

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Métodos alternos para la purificación y caracterización parcial de la
adhesina de *Mannheimia haemolytica*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
MARGARITA VILLAFANA MONROY

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La presente tesis se llevó a cabo en el Laboratorio No. 6 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM a cargo de la Doctora Concepción Agundis Mata , bajo la dirección del Doctor Mohamed Ali Pereyra Morales.

Agradecimientos:

A mi Jefa *Dra. Concepción Agundis Mata*, gracias por la oportunidad y por incentivar, motivar, e insistir fehacientemente en que las metas se pueden alcanzar por difícil que estas sean y hacerme comprender que el conocimiento no tiene barreras en el tiempo y que nunca dejamos de aprender. Gracias además... por compartir sus sabios consejos y estar presente en los momentos más difíciles que enfrenté en mi vida durante esta etapa.

A mi Jefe *Doctor Mohamed Ali Pereyra Morales* por su guía, paciencia y aliento para lograr concluir este proyecto y ante los momentos más difíciles siempre encontré una respuesta positiva, palabras de aliento y guía para continuar.

Al *Doctor Edgar Zenteno Galindo* por aceptarme en este proyecto y a los que formaron parte del jurado especialmente a la Doctora Luisa Alba Lois por su apoyo y contribución para el mejor logro de este proyecto, y gracias al Doctor Armando Pérez Torres.

A mis compañeros del Laboratorio 6, del Departamento de Bioquímica en la Facultad de Medicina, que tuve oportunidad de conocer y compartir gratos momentos, de alegría, convivencia: Alí, Carlos (El Gallo) , Juan Alpuche, Luisa, Joserra, José Luis, Montserrat, Tania, Lileny, de los que me llevo algo muy valioso como es su amistad y compañerismo como estudiante, a los visitantes remotos que tuve oportunidad de conocer como Dr. Chávez, Dra. Eugenia, Dr. Lascurain y Dr. Francisco.

A mi familia y en especial a mis hijos Paco, Tania y Pau y mi nieta Valentina, mis tesoros más grandes y que con su amor siempre me impulsaron y alentaron a seguir para concluir esta etapa en mi vida. A Javi por su solidaridad y apoyo.

A mis padres+, que con su sabiduría de la vida y gran cariño me dieron la mejor herencia que es la educación y la importancia de estudiar y aprender.

A mi hermana Susy y sobrinos Felo, Susy y David que siempre me acompañaron en este trayecto y me dieron ánimos para seguir adelante.

A mis amigos Elba, Héctor y Martha Eugenia por su apoyo incondicional siempre.

INDICE

Resumen.....	4
1. Introducción.....	5
1.1 Cuadro Clínico y Anatomía Patológica.....	8
1.2 Factores de Virulencia.....	9
1.3 Lipopolisacarido de <i>Mannheimia haemolytica</i>	9
1.4 Toxina de <i>Mannheimia haemolytica</i> (LKT).....	10
1.5 Proteínas de Membrana Externa.....	11
1.6 Adhesinas.....	12
2. Objetivo.....	14
3. Hipótesis.....	14
4. Material y Métodos.....	14
4.1 Obtención de la Adhesina de <i>Mh</i>	15
4.2 22Actividad hemaