíticamente activo. El mecanismo de reacción catalizado se lleva a cabo por una molécula de agua que se une al zinc sobre el grupo carboxilo de la proteína que conduce a la formación de un intermediario tetraédrico no covalente; este intermediario tetraédrico es descompuesto por transferencia de un protón del ácido glutámico (Fig. 6) (Mala *et al.*, 1998).

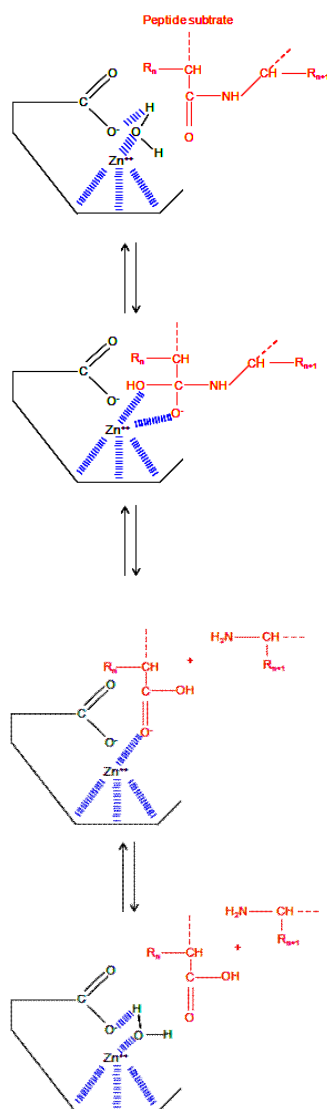


Fig. 6. Mecanismo de acción de las metaloproteasas.

Tomada de Juárez (2006).

PROCESAMIENTO DE LAS METALOPROTEASAS

Muchas proteasas extracelulares bacterianas son sintetizadas como precursores inactivos que se encuentran unidos a un segmento de polipéptido adicional llamado propéptido, este es removido de la proteína madura cuando es secretada al exterior de la bacteria, el propéptido puede funcionar manteniendo la proteasa inactiva dentro de la célula, protegiendo al hospedero contra una secreción anticipada de la peptidasa, también puede jugar un papel importante en el plegamiento de la protoenzima, en su actividad proteolítica o proceso de secreción y en el anclaje temporal a la membrana (Häse y Finkelstein, 1993).

En algunas bacterias Gram negativas que producen proteasas se ha encontrado una proteína llamada elastasa, como un amplio precursor inactivo que indica el proceso proteolítico requerido para la activación de la enzima, sugiriendo que el propéptido forma un complejo no covalente con la porción de elastasa después de la escisión proteolítica en el espacio periplasmático, inhibiendo su actividad (Häse y Finkelstein, 1993).

EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE METALOPROTEASAS

En ciertos casos solo los factores fisiológicos y nutricionales son capaces de afectar la producción de algunos tipos de proteasas, en bacterias Gram negativas se ha identificado un número de genes que regulan la expresión de metaloproteasas y otras proteínas extracelulares, también se han descrito secuencias río arriba del marco de lectura abierto de genes de metaloproteasas con una alta homología a activadores transcripcionales de la familia *LysR* que codifican una proteína de unión a la región intergenica entre el regulador y genes que expresan proteasas, activando la transcripción (Häse y Finkelstein, 1993).

En algunas bacterias que son capaces de expresar peptidasas, el gen de elastasa es el primero de un operón que está transcripcionalmente activado por una proteína reguladora que reconoce una secuencia palindrómica en la región río arriba del gen que codifica la proteasa y otros genes involucrados con la virulencia bacteriana. El gen *lasR* es requerido para la transcripción de los genes que codifican la elastasa, muestra alta homología a *LuxR*, un gen que codifica una proteína reguladora que reconoce secuencias río arriba de genes de proteasas y regula la transcripción, entre algunos factores ambientales el zinc, hierro y calcio

son involucrados en la eficiente producción y regulación de la elastasa (Häse y Finkelstein, 1993).

ANTECEDENTES

Hobb y cols. en el 2002 reportaron para *Haemophilus paragallinarum* la secuencia nucleotídica del gen *hagA* que codifica para la hemaglutinina, obteniendo una proteína de ~39 kDa y reconocida con por un anticuerpo monoclonal anti-hemaglutinina.

García y cols., reportaron en el 2004 que *Gallibacterium anatis*, miembro de la familia *Pasteurellaceae*, secreta metaloproteasas con una masa molecular superior a los 100 kDa, las cuales muestra actividad proteolítica, observada en zimogramas copolimerizados con gelatina porcina al 0.1% o caseína bovina al 1%, bajo diferentes condiciones de pH y temperatura.

Rivero reportó en el 2004 que *Haemophilus paragallinarum* secreta metaloproteasas con una masa molecular mayor a 100 kDa, las cuales muestran actividad proteolítica en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con 0.1% de gelatina porcina. Estas metaloproteasas son activas a pH variable que va de 4 a 9. con un óptimo de 7.5, y a temperaturas de 40, 50 y 60° C con una reducción de actividad a los 70° C, siendo capaces de degradar parcialmente IgG de pollo

En el 2004 Garcia y cols. obtuvieron la secuencia completa de nucleótidos y la correspondiente de aminoácidos de un gen que codifica para una metaloproteasa en *Actinobacillus pleuropneumoniae* de la cual por medio de un análisis *in silico* mostraron que tiene alta homología con diferentes genes que codifican metaloproteasas en bacterias Gram negativas: y lograron identificar que esta metaloproteasa se encuentra dentro de la familia de las gluzinas.

En 2006, Ramón y cols. reportaron que *A. paragallinarum* secreta vesículas de membrana (VM) extracelulares, y que estas contienen proteínas inmunogénicas, proteasas, proteínas putativas RTX, hemaglutininas y ácidos nucleicos, los cuales podrían estar implicados en la patogénesis de la coriza infecciosa.

En 2008, Pérez y cols. encontraron que los serogrupos A y C de *A. paragallinarum* secretan proteínas de 110 (proteína putativa RTX) y 120 kDa las cuales podrían ser tóxicas para embriones de pollo y responsables de su muerte.

JUSTIFICACIÓN

Entre los factores de virulencia presentes en *A. paragallinarum* se encuentran las metaloproteasas, enzimas que poseen actividad proteolítica *in vitro* y capacidad de degradar parcialmente IgA e IgG de pollo (Rivero 2004) por lo que podrían estar relacionadas con la patogenicidad de esta bacteria y dado que *A. paragallinarum* es de gran importancia económica en la industria avícola, es necesario conocer con detalle cada uno de los probables factores de virulencia. Como lo son las metaloproteasas y los genes que codifican estas enzimas, para de este modo tener una mejor comprensión de su participación en la patogénesis y desarrollar nuevas estrategias para combatir esta enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Clonar y caracterizar el gen *pepN* que codifica una metaloproteasa en *A. paragallinarum*.

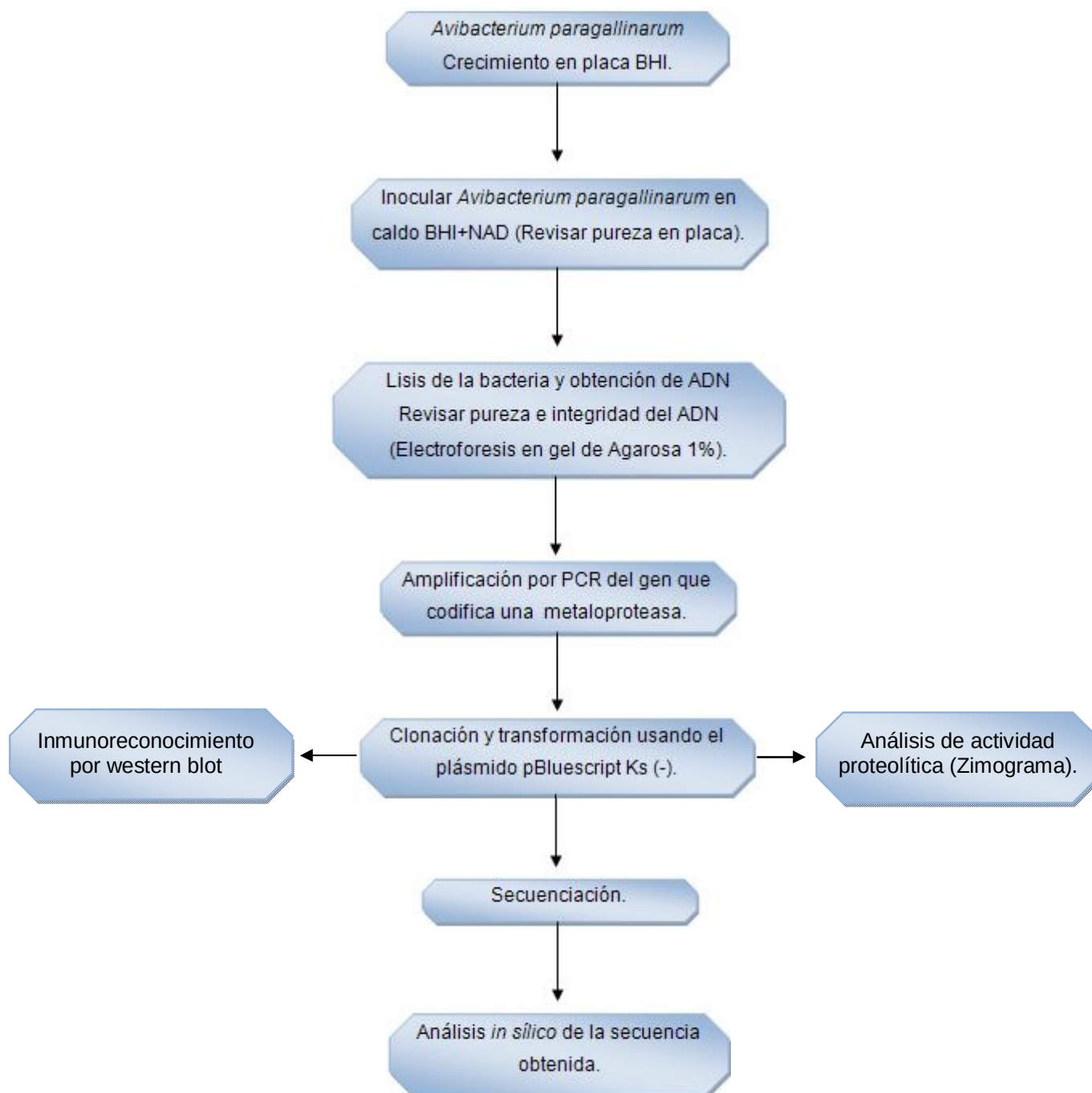
OBJETIVOS PARTICULARES

→ Amplificar y clonar el gen *pepN* que codifica para una metaloproteasa de *A. paragallinarum*.

→ Secuenciar el gen *pepN* de *A. paragallinarum*.

→ Realizar un análisis *in silico* de la secuencia obtenida.

DIAGRAMA DE TRABAJO



MATERIAL Y MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

En el presente trabajo se emplearon las cepas; *A. paragallinarum* 0083, de referencia, serovar A y *Escherichia coli* DH5 α , ambas del cepario del laboratorio de genética de la FES Iztacala.

El crecimiento en placa de *A. paragallinarum* se realizó en el medio de cultivo agar BHI (ver apéndice I), empleando *Staphylococcus aureus* como cepa nodriza para la aportación de Nicotinamida Adenina Dinucleotido (NAD). Las placas se incubaron a 37° C en un medio húmedo con presencia de CO₂ (Terzolo, 2000).

Para el crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α se emplearon placas de agar Luria-Bertani (LB, ver apéndice I) y cuando fue requerido se suplementaron con bromo-chloro-indolyl β -D-galactosido (XGAL, 40 μ g/ml), Isopropil β -D-thiogalactosido (IPTG, 40 μ g/ml) y ampicilina (50 μ g/ml).

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Con base en la secuencia de los genes de proteasas de *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* reportados en el GeneBank (con número de acceso NC_016808.1 y AY545035.1 respectivamente) se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar un dominio conservado del gen que codifica para metaloproteasa (*pepN*), para ello se empleó el programa Primer Select del software DNASTAR, tomando en cuenta que:

- La longitud de los primers fuera entre 17 y 21 pb.
- Que los primers tuvieran entre 40 y 60% de G + C.
- Evitar la formación de horquillas.
- Evitar la formación de dímeros.

En la tabla 2 se muestran las características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *pepN* de *A. paragallinarum*.

Tomado de Martínez M. (2012).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *pepN* de *A. paragallinarum*.

Nombre	Tamaño (Pb)	G-C (%)	Tm (°C)	Secuencia de 5'-3'
pepN F2.F4	30	26.6	54.2	ATGCAACTAAAGCCTAAAGCAAAATATAGAAAAGAT
pepN R3.R4	26	30.7	54.7	TTATTGCAACGCTTTTTCGACTTTCT
pepN F1	21	52.3	54.8	CTGGACCGGTAACCGTATTAC
pepN R1	21	47.6	53.8	GGTAATTGCGATACCGATTGG

En la figura 7 se muestra la ubicación de los oligonucleótidos para la amplificación del gen *pepN*.

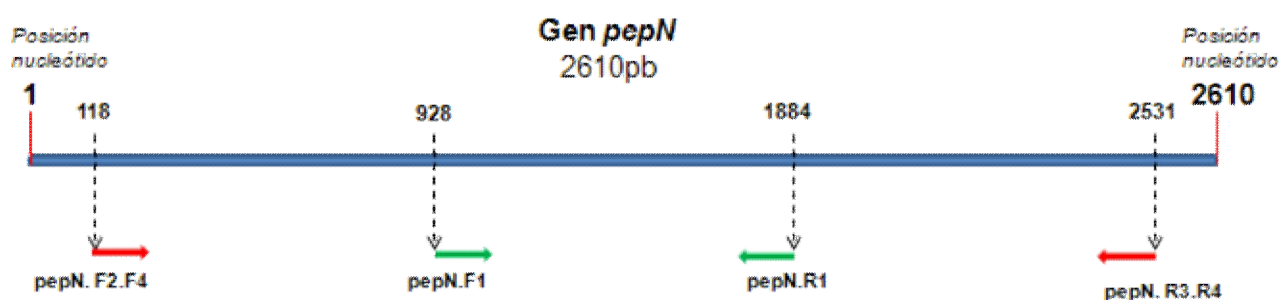


Fig. 7. Posición de los oligonucleótidos en el gen *pepN* de *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Condiciones de amplificación utilizando los oligos *pepN* F2.F4 y *pepN* R3.R4

94° C	3 minutos	Inicio	
94° C	30 segundos	Desnaturalización	} 30 ciclos
56° C	30 segundos	Alineamiento	
72° C	1.30 minutos	Elongación	
72° C	3 minutos	Elongación final	
15° C	4 minutos	Conservación	

Condiciones de amplificación utilizando los oligos *pepN* F1 y *pepN* R1

95° C	2 minutos	Inicio	
94° C	30 segundos	Desnaturalización	} 25 ciclos
54° C	30 segundos	Alineamiento	
68° C	1 minuto	Elongación	
72° C	3 minutos	Elongación final	
4° C	4 minutos	Conservación	

ASLAMIENTO DE ADN CROMOSÓMICO DE *Avibacterium paragallinarum*.

El ADN genómico de *A. paragallinarum* se extrajo utilizando el método fenol-cloroformo descrito por Sanbroock *et al.*, 1989 (Ver Apéndice II), posteriormente este ADN que sometido a una electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizado a través de un transiluminador Vilber Lourmat Kodak Gel Logic 100 Imaging System. La concentración del ADN obtenido fue cuantificada utilizando un Thermo Scientific NanoDrop 2000.

Las condiciones de PCR descritas anteriormente se utilizaron para amplificar el gen *pepN* de *A. paragallinarum* usando ADN cromosómico como templado y los oligos previamente diseñados, la reacción se llevó a cabo utilizando GoTaq® Green Master Mix 2X, que contiene; Taq DNA polimerasa, 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, 3mM MgCl₂ a un pH de 8.5, mezclando los siguientes componentes:

MEZCLA PARA 55 µL DE REACCIÓN.

Componente	Volumen	Concentración
GoTaq® Green Master Mix, 2X	25.0µl	1X
Primer Upper	1.0 µl	0.1-1 µM
Primer Lower	1.0 µl	0.1-1 µM
DNA templado	3 µl	< 250ng
Agua libre de nucleasa	25 µl	

El producto de PCR obtenido fue separado electroforéticamente y visualizado en un gel de agarosa al 1%

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Para la preparación de células competentes se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5α, la cual fue crecida en placa de agar LB a 37° C durante 24 horas. Posteriormente se tomó una colonia de esta placa y se inocularon 5 ml de medio líquido LB incubando a 37° C durante toda la noche. De este cultivo se tomó 1 ml y se inocularon 30 ml de medio líquido LB en un matraz nefelométrico a 37° C con fuerte agitación, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0.4 a 0.6. El cultivo se colocó en hielo por 15 min. y fue centrifugado a 5000 rpm durante 10 min. a 4° C: se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 15 ml de solución reguladora I estéril fría (ver apéndice II), se incubaron en hielo (entre 2-4 horas). Se centrifugó nuevamente a 5000 rpm, se deseó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 ml de solución II (ver apéndice II) y finalmente se hicieron alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf estériles de 1.5 ml y se congelaron inmediatamente a - 40° C.

CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR EN EL PLÁSMIDO pBLUESCRIPT KS (-) Y SELECCIÓN DE LAS CLONAS TRANSFORMANTES EN PLACA DE AGAR LB.

Para la ligación se utilizó la enzima T4 ligasa de productos Promega.[®] La siguiente mezcla se realizó con los componentes indicados, mezclando cuidadosamente e incubando a 16° C toda la noche.

Componente	Volumen	Concentración
Producto de PCR purificado	10µl	17ng
Plásmido (Ks-)	5µl	100ng
Buffer de ligación	1µl	10X
Enzima ligasa	1µl	1 Unidad
Agua desionizada	10µl	

Posteriormente se realizó la transformación por choque térmico de células competentes de *Escherichia coli* DH5α siguiendo el protocolo descrito por Sanbroock *et al.*, 1989. La selección de las células transformantes se realizó en placas de medio LB que contenían Ampicilina (50 µg/ml), IPTG (20 µg/ml) y X-gal (20 µg/ml), obteniendo colonias blancas y azules, de las que se recuperaron las blancas debido a que el producto amplificado de *A. paragallinarum* fue insertado en el plásmido pBluescript KS (-), interrumpiendo el gen lacZα que codifica para la enzima β-galactosidasa la cual cataliza la hidrólisis de β-galactósidos a monosacáridos, metabolizando la X-gal en galactosa y un compuesto químico insoluble que colorea las colonias bacterianas de azul. Al ser interrumpido este gen por el inserto las bacterias no son capaces de hidrolizar la X-Gal por lo que las colonias blancas son las que probablemente hayan podido recombinar el inserto.

De las colonias blancas obtenidas se extrajo DNA plásmidico utilizando el método de lisis alcalina descrito por Sanbroock *et al.*, 1989 (ver anexos) este material genético fue utilizado como templado para realizar PCR y corroborar la presencia del inserto de acuerdo a las condiciones y usando los oligonucleótidos *pepN* F2.F4 y *pepN* R3.R4 descritos previamente.

SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS *in silico*

La secuenciación se realizó utilizando el producto de PCR que se obtuvo para corroborar la presencia del inserto en el plásmido pBluescript KS (-) por medio de un secuenciador ABI prisma 3100, que utiliza el método *BIG DYE Terminator fluorescence based sequencing*. Para el análisis *in silico* de dicha secuencia se utilizó el programa NCBI/Blast nucleotide (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), posteriormente se realizó la traducción del gen con el programa Expasy (www.expasy.org/tool/) para determinar la secuencia de aminoácidos y MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin.html>) para realizar un alineamiento con secuencias de genes *pepN*, reportadas en otras bacterias.

MANIPULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SECRETADAS

Para el análisis de las proteínas. *E. coli* DH5 α y *A. paragallinarum* se crecieron en 10 ml de medio TSB, este último adicionado con 10 μ g de NAD/ml; así como las cepas de *Escherichia coli* conteniendo los plásmidos Ks (-) y Ks-*pepN-Avpg* adicionando 2 μ l de ampicilina (50 μ g/ml), 16 μ l de IPTG (20 μ g/ml) y 16 μ l de X-Gal (20 μ g/ml), incubando a 37° C por 24 horas en constante agitación.

Una vez que crecieron los microorganismos, la suspensión celular se centrifugó a 11,000 rpm durante 30 min. a 4° C; el sobrenadante fue precipitado con (NH₄)₂SO₄ al 70% de saturación durante 24 horas. Después de transcurrido este tiempo se volvió a centrifugar a 11,000 rpm durante 25 minutos recuperando la pastilla y resuspendiéndola en Tris-HCl 20 mM pH 7.5, las muestras fueron almacenadas en congelación hasta ser utilizadas (Juarez, 2006).

ZIMOGRAMAS

La actividad proteolítica de las proteínas separadas electroforéticamente se puso en evidencia en geles de sustrato copolimerizados con gelatina porcina al 0.1% (estas muestras no fueron hervidas ni tratadas con B-mercaptoethanol). Después de la separación electroforética los geles fueron tratados con Tritón X100 al 2.5% durante 1h a 37° C y enseguida se les agregó el buffer Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM a pH 7.5, incubando a 37° C. por 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo, el gel fue teñido con colorante Azul de coomassie. La actividad proteolítica se puso de manifiesto por la formación de zonas claras en el gel (Juarez, 2006).

INMUNO RECONOCIMIENTO

La muestra que contenía la actividad proteolítica fue hervida en presencia B-mercaptoethanol durante 7 minutos, se separó por electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al

10% de concentración y se transfirió electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. Al término de la transferencia la membrana se colocó en agitación en un recipiente con PBS Tween-20 0.1% y leche en polvo descremada al 5%, enseguida la membrana se enjuagó 3 veces durante 10 min. con PBS Tween y se le agregó el anticuerpo primario (suero contra la proteasa purificada de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 diluido 1:1000), posteriormente la membrana se enjuagó 3 veces con PBS Tween y se incubó con el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-conejo, diluido 1:1000), finalmente se realizaron 3 lavados con PBS Tween. Para poner en evidencia la reacción antígeno-anticuerpo, se usó una solución de Diaminobencidina y H₂O₂. La reacción se detuvo colocando la membrana en agua destilada.

RESULTADOS

CRECIMIENTO DE *A. paragallinarum*

Crecimiento de *A. paragallinarum* en placa de agar BHI, junto a la bacteria nodriza *Staphylococcus aureus* que proporciona el NAD necesario para su crecimiento, (Fig. 8).

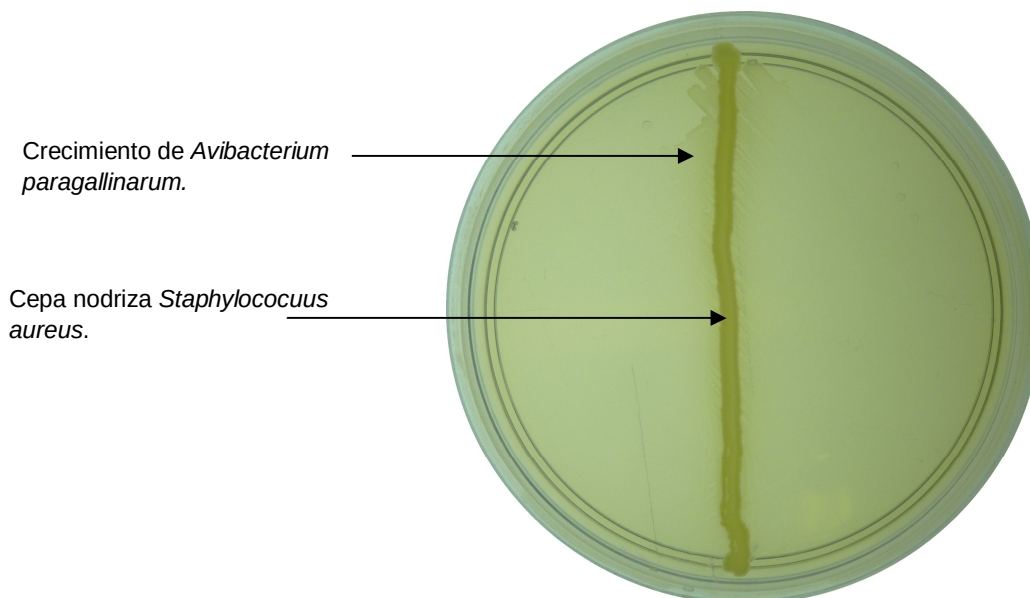


Fig. 8. Crecimiento de *A. paragallinarum* en placa BHI paralelo a la cepa nodriza *Staphylococcus aureus*.

OLIGONUCLEÓTIDOS

Se obtuvieron dos pares de oligonucleótidos descritos en la tabla 2, que amplifican las regiones externas e internas del gen *pepN* (Fig. 7), en las siguientes concentraciones.

F1: 90.9 nMoles = 580 µg hidratado con 272 µl

R1: 95.4 nMoles = 652 µg hidratado con 286.2 µl

F2.F4: 101.5 nMoles = 940 µg hidratado con 304.5 µl

R3.R4: 91.5 nMoles = 720 µg hidratado con 274.5 µl

Para llevar a cabo las reacciones de PCR se realizó una dilución de 1:30 para cada primer, debido a que estos se encuentran originalmente muy concentrados y esto puede provocar alineamientos inespecíficos en alguna o varias regiones del genoma de *A. paragallinarum*.

Aislamiento de ADN cromosómico de *A. paragallinarum*.

Se obtuvieron 40 µl de ADN genómico íntegro de *A. paragallinarum* a una concentración de 205.5 ng/µl (Fig. 9).

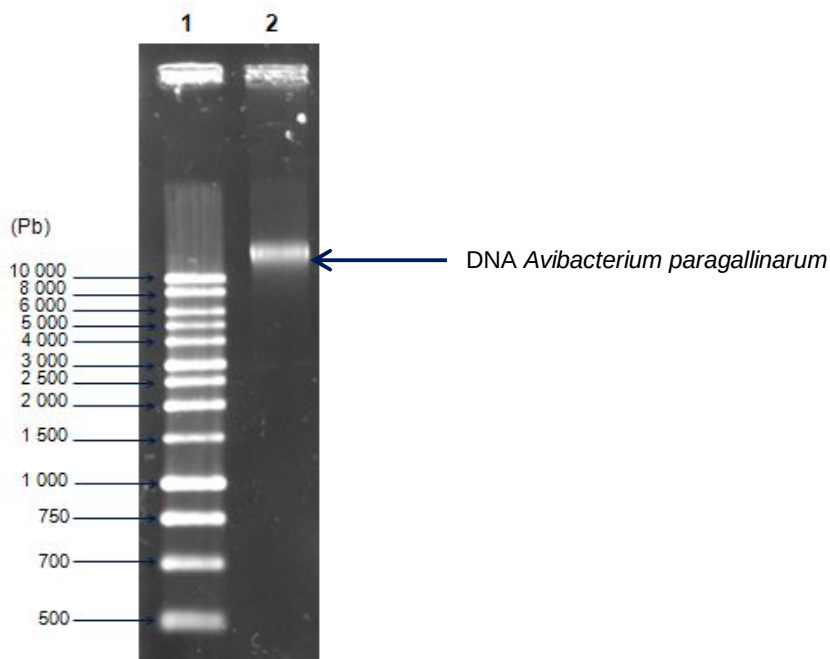


Fig. 9. Gel de Agarosa al 1%. Se muestra el marcador de peso molecular de 1kb DNA ladder en el carril 1 y el DNA extraído de *A. paragallinarum* en el carril 2.

Utilizando ADN genómico de *A. paragallinarum* y los oligos *pepN* F2.F4 y *pepN* R3.R4 se amplificó un producto de 2700 pb, utilizando un termocycler CR Corbett Research®, el amplicón fue visualizado por corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1 %. Obteniendo 55 µl de un producto de 2700 pb con una concentración de 105 ng/µl (Fig. 10).

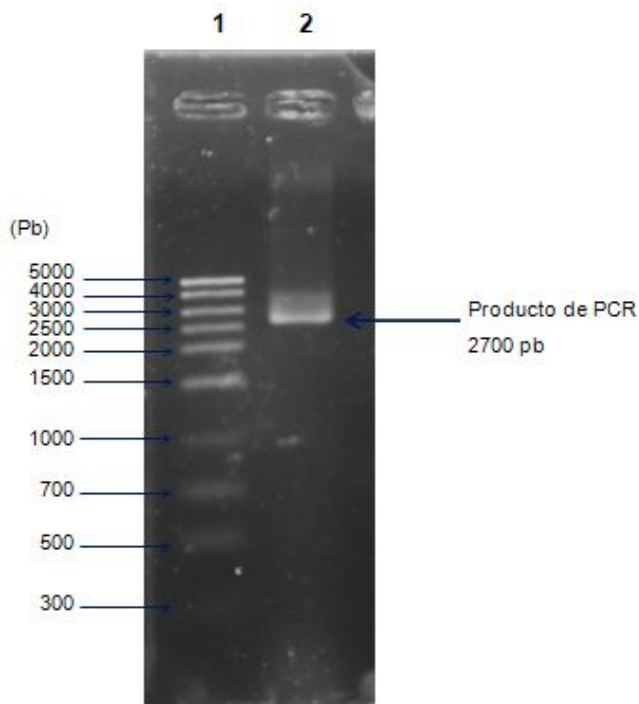


Fig. 10. Gel de Agarosa al 1%, se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular de 1kb DNA ladder y en el carril 2 el producto amplificado de aproximadamente 2700pb.

CLONACION DEL PRODUCTO DE PCR Y SELECCIÓN DE LAS CLONAS TRANSFORMANTES.

El plásmido pBluescript Ks (-) purificado, fue digerido utilizando la enzima de restricción EcoRV (5'-GAT|ATC-3') y puesto a ligar con el producto de PCR de 2700 pb previamente amplificado, generándose el plásmido Ks-*pepN*-*Avpg* (Fig. 11, A), este fue utilizado para transformar a *E. coli* DH5α generando varias transformantes (Fig. 11, B).

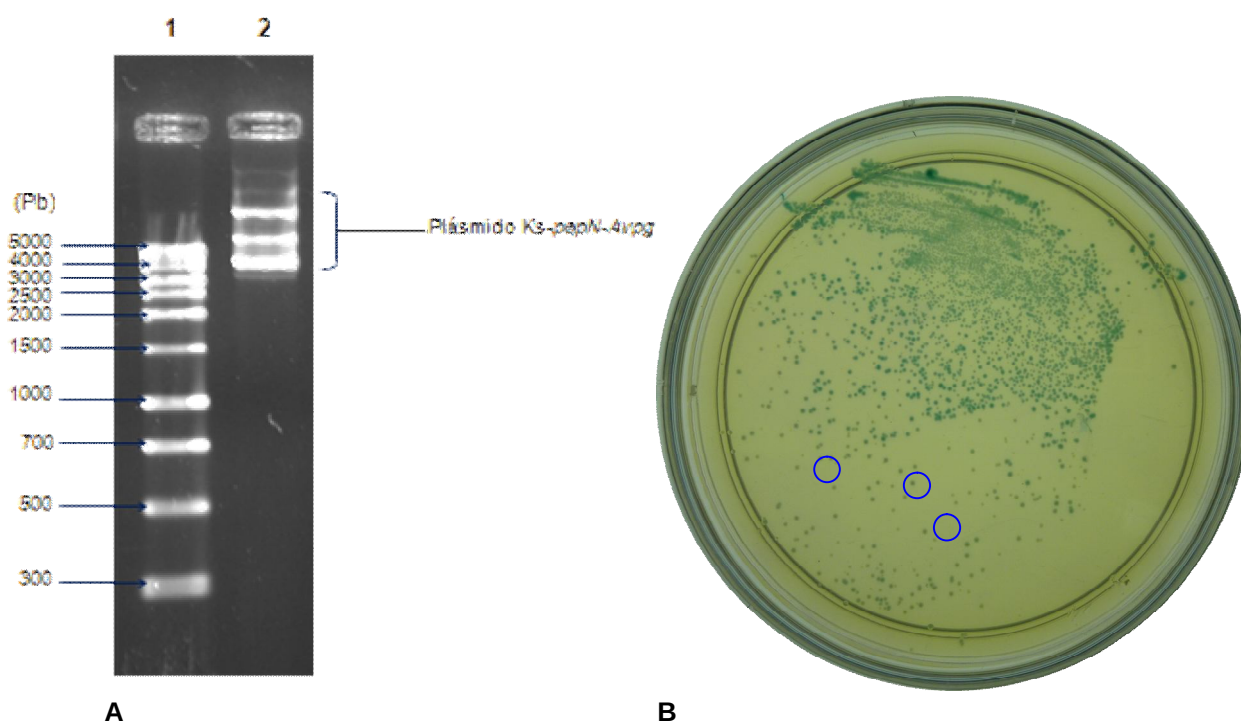


Fig. 11. **A.** Gel de agarosa al 1%. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 1 Kb DNA ladder y en el carril 2 se muestra el plásmido Ks- *pepN*-Avpg. **B.** Caja Petri con medio LB, IPTG, X-GAL y Ampicilina, donde se espatularon las bacterias transformadas. Los círculos azules indican las colonias blancas que contienen el vector con el inserto que interrumpe el gen *lacZ*.

De las colonias blancas transformantes de *E. coli* se extrajo ADN plásmidico (Ks-*pepN*-Avpg) con el fin de corroborar que éste contenía insertado el gen *pepN*. Este ADN se utilizó como templado para realizar PCR además de un control con el plásmido sin inserto. En la figura 12 se muestra el amplificado de 2700 pb del gen *pepN* insertado en el plásmido Ks (-) confirmando la presencia de un plásmido Ks-*pepN*-Avpg mientras que en el control no se obtuvo ningún producto (Dato no mostrado).

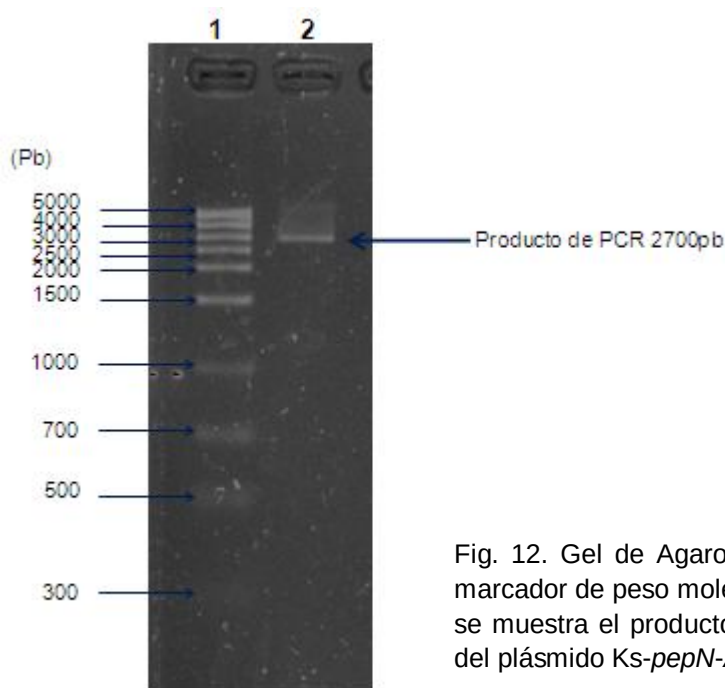


Fig. 12. Gel de Agarosa al 1%, en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 1kb DNA ladder y en el carril 2 se muestra el producto de PCR de 2700 pb obtenido a partir del plásmido Ks-*pepN-Avpg*.

SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS *in silico*

El producto de amplificación que se obtuvo usando los oligos *pepN* F2.F4 y *pepN* R3.R4 fue purificado con el kit QIAquick PCR Purification y posteriormente secuenciado en un secuenciador ABI prism 3100, obteniéndose dos secuencias correspondientes a los segmentos 5' y 3' del producto amplificado. Cuando estas secuencias fueron analizadas con el programa NCBI/Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se encontró que presentaban una identidad del 99% con las regiones ubicadas en las posiciones 118-952 y 1556-2529 del gen *pepN* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Fig. 13).

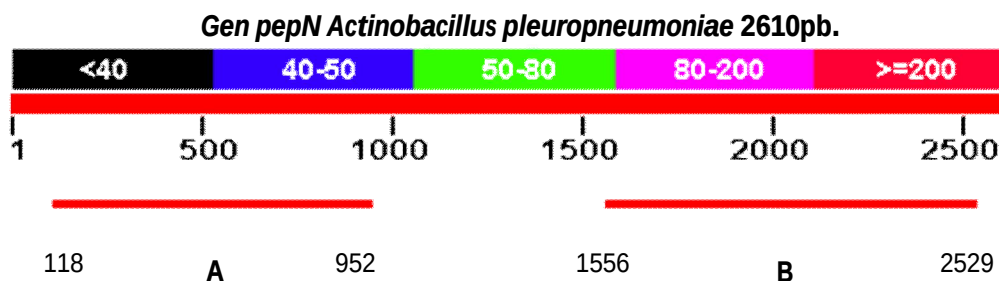


Figura 14. BLAST de la secuencia parcial del gen *pepN* de *A. paragallinarum* obtenida. La línea roja **A** indica la posición correspondiente al segmento de secuencia donde se utilizó el oligonucleótido *pepN* F2.F4 en la posición 118 al 952 y la línea roja **B** a la secuencia donde se utilizó el oligonucleótido R3.R4 en la posición 1556 al 2531.

Para obtener la secuencia nucleotídica de la región interna se realizó una amplificación utilizando los oligos *pepN* F1 y *pepN* R1 usando como templado ADN cromosómico de *A. paragallinarum* (Fig. 9). De esta amplificación se obtuvo un producto de aproximadamente 1000 pb a una concentración de 98 ng/μl (Fig. 14). Este producto fue purificado y clonado utilizando el mismo plásmido pBluescript Ks (-). Los plásmidos recombinantes se usaron para transformar a *E. coli* DH5α y se seleccionaron transformantes blancos en medio con X gal.

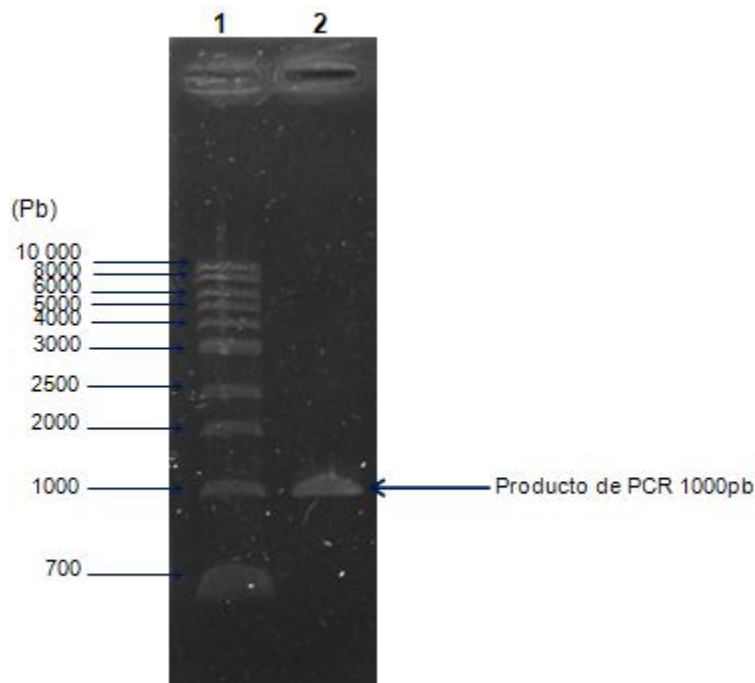


Fig. 14 Gel de Agarosa al 1%, en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 1kb DNA ladder y en el carril 2 el producto amplificado de aproximadamente 1000 pb.

La secuencia obtenida a partir del producto de PCR de 1000 pb utilizando los oligos *pepN* F1 y *pepN* R1 fue analizada con el programa NCBI/Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este análisis permitió establecer que corresponde a la región interna del gen *pepN*, la cual está ubicada en la posición nucleotídica 929-1884 tomando como referencia la secuencia del gen *pepN* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Fig. 15)

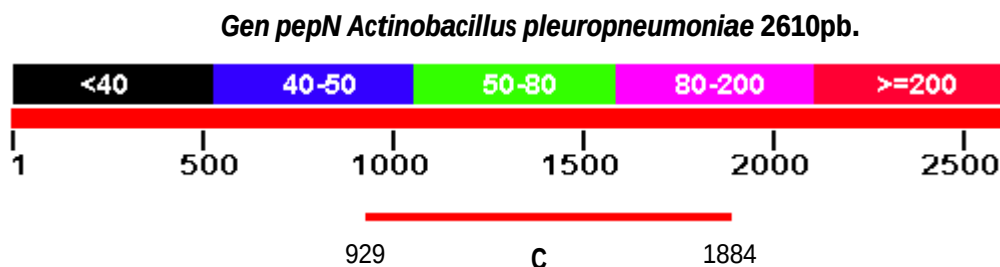


Figura 15. BLAST de la secuencia obtenida. La línea roja **C** indica la posición desde el nucleótido 929 al 1884 que corresponden a la región interna de la secuencia que se obtuvo a partir del producto de PCR donde se utilizaron los oligonucleótidos *pepN* F1 y *pepN* R1.

Una vez que se obtuvieron las secuencias parciales, estas se alinearon y ensamblaron por medio del programa (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), utilizando como base el gen *pepN* de *A. pleuropneumoniae*.

La secuencia parcial ya ensamblada iniciaba a partir del nucleótido 118 y terminaba en el 2529 dentro del marco de lectura (ORF) del gen *pepN* de *A. paragallinarum*, por lo que se diseñaron nuevos oligonucleótidos a partir de secuencias conservadas en regiones UTR del genoma de *A. pleuropneumoniae* para amplificar y secuenciar los extremos faltantes del gen. Para amplificar este gen se utilizaron las mismas condiciones empleadas para obtener el amplicón con los oligonucleótidos *pepN* F2.F4 y *pepN* R3.R4.

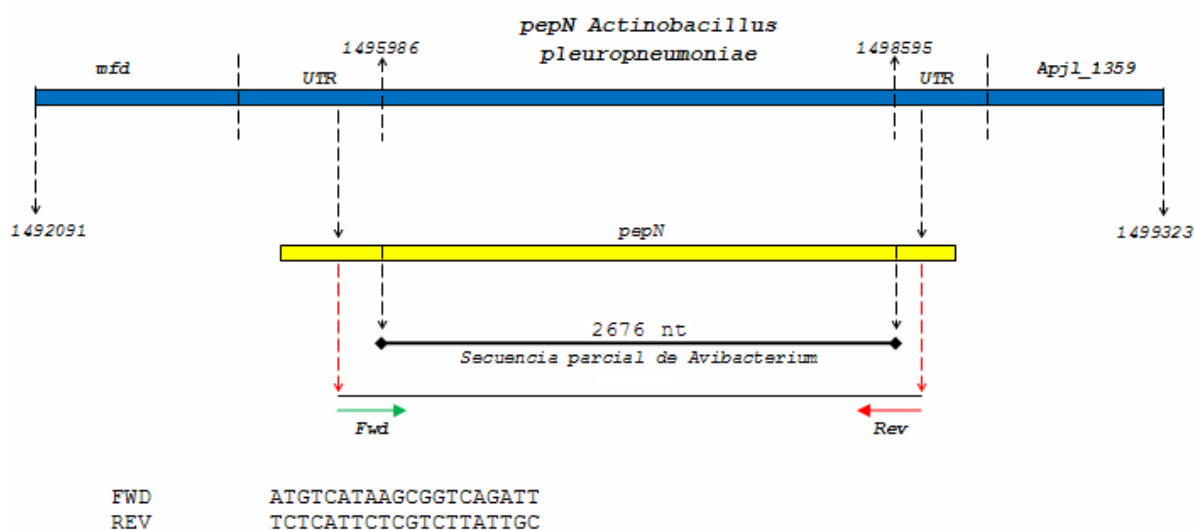


Fig. 16. Ubicación de las UTR del gen *pepN* de *A. pleuropneumoniae* utilizadas en el diseño de oligonucleótidos para amplificar el gen *pepN* de *A. Pleuropneumoniae*. Se indican las posiciones donde inicia la amplificación.

Para amplificar el gen completo se utilizaron oligonucleótidos diseñados a partir de las regiones UTR (*pepN* Fwd y *pepN* Rev) ubicadas a los extremos del gen *pepN* en *A. pleuropneumoniae* bajo las mismas condiciones utilizadas con los primers *pepN* F2.F4 y *pepN* R3.R4 (Fig. 16). El producto amplificado de 3000 pb, similar al de la figura 12, fue clonado y secuenciado. Posteriormente la secuencia obtenida del gen *pepN* de *A. paragallinarum* fue analizada con el software (<http://www.ncbi.nlm.gov/gorf/gorf.html>) para buscar un posible ORF, que dio como resultado una secuencia completa de 2676 pb, que inician con una secuencia ATG que codifica para una metionina y termina con una secuencia TAA que codifica para una señal de paro.

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL GEN *pepN* de *A. paragallinarum*

ATGCAACCTAAAGCAAAATATAGAAAAGATTATCGCGCGCCGGATTTTACTATCACAAATATTTATCTCG
ATTTCCAACCTTGACCCGAACCGTACTTTCGTCACCTCAACCTTAACCGTAGAACGTAAAAATAATGAGGC
GACGCATCTCCGTTTAGACGGACATAGTTTTGATTTCTCTCGTTAAAGTTAAACGGCGAAACTTTTTGAA
CGTTTTGAAAAAGATAACGACTCTTTAACCGTTGATGTTACAGGCATCAGCTCTCCGTTTGAATTACAAA
TTGAAACCGGTTTTAAATCCGGCACAACACCTCTTTACAAGGTTTATACCAATCGGGCGACGGTATTTG
TACCAATGTGAAGCGGAAGGCTTCCGCCAAATTACTTATATGTTGGATCGCCCGGATGTACTTGCAAAA
TATCGTACAAAAATCACCGCTTCCAAAGCGAAATATCCGTTTTTACTTTCCAACGGTAATCGTATTGCAC
AAGGCGATTTAGAAGACGGTCGCCATTGGGTGCAATGGAAGATCCGTTCTTTAAACCAAGCTATTTATT
CGCATTAGTTGCCGGCGATTTTGATCTGTTACAAGATAAATTCATCACAAAAGTGGTCGAGAAGTAGCA
TTAGAGATCTATGTTGATCGCGGCAATTTAGATCGTGCCGGTTGGGCGATGGAAAGTTTAAACGTTTCA
TGAGATGGGATGAAGATCGCTTCGGCTTAGAATACGATTTAGATATCTATATGATTGTGCGCAGTCGATTT
CTTTAATATGGGCGCAATGGAAAACAAAGGCTTAAATGTTTTCAACTCTAAATTTGTGCTGGCAAAACCG
GAAACTGCCACCGATACCGACTATTTAGATATTGAGAGCGTAATTGCGCACGAATATTTCCATAACTGGA
CCGGTAACCGTATTACCTGTGCGAGATTGTTCCAATTAAGCCTTAAAGAAGGCTTGACCGTGTTCCGCGA
TCAGGAATTTACTTCGGATTTATGGTCACGTCCGGCAAAACGTATTGAAGACGTACGCTTATTACGTGCC
GTGCAATTTGCCGAAGACGCCAGTCCGATGGCGCACCCGATTGTCGGGAAAAAGTGATTGAAATGAATA
ATTTCTACACCGTGACCGTCTATGAAAAAGGCGCGGAAGTGATTGATGATTGATTGATTGATTGATTGATT
AGAAAAATTTCAAAAAGGGATGCAATTATATGTTGCGGAAAAATGACGGATCTGCGGCGACTTGTGAAGAT
TTCGTTTCGGCAATGGAGCGTGCTTCAGGTATTGATTTAACCAATTCCGCCGTTGGTACAACCAATCCG
GTACGCCTGAACTGAGCGTAAGTGACGAATATGATGAAATGCACCATATCTACCGTTTGACGTTTCACA
ACATACAGCGCCGACCGCGGATCAATTGAAAAAGTAAACCTACATATTCGGTTCAAAATCGAGTTATAT
AGCGAACAAGACGGCACGCCGATTAGTTTACAATTTGAAGGTACTACATTAAACAATGTGCTGGATGTCG
TACAAGAGCAACAAACCTTCGAATTTTATAATGTAATGCACAAGCCCGTACCTGCGCTGTTATGCGATTT
TTCTGCACCGTTGCGTTTAGATTATGCCTATACCAATGCGCAATTAATTGCCTTACTCAAATTCGCACGG
AATGATTTTGTACGCTGGGATGCGGCGCAAACCTTTATTTAATAACGAGTTACGTCTGAATTTGGCACTCC
ATCAATCGGGAGAGGCCTTTACTTTCTCCGCCGAATTAACCTGAAGCGTTGGTTTATTTATTGGATAACTA
TGAATCGAATCCGGAATTAACCGCTTTAATGCTAACGTTACCGAAAGAAACCGAATTCGCCGAATTTATC
AAAACAATTGATCCAATCGGTATCGCAATTACCGTGAATTTATGTTACGCACCATCGCCGAAACCTTAC
GCGATCGTTTACTGAACGTATATAATCGTAATCGTTGCGACGCTTATCGTGTGCGGCGGAAGATATGTC
AAAACGTGCGTTGCGCAATTTATGTTTATCTTATTTAGCCTTTACCGATTTAGGTAACGGTTTAACTTAT
AAACATTATCAACAAGCGGATAATATGACCGATACTTTAGCGGCACTTTCCGCCGCTACTAAAGCGCAAT
TAGCTTGTGCTGATCAATTGTTAGCGGACTTCAACAGAAATGGCATCATGACGGCTTAGTGATGGATAA
ATGGTTTATGCTCCAAGCGACAAGACCGGACGACAACGTGCTGGAAATCGTTCAAGAGCTACTTAACCAT
CGTAGTTTTAATTTTAAACAATCCGAACAGATTACGTGCGCTAGTCGGTGCGTTCTGTAGCCAGAATCCGA
AAGCCTTCCATGCGATTGACGGCTCCGGCTATCGATTCTTAGTGGATATTCTAATCAAATTAACGATAG
TAACCCACAAGTCGCATCACGTTTAAATCGAGCCGTTGATTAACTTTCTCGTTATGATAACCAACGTCAA
ACGTTAATGAAGCGCGGTTTGAACGTCTTCGCGGCTTGGATAATTTAGCGCGCGATTTATATGAGAAAG
TCGAAAAAGCGTTGCAAAAGCGCGGTTTGAACGTCTTCGCGGCTTGGATAATTTAGCGCGCGATTTATA
TGAGAAAGTCGAATAA

La secuencia de nucleótidos del gen *pepN* de *A. paragallinarum* fue analizada con el programa NCBI/Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), lo que permitió encontrar similitud y cobertura con genes de aminopeptidasas de diferentes bacterias (Tabla 3).

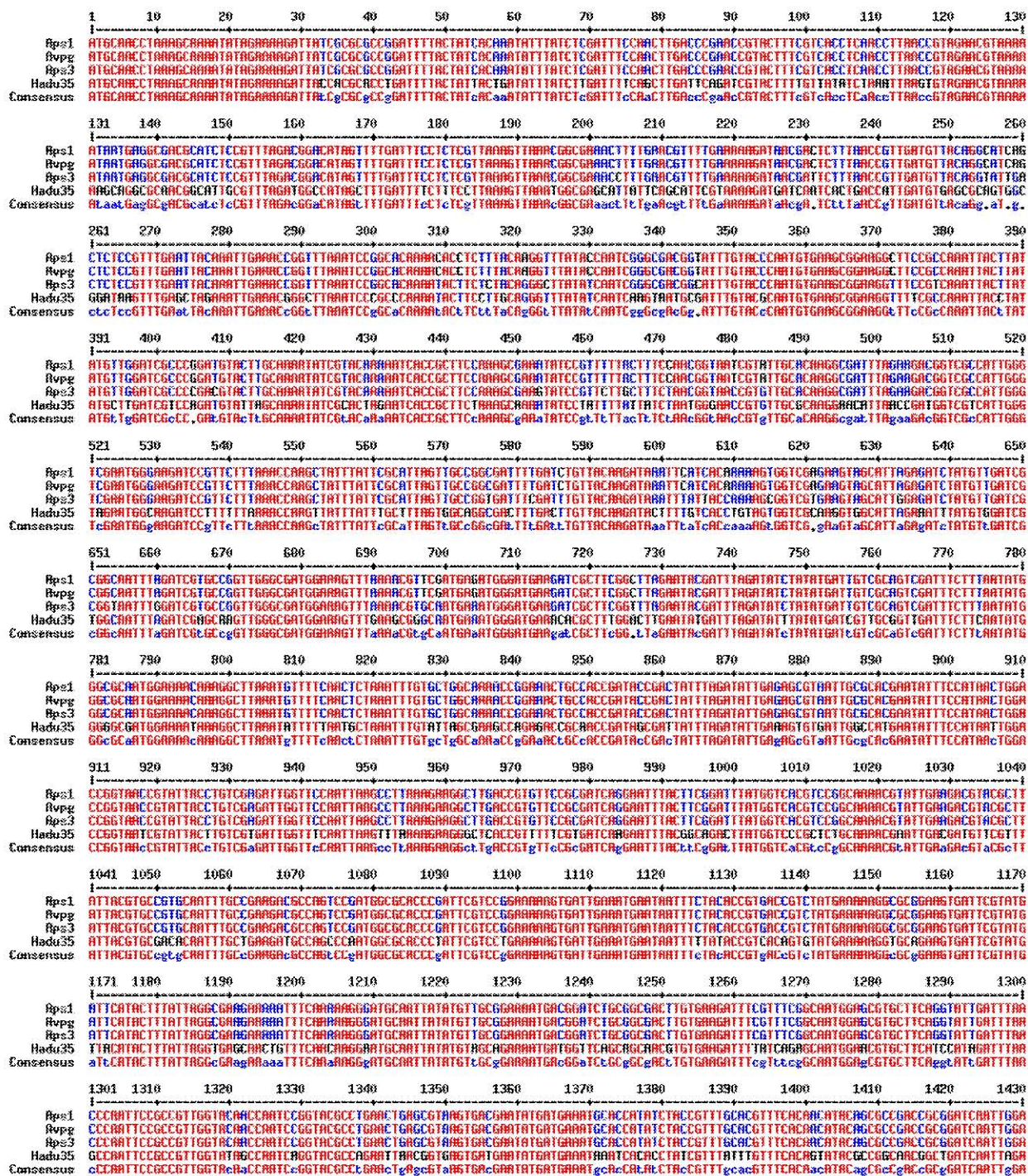
Tabla 3. Secuencias de genes de aminopeptidasas que producen alineamientos significativos con la secuencia del gen *pepN* de *A. paragallinarum*.

Microorganismo	Cobertura	Máxima identidad
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20 serotype 5b	100%	99%
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> aminopeptidase gene	100%	99%
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 7 str. AP76	100%	99%
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 3 str. JL03	100%	98%
<i>Haemophilus ducreyi</i> strain 35000HP complete genome	97%	76%
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ANH9381	48%	78%
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1	48%	78%
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D7S-1	48%	78%
<i>Haemophilus influenzae</i> F3031	47%	79%
<i>Haemophilus somnus</i> 2336	42%	76%
<i>Haemophilus somnus</i> 129PT	42%	76%
<i>Escherichia coli</i> Xuzhou21	41%	74%
<i>Escherichia coli</i> 055:H7 str. CB9615	41%	74%

Múltiple alineamiento del gen *pepN* de *Avibacterium paragallinarum*

Para poder determinar la identidad de la secuencia obtenida y compararla con otros genes *pepN* reportados para miembros de la familia *Pasteurellaceae* se utilizó el programa MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). En la figura 17 se observa este alineamiento con las secuencias de aminopeptidasas de *A. pleuropneumoniae* (Ap), con número de acceso AY545035.1 que presenta un 99% de similitud, *A. pleuropneumoniae* serovar 3 (Ap3), con un 98% número de acceso CP000687.1 y 76% con *Haemophilus ducreyi* cepa 35000HP número de acceso AE017143.1.

Figura 17. Alineamiento de la secuencia del gen *pepN* de *A. paragallinarum* (Avpg) con *A. pleuropneumoniae* serovar 1 (Aps1), *A. pleuropneumoniae* serovar 3 (Aps3) y *H. ducreyi* 35000HP (Hadu35).



	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
Aps1	AAAGTAAACCTACATATTCCTGTCARAACTCAGGTTATATAGCGAACAGAGCGGACCGCGATTAGTTTACAAATTTGAAGGTACTACATTAAACCAATGTGCTGGATGTCGTACAGAGCGAACCAACCTTC													
Aps3	AAAGTAAACCTACATATTCCTGTCARAACTCAGGTTATATAGCGAACAGAGCGGACCGCGATTAGTTTACAAATTTGAAGGTACTACATTAAACCAATGTGCTGGATGTCGTACAGAGCGAACCAACCTTC													
Hadu35	AAAGTAAACCTACATATTCCTGTCARAACTCAGGTTATATAGCGAACAGAGCGGACCGCGATTAGTTTACAAATTTGAAGGTACTACATTAAACCAATGTGCTGGATGTCGTACAGAGCGAACCAACCTTC													
Consensus	AAAGTAAACCTACATATTCCTGTCARAACTCAGGTTATATAGCGAACAGAGCGGACCGCGATTAGTTTACAAATTTGAAGGTACTACATTAAACCAATGTGCTGGATGTCGTACAGAGCGAACCAACCTTC													
	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
Aps1	GAATTTTCATATGTATATGCACAGCCCGTACCTGCGCTGTTATGCGATTTTCTGCAACGGTGGCTTTAGATTATGCTATACCAATGCGCAATTAATGTCCTTACTCAAAATTCGCACGGGAATGATTTTG													
Aps3	GAATTTTCATATGTATATGCACAGCCCGTACCTGCGCTGTTATGCGATTTTCTGCAACGGTGGCTTTAGATTATGCTATACCAATGCGCAATTAATGTCCTTACTCAAAATTCGCACGGGAATGATTTTG													
Hadu35	GAATTTTCATATGTATATGCACAGCCCGTACCTGCGCTGTTATGCGATTTTCTGCAACGGTGGCTTTAGATTATGCTATACCAATGCGCAATTAATGTCCTTACTCAAAATTCGCACGGGAATGATTTTG													
Consensus	GAATTTTCATATGTATATGCACAGCCCGTACCTGCGCTGTTATGCGATTTTCTGCAACGGTGGCTTTAGATTATGCTATACCAATGCGCAATTAATGTCCTTACTCAAAATTCGCACGGGAATGATTTTG													
	1691	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
Aps1	TACGCTGGGATGCGGCGCAAACTTTATTTAATACAGGTACGCTCTGATTTTGGCACTCCATCAATCGGAGAGGCGCTTTACTTTCTCGCGCAATTAATGAGGCGTTGGTTTATTTATGGATACCTA													
Aps3	TACGCTGGGATGCGGCGCAAACTTTATTTAATACAGGTACGCTCTGATTTTGGCACTCCATCAATCGGAGAGGCGCTTTACTTTCTCGCGCAATTAATGAGGCGTTGGTTTATTTATGGATACCTA													
Hadu35	TACGCTGGGATGCGGCGCAAACTTTATTTAATACAGGTACGCTCTGATTTTGGCACTCCATCAATCGGAGAGGCGCTTTACTTTCTCGCGCAATTAATGAGGCGTTGGTTTATTTATGGATACCTA													
Consensus	TACGCTGGGATGCGGCGCAAACTTTATTTAATACAGGTACGCTCTGATTTTGGCACTCCATCAATCGGAGAGGCGCTTTACTTTCTCGCGCAATTAATGAGGCGTTGGTTTATTTATGGATACCTA													
	1821	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
Aps1	TGAACTCGATCCGGATTAACCGCTTTATGCTACGTTACCGAAGAGACCGAATTCGCCGATTAATTCARACCAATGATCCATCGGTATCGCAATTAACCGGATTAATGATGACGACCATCGCC													
Aps3	TGAACTCGATCCGGATTAACCGCTTTATGCTACGTTACCGAAGAGACCGAATTCGCCGATTAATTCARACCAATGATCCATCGGTATCGCAATTAACCGGATTAATGATGACGACCATCGCC													
Hadu35	TGAACTCGATCCGGATTAACCGCTTTATGCTACGTTACCGAAGAGACCGAATTCGCCGATTAATTCARACCAATGATCCATCGGTATCGCAATTAACCGGATTAATGATGACGACCATCGCC													
Consensus	TGAACTCGATCCGGATTAACCGCTTTATGCTACGTTACCGAAGAGACCGAATTCGCCGATTAATTCARACCAATGATCCATCGGTATCGCAATTAACCGGATTAATGATGACGACCATCGCC													
	1951	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080
Aps1	GAACCTTACGCGATCGTTTACGACGATATATATCGTATCGTTGCGACGCTTATCGTTGCGGCGGAGATATGTCARACCGTGCCTTGGCGAATTAATGTTTATCTATTATGACCTTTACCGATT													
Aps3	GAACCTTACGCGATCGTTTACGACGATATATATCGTATCGTTGCGACGCTTATCGTTGCGGCGGAGATATGTCARACCGTGCCTTGGCGAATTAATGTTTATCTATTATGACCTTTACCGATT													
Hadu35	GAACCTTACGCGATCGTTTACGACGATATATATCGTATCGTTGCGACGCTTATCGTTGCGGCGGAGATATGTCARACCGTGCCTTGGCGAATTAATGTTTATCTATTATGACCTTTACCGATT													
Consensus	GAACCTTACGCGATCGTTTACGACGATATATATCGTATCGTTGCGACGCTTATCGTTGCGGCGGAGATATGTCARACCGTGCCTTGGCGAATTAATGTTTATCTATTATGACCTTTACCGATT													
	2081	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210
Aps1	TAGGTACCGTTTAACTTATAACATTATACACAGCGGATATATGACGATCTTTAGCGGCACTTTTCGCCGCTACTAAGCGCAATTAAGCTTGTCTGATCAATTTGTTAGCGGACTTCGACAGAA													
Aps3	TAGGTACCGTTTAACTTATAACATTATACACAGCGGATATATGACGATCTTTAGCGGCACTTTTCGCCGCTACTAAGCGCAATTAAGCTTGTCTGATCAATTTGTTAGCGGACTTCGACAGAA													
Hadu35	TAGGTACCGTTTAACTTATAACATTATACACAGCGGATATATGACGATCTTTAGCGGCACTTTTCGCCGCTACTAAGCGCAATTAAGCTTGTCTGATCAATTTGTTAGCGGACTTCGACAGAA													
Consensus	TAGGTACCGTTTAACTTATAACATTATACACAGCGGATATATGACGATCTTTAGCGGCACTTTTCGCCGCTACTAAGCGCAATTAAGCTTGTCTGATCAATTTGTTAGCGGACTTCGACAGAA													
	2211	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340
Aps1	ATGGCATCATGACGGCTTAGTGATGGATAAATGTTTATGCTCCAGCGCAGACGCGGACGACACGCTGCTGGAATCGTTTACAGAGCTACTTACCATCGTAGTTTATTTTACCAATCCGACAGAA													
Aps3	ATGGCATCATGACGGCTTAGTGATGGATAAATGTTTATGCTCCAGCGCAGACGCGGACGACACGCTGCTGGAATCGTTTACAGAGCTACTTACCATCGTAGTTTATTTTACCAATCCGACAGAA													
Hadu35	ATGGCATCATGACGGCTTAGTGATGGATAAATGTTTATGCTCCAGCGCAGACGCGGACGACACGCTGCTGGAATCGTTTACAGAGCTACTTACCATCGTAGTTTATTTTACCAATCCGACAGAA													
Consensus	ATGGCATCATGACGGCTTAGTGATGGATAAATGTTTATGCTCCAGCGCAGACGCGGACGACACGCTGCTGGAATCGTTTACAGAGCTACTTACCATCGTAGTTTATTTTACCAATCCGACAGAA													
	2341	2350	2360	2370	2380	2390	2400	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470
Aps1	TTACGTCGCGTAGTCGGTGGCTTCTGAGCCAGATCCGAAGCCTTCCATGCGATTTGACGGCTCCGGCTATCGATTCTTAGTGGATATCTATCAAAATTAACCGATAGTAAACCAAGTCGCATCAC													
Aps3	TTACGTCGCGTAGTCGGTGGCTTCTGAGCCAGATCCGAAGCCTTCCATGCGATTTGACGGCTCCGGCTATCGATTCTTAGTGGATATCTATCAAAATTAACCGATAGTAAACCAAGTCGCATCAC													
Hadu35	TTACGTCGCGTAGTCGGTGGCTTCTGAGCCAGATCCGAAGCCTTCCATGCGATTTGACGGCTCCGGCTATCGATTCTTAGTGGATATCTATCAAAATTAACCGATAGTAAACCAAGTCGCATCAC													
Consensus	TTACGTCGCGTAGTCGGTGGCTTCTGAGCCAGATCCGAAGCCTTCCATGCGATTTGACGGCTCCGGCTATCGATTCTTAGTGGATATCTATCAAAATTAACCGATAGTAAACCAAGTCGCATCAC													
	2471	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
Aps1	GTTTAACTGAGCGCTTGGTTAAATCTTCTCGTTATGATACCAACGTCARACGCTTAATGAAGCGCGGTTTGGACGCTCTTCGCGCTTGGATATTTAGCGCGGATTTATATGAGAAAGTCGAAAGAGC													
Aps3	GTTTAACTGAGCGCTTGGTTAAATCTTCTCGTTATGATACCAACGTCARACGCTTAATGAAGCGCGGTTTGGACGCTCTTCGCGCTTGGATATTTAGCGCGGATTTATATGAGAAAGTCGAAAGAGC													
Hadu35	GTTTAACTGAGCGCTTGGTTAAATCTTCTCGTTATGATACCAACGTCARACGCTTAATGAAGCGAGGCTTAAACGCTTTGATGGATTAGATATTTAGCGCCGATTTATACGAAGATTCGAGAAAGC													
Consensus	GTTTAACTGAGCGCTTGGTTAAATCTTCTCGTTATGATACCAACGTCARACGCTTAATGAAGCGCGGTTTGGACGCTCTTCGCGCTTGGATATTTAGCGCGGATTTATATGAGAAAGTCGAAAGAGC													
	2601	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2676					
Aps1	GTTGCAATTA													
Aps3	GTTGCAAAAGCGCGGTTTGGAAACGCTTCCGCGCTTGATATTTAGCGCGGATTTATATGAGAAAGTCGATTA													
Aps3	GTTGCAATTA													
Hadu35	GTTTCAATTA													
Consensus	GTTGCAATTA.....													

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA METALOPROTEASA de *A. paragallinarum*

La secuencia de nucleótidos del gen *pepN* de *A. paragallinarum* se tradujo a la correspondiente secuencia de aminoácidos utilizando el programa Traslate tool (<http://web.expasy.org/translate/>), obteniendo una secuencia de 891 aminoácidos. Para ubicar la posición de regiones conservadas se utilizó el programa ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) encontrando un sitio de unión al zinc en la posición

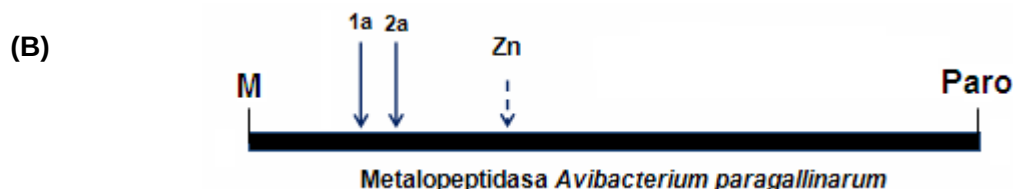
297-303 (gris) y dos sitios putativos transmembranales ubicados en las posiciones 186-192 y 249-256 (verde) que indican un posible anclaje de la proteasa a la membrana (Fig. 18).

Figura 18. (A) Secuencia de aminoácidos correspondiente al gen de la metaloproteasa de *A. paragallinarum*. En color verde se muestran dos putativos sitios transmembranales y en color gris se muestra el sitio de unión al zinc.

(A)

10	20	30	40	50	60
MQPKAKYRKD	YRAPDFTITN	IYLDLQDPN	RTFVTSTLTV	ERKNNEATHL	RLDGHSDFDL
70	80	90	100	110	120
SLKLNGETFE	RFEKDNDSTL	VDVTGISSPF	ELQIETGLNP	AQNTSLQGLY	QSGDGICTQC
130	140	150	160	170	180
EAEGFRQITY	MLDRPDVLAK	YRTKITASKA	KYPFLLSNGN	RIAQGDLEDG	RHWVEWEDPF
190	200	210	220	230	240
FKPSYLFALV	AGDFDLLQDK	FITKSGREVA	LEIYVDRGNL	DRAGWAMESL	KRSMRWDEDR
250	260	270	280	290	300
FGLEYDLDIY	MIVAVDFFNM	GAMENKGLNV	FNSKFVLAKP	ETATDTDYLD	IESVIAHEYF
310	320	330	340	350	360
HNWGTGNRITC	RDWFQLSLKE	GLTVFRDQEF	TSDLWSRPAK	RIEDVRLLRÄ	VQFAEDASPM
370	380	390	400	410	420
AHPIRPEKVI	EMNNFYTVTV	YEKGAEVIRM	IHTLLGEEKF	QKGMQLYVAE	NDGSAATCED
430	440	450	460	470	480
FVSAMERASG	IDLTQFRRWY	NQSGTPELSV	SDEYDEMHHI	YRLHVSQHTA	PTADQLEKVN
490	500	510	520	530	540
LHIPFKIELY	SEQDGTPISL	QFEGTTLNNV	LDVVQEQQTF	EFHNVMHKPV	PALLCDFSAP
550	560	570	580	590	600
LRLDYAYTNA	QLIALLKFAR	NDFVRWDAAQ	TLFNNELRLN	LALHQSGEAF	TFSAELTEAL
610	620	630	640	650	660
VYLLDNYESN	PELTALMLTL	PKETEFALF	KTIDPIGIAI	TREFMLRTIA	ETLRDRLN
670	680	690	700	710	720
YNRNRCDAYR	VAAEDMSKRA	LRNLCLSILA	FTDLGNGLTY	KHYQQADNMT	DTLAALSAAT
730	740	750	760	770	780
KAQLACRDQL	LADFEQKWHH	DGLVMDKWF	LQATRPDDNV	LEIVQELLNH	RSFNFNNPNR
790	800	810	820	830	840
LRALVGAFCS	QNPKAFAID	GSGYRFLVDI	LIKLNDSNPQ	VASRLIEPLI	KLSRYDNQRQ
850	860	870	880	890	
TLMKRGLERL	RGLDNLARDL	YEKVEKALQK	RGLERLRGLD	NLARDLYEKV	E

Figura 18. (B) Secuencia de aminoácidos de la metalopeptidasa de *A. paragallinarum*. La secuencia de 891 aminoácidos, inicia con una valina (M) y termina con un codon de paro (Paro). Los números 1a y 2a indican las posiciones de sitios putativos transmembranales. y Zn indica el sitio de unión al zinc.



La masa molecular del gen *pepN* de *Avibacterium paragallinarum* fue calculada utilizando el programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) obteniéndose un peso de 102771.3 Da, un peso similar al reportado para este tipo de proteínas que se encuentran alrededor de 100 kDa.

ZYMOGRAMA

La capacidad de la clona DH5α *Ks-pepN-Avpg* para degradar sustratos fue analizada por medio de SDS-PAGE al 10%, en un gel copolimerizado con gelatina porcina al 0.1 %, bajo las condiciones mencionadas en la metodología. En un extremo del gel se indican las bandas de los marcadores de peso molecular, en el carril 1 se muestra una banda de aproximadamente 100 kDa con actividad proteolítica correspondiente a la clona DH5α *Ks-pepN-Avpg*, en el carril 2 una banda del mismo peso molecular correspondiente al control positivo (*A. paragallinarum*), en el carril 3 se cargó una muestra proveniente de la clona DH5α *Ks* y en el carril 4 una muestra de *E. coli* DH5α sin el plásmido, en estos últimos dos carriles como se esperaba, no hubo actividad proteolítica (Fig. 19).

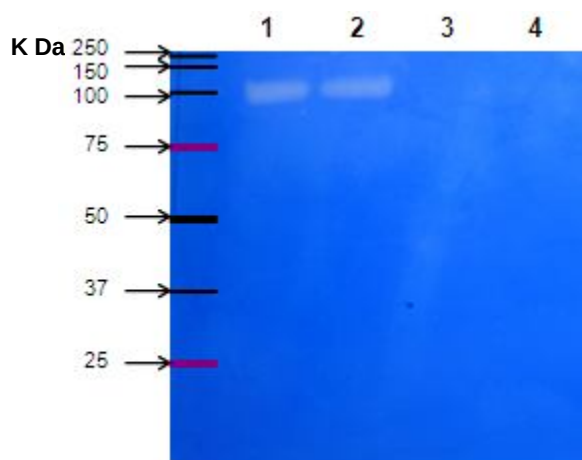


Figura 19. Gel de sustrato copolimerizado con 0.1% de caseína porcina. En el carril 1 se muestra actividad proteolítica de la clona DH5α *Ks-pepN-Avpg* y en el carril 2 el control positivo *A. paragallinarum*. En los carriles 3 y 4 se cargaron muestras de la clona DH5α *Ks* y DH5α, de las cuales no se observó actividad proteolítica.

INMUNORECONOCIMIENTO

Para saber si las proteasas, detectadas por su actividad proteolítica en geles de sustrato, secretadas por las cepas DH5 α Ks-*pepN*-Avpg y del control positivo (*A. paragallinarum*) tenían relación inmunológica con la proteasa secretada por *A. pleuropneumoniae*, se realizó un western blot. Se utilizó como anticuerpo primario IgG de conejo anti-proteasa de *A. pleuropneumoniae* y como secundario IgG anti-conejo (fig. 20), en ambas muestras se observa reconocimiento de una banda con un peso molecular alrededor de 100 kDa.

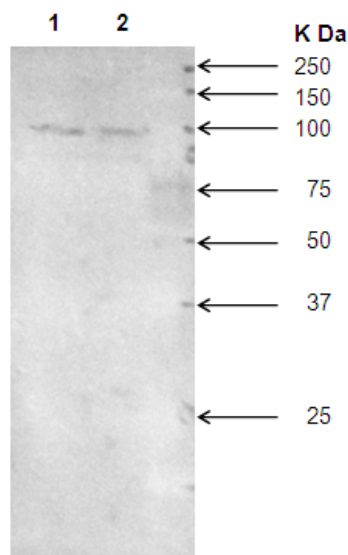


Figura 20. Fotografía de la membrana de nitrocelulosa donde se transfirieron por western blot las proteínas secretadas por las cepas Ks-*pepN*-Avpg (carril 1) y *A. paragallinarum* (Carril 2), las cuales fueron reconocidas por el antisero anti-proteasa de *A. pleuropneumoniae*.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se clonó y caracterizó el gen que codifica para una metaloproteasa en *A. paragallinarum*, un gen *pepN*, con una secuencia nucleotídica de 2676 pb, tamaño similar al reportado por García *et al.*, (2004) en *A. pleuropneumoniae*, con número de referencia AY545035.1 y por Negrete *et al.*, (1999) en *P. multocida* con número de referencia NC_016808.1 (2610pb). Durante el análisis *in silico* se encontró que la secuencia del gen *pepN* de *A. paragallinarum* presenta similitud mayor al 98% con cuatro serovars de *A. pleuropneumoniae*, 76% con *Haemophilus ducreyi*, menor 75% con otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* y en porcentajes mucho menores con microorganismos de otras familias.

Este gen al ser traducido *in silico* mostró una secuencia de 891 aminoácidos con mayor porcentaje de similitud entre las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* y en menor porcentaje con miembros de otras familias.

Para conocer la masa molecular de la metaloproteasa secretada, ésta se determinó utilizando el programa <http://web.expasy.org/protparam>, el peso obtenido fue de 102.77 kDa, similar al de metaloproteasas secretadas por *A. pleuropneumoniae* (101kDa) García *et al.*, (2004), *P. multocida* (99.53 kDa) Negrete *et al.*, (1999), *H. ducreyi* (99.53 kDa) Geovana *et al.*, (2011) y el reportado por Rivero *et al.*, (2005) en *A. paragallinarum* mostrando un peso mayor a 100 kDa que coincide con el obtenido en este trabajo, lo cual indica que se podría tratar de la misma proteína.

A partir de la secuencia de aminoácidos de esta proteína y usando el programa ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) se encontró un sitio de unión al zinc en la posición 297-303 que corresponde a la secuencia HEYFHNW, la cual muestra homología con la secuencia consenso **HEXXH** motivo que es extensamente utilizado para identificar sitios de unión al zinc en metaloproteasas y que integra a esta proteína dentro de la familia M1 Gluzincinas. Las letras marcadas en negritas representan ligandos putativos de zinc y las letras XX. que se encuentran en medio, representan residuos involucrados en la catálisis (Hooper, N., 1994). También se localizaron dos sitios putativos transmembranales ubicados en las posiciones 186-192 y 249-256 que podrían estar involucrados en el procesamiento de proteasa (García *et al.*, 2004), ya que en algunas metaloproteasas se llega a presentar un dominio transmembrana sencillo que actúa como señal de anclaje a la membrana, jugando un papel importante en diversos eventos proteolíticos en la superficie celular (Cascales *et al.*, 2010). Utilizando el programa DAS transmembrane prediction software (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) se localizaron dos puntos de posible anclaje a la membrana, un resultado que según el trabajo de García *et al.*, (2004) podría concordar con la inmunodetección sobre la superficie externa de la bacteria, para la cual utilizó un suero policlonal anti-proteasa de *A. pleuropneumoniae* reconociendo proteasas secretadas por la bacteria.

El primer amplificado a partir de la reacción de PCR donde se utilizaron los oligonucleótidos *pepN* F2.F4 y *pepN* R3.R4 fue clonado, pero al momento de obtener las proteínas secretadas de esta clona y realizar el zimograma, no se obtuvo actividad proteolítica debido a que no se tenía el gen completo y por tanto no se expresaba la proteasa, por lo que se utilizó el

producto amplificado con los oligonucleótidos *pepN* Fow y Rev que amplifican a partir de regiones UTR ubicadas río arriba y abajo del gen *pepN* de *A. paragallinarum*. Este amplificado fue clonado en el plásmido Ks y por medio de IPTG, se indujo la expresión del gen, esto debido a que el gen *LacZ* ubicado dentro de la estructura de este vector, requiere IPTG como inductor para su expresión y al ser interrumpido por el inserto (gen *pepN* de *A. paragallinarum*), ahora la expresión del gen *pepN* de *A. paragallinarum* debe ser inducida por la molécula IPTG (Sanbroock *et al.*, 1989).

Las proteínas secretadas de esta clona DH5 α (Ks-*pepN*-*Avpg*) así como de la bacteria control (*A. paragallinarum*), fueron obtenidas para corroborar que las proteasas secretadas por la clona y el control fueran responsables de la actividad proteolítica, las bacterias DH5 α y DH5 α Ks fueron utilizadas como controles negativos para comprobar que las bacterias con el plásmido Ks y las que no lo contienen son incapaces de secretar la proteasa. En el zimograma se muestra que las proteasas secretadas por *A. paragallinarum* y por la clona DH5 α Ks-*pepN*-*Avpg* presentan actividad proteolítica, la cual se debe a una metaloproteasa de aproximadamente 102 kDa.

Para comprobar que estas proteínas guardaban similitud antigénica con la proteasa de *A. pleuropneumoniae*, se utilizó un suero antiproteasa del mismo microorganismo, observándose reconocimiento inmune en ambas muestras.

Las condiciones óptimas de actividad proteolítica para las metaloproteasas descritas por Garcia *et al.*, (2004), Negrete *et al.*, (1999) y Rivero *et al.*, (2005) podrían también probarse para corroborar que esta proteasa clonada en el plásmido Ks-*pepN*-*Avpg* es la misma reportada previamente por Rivero *et al.*, (2005), también se podría probar la capacidad degradativa sobre IgA e IgG, lo cual nos sugeriría su participación como factor de virulencia.

CONCLUSIONES

- *A. paragallinarum* posee un gen *pepN* que codifica para una metaloproteasa.
- La secuencia nucleotídica obtenida consta de 2676 pb, que al ser traducida *in silico* da un total de 891 aminoácidos y presenta un peso molecular de 102.77 kDa.
- La secuencia de aminoácidos posee un sitio de unión al zinc en la posición 297-303 y dos posibles sitios putativos transmembranales en las posiciones 186-192 y 249-256.
- La proteína codificada por el gen *pepN* de *A. paragallinarum* contiene el motivo HEXXH característico de las metaloproteasas y que la incluye en la familia M1 Glizincin.
- La metaloproteasa de *A. paragallinarum* podría ser la descrita previamente por Rivero *et al.*, (2005).

PERSPECTIVAS

- Analizar las condiciones de temperatura, pH y sales, que intervienen en la expresión y en la actividad proteolítica de la proteasa secretada por la clona.
- Generar cepas de *A. paragallinarum* mutantes en el gen *pepN* que permitan conocer su papel como factor de virulencia en un modelo de infección *in vivo*.

APENDICES

Caldo LB (Luria Bertani)

Para 1000 ml de agua destilada

- NaCl 10g
- Extracto de levadura 5g
- Peptona bitriptasa 10g

Disolver los componentes en agua destilada, esterilizar a 15 lb. Durante 15 minutos. Para preparar placas de agar LB, agregar 16g de agar bacteriológico por litro.

Agar BHI (Infusión cerebro corazón)

Para 1000ml de agua destilada

- BHI 37g
- Agar bacteriológico 16g

Disolver los componentes en agua destilada, esterilizar a 15 lb. Durante 15 minutos.

Apéndice II

Extracción de ADN cromosómico de *Avibacterium paragallinarum* por el método fenol-cloroformo (Descrito por Sambrook (1989)).

1. Se incubó una colonia de *Avibacterium paragallinarum* en 10ml de medio líquido BHI suplementado con NAD (1 µg/ml) a 37° C
2. Se empastillo en eppendorff a 13,000rpm y se elimino el sobrenadante.
3. La pastilla se lavo 3 veces con Tris HCl 0.1M con NaCl.
4. La pastilla bacteriana se resuspendió en 200µl de lizosima (5mg/ml en 10mM de EPES pH 7.4) incubando 30min. a 37° C.

5. Se agregan 500µl de buffer de lisis (Tris acetato 40mM, pH 7.8, NaAc 20mM, EDTA 1mM, SDS 1%, y RNAsa 10µg/ml), la mezcla se incubo a 37°C por 30min.
6. Enseguida se colocaron 100µl de NaCl al 5M mezclando por inversión y centrifugando a 14,000rpm.
7. Se recupero el sobrenadante en un tubo nuevo y se agrego un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isomilico (25:24:1).
8. Se agito por inversión varias veces hasta formar una suspensión y después se centrifugo a 14,000rpm durante 3min.
9. La fase superior se separo en un tubo nuevo, este se precipito con 2 volúmenes etanol frío al 100% y se dejo reposar durante 30min.
10. Se centrifugo a 14,000rpm durante 5min y se lavo el pellet 2 veces con 2 volúmenes de etanol al 70% y se dejo secar a 40° C, y una vez seco, se resuspendió con 40µl de agua desionizada libre de nucleasa.

Apéndice III

Extracción de ADN plasmidico por el método lisis alcalina
(Descrito por Sambrook (1989)).

Birnboim I

→ Glucosa	50mM	0.05M
→ Tris HCl pH 8	25mM	0.025M
→ EDTA	10mM	0.01M

Birnboim II

Para 1000ml de solución

→ NaOH	10N
→ SDS	20%

→ Agua estéril

La solución deberá prepararse minutos antes de ser utilizada y debe quedar al 0.2N de NaOH con respecto al SDS 1%

Birnboim III

→ Acetato de potasio	50mM	60ml
→ Ácido acético glacial		11.5ml
→ Agua destilada		28.5ml

Preparación de células competentes

Solución reguladora I

→ RbCl	100mM
→ MnCl ₂	45mM
→ KAc	88mM
→ CaCl ₂	10mM
→ Lic.	0.5mM
→ Glicerol	15%

Estéril a pH= 5.8

Solición reguladora II

→ PIPES	10mM
→ CaCl ₂	15mM
→ RbCl	10mM
→ Glicerol	15%

Estéril a pH= 7

BIBLIOGRAFÍA

- Blackall P. J., Terzolo R. 1995. Coriza Infecciosa: revisión de métodos de diagnóstico y vacunas. Revista Argentina de Microbiología. 27: 156-174.
- Blackall P. J. 1999. Infectious Coriza: Overview of the Disease and New Diagnostic Opinions. American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews. 12:627-632.
- Blackall P. J., Christensen H., Beckenham T., Blackall L. and Bisgaard M. 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volatium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55: 353-362.
- Blackall P. J., Soriano E. 2008. Infectious Coryza and Related Bacterial Infectious. Diseases of poultry 12th editorial Iowa State University Press, Ames, Iowa Section II, Capitulo 20. 789-803.
- Blackall P. J., Christensen H., Bisgaard. 2011. Inusual growth variants of *Avibacterium paragallinarum*. Australian Veterinary Journal. 89: 273-275.
- Boyce J., Adler B. 2000. The Capsule Is a Virulence Determinant in the Pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). Infection and Immunity. 68:3463-3468.
- Bragg R., Greyling J. Verschoor J. 1997. Isolation and identification of NAD-independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. Avian Pathology. 26: 595-606
- Bragg R. 2002. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 2: Naturally occurring NAD⁺ independent field isolates. Journal Veterinary Research 69:171-175.
- Brenner G., Kadlec K., Sweeney M., Brzuszkiewicz E., Liesegang H., Daniel R., Murray R., Watts J., Schwarz. 2011. ICEPmu1, an integrative conjugative element of *Pasteurella multocida*: structure and transfer. Journal of Antimicrobial Chemoterapy. 67: 91-100.
- Byarugaba K., Minga M., Gwakisa S., Katungaka E., Bisgaard M., Olsen E. 2007. Virulence chacaterization of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Uganda. Avian Pathology. 36:35-42.
- Cascales M., Álvarez J. 2010. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. Real Academia Nacional de Farmacia. 76: 59-84.

-
- Chukiatsiri K., Sasipreeyajan J., Neramitmansuk W., Chansiripornchai N. 2009. Efficacy of autogenous killed vaccine of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Diseases* 53: 382-386.
- Dávila E. 2009. Vacunas e Inmunidad contra Coriza Infecciosa. Artículo de revisión. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos. 1-20.
- García E., Vaca S., Pérez A., Ibarra J., Pérez V., Tenorio V. Negrete E. 2005. *Gallibacterium anatis*-secreted metalloproteases degrade chicken IgG. *Avian Pathology*. 34: 426-429.
- García O., García R., de la Garza M., Vaca S., Paniagua G., Mejía R., Tenorio V., Negrete E. 2004. *Actinobacillus pleuropneumoniae* metalloprotease: Cloning and *in vivo* expression. *Microbiology Letters* . 234: 81-86.
- Gayatri R., Ashih R., Mahendra M. 2009. An overview on Epidemiologic investigations of Infectious coriza. *Veterinary World*. 2:401-403.
- Gerlach G., Reidl J. 2006. NAD⁺ Utilization in *Pasteurellaceae*: Simplification of a Complex Pathway. *Journal of Bacteriology*. 188: 6719-6727.
- Glisson J. 1998. Bacterial Respiratory Diseases of Poultry. *Poultry Science* 77:1139–1142.
- Gómez G. 2005. Factores que afectan la Expresión de proteínas de 110-120kDa secretadas por *Haemophilus paragallinarum*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gyles L., Prescott F., Songer G., Thoen C. 2010. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4th Edition. Editorial Office. Iowa State University Press. 655 pp.
- Häse C. y Finkelstein R. 1993. Bacterial Extracellular Zinc-Containing Metalloproteases. *Microbiological Reviews*. 57: 823-837.
- Hobb R., Tseng H., Downes J., Terry T., Blackall J., Takagi M., Jennings M. 2002. Molecular analysis of a hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology*. 148: 2171-2179.
- Hooper N. 1994. Families of zinc metalloproteases. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 354: 1-6.
- Juárez M. 2006. Caracterización de secuencias involucradas en la secreción de proteasas en *Pasteurella multocida*. Tesis de Maestría, Benemérita Universidad de Puebla.

- Linhartová I., Bumba L., Masín J., Basler M., Osicka R., Kamanová J., Procházkoá K., Adkins I., Hejnová J., Sadílkova L., Morová., Sebo P. 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. Federation European Microbiological Societies. Microbiology Reviews. 34: 1076-1112.
- Luna Trinidad A. 2010. Evaluación de dos bacterinas en gallinas de postura, mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y protección ante un desafío con *Avibacterium paragallinarum*, en Tehuacan, Puebla. Tesis de licenciatura, Universidad Veracruzana.
- Martínez M. 2012. Comparación del perfil genético proteolítico (serín y metaloproteasas) presente en *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Avibacterium paragallinarum* y *Gallibacterium anatis*. Tesis de Maestría en Ciencias (Microbiología). Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Mala B., Aparna M., Tanksale M., Deshpande V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: 596-635.
- Mena E., Vázquez C., Vaca S., García O., Pérez V., Pérez A., Ibarra J., De la Garza M., Zenteno E., Negrete E. 2004. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110-kDa putative RTX protein. Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters 232: 83-87.
- Negrete E., Tenorio V., de la Garza M. 1999. Secretion of Proteases from *Pasteurella multocida* Isolates. Current Microbiology. 38: 64-67.
- Negrete E., García R., Reyes M., Godínez D., de la Garza M. 2000. Membrane vesicles relased by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and and Apx toxins. Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters. 191: 109-113.
- Negrete E., Vaca S., García O., Tavares F., Andrade A., García R. 2002. Isolation of a puntative *fliC* sequense in *H. paragallinarum* and *P. multocida*. Proceeding of the International Pasteurellaceae Society Conference May 5. Banff (Alberta) Canada (Guelph): International Pasteurellaceae Society. 2002:37.
- Pérez V., Pérez A., Ibarra J., Gómez G., Vázquez C., Vaca S., Negrete E. 2008. Secreted Proteins of *Avibacterium paragallinarum* Are Lethal for Chicken Embryo. Animal Biodiversity and Emerging Diseases. Annals of the New York Academy of Sciences. 1149: 380-383.

- Ramón M., García O., Pérez A., Ibarra J., Pérez V., Vaca S., Negrete E. 2006. Membrane vesicles released by *Avibacterium paragallinarum* contain putative virulence factors . Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters. 257: 63-68.
- Rivero P. 2004. Identificación de proteasas secretadas por *Haemophilus paragallinarum*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rivero P., Vázquez P., Sánchez A., Vaca S., Negrete E. 2005. *Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases. Canadian Journal of Microbiology 51: 893-896
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Soriano E., Terzolo H. 2004. *Haemophilus paragallinarum* Etiología de la coriza infecciosa. Veterinaria México. 35: 245-259.
- Serrano A., García R., Vaca S., Negrete E. 2005. Motilidad in Vitro de *Haemophilus paragallinarum*. Avances de la Biotecnología Agropecuaria y Forestal, A.C. (Eds: Héctor González Rosas y Carmen Jacinto Hernández) 229-239.
- Serrano A. 2007. Clonación y caracterización del gen *fliC* de *Avibacterium paragallinarum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Swata A., Nakai T., Kume K., Yoshukawa T. 1985. Lesions Induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. American Journal Veterinary Research. 46:1185-1189.
- Tamsin T., Yaramah M., Shannon L., Blackall P., Jennings M. 2003. Genetic analysis of plasmid encoding hemocin production in *Haemophilus paragallinarum*. Microbiology. 149: 3177-3184.
- Terzolo H. 2000. Revisión sobre la Coriza Infecciosa: propuestas de investigación para su diagnóstico y control. Veterinary Medical Review. 81: 262-269.
- Thompson S., Sparling F. 1993. The RTX Cytotoxin-Related FrpA Protein of *Neisseria meningitidis* Is Secreted Extracellularly by Meningococci and by HlyBD⁺ *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 61: 2906-2911.

→ Qin Zhao, Ya-ni S., Xing-xiao Z., Yi-bo K., Zhi-jing X., Yan-li Z., En-min Z., Shi-Jin J. 2010. Evaluation of two experimental infection models for *Avibacterium paragallinarum*. Veterinary Microbiology. 141:68-72.

→ Zavala Aguilera C. 2011. Clonación y Caracterización del gen *tbpB* que codifica para un receptor de la membrana externa de *Avibacterium paragallinarum*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.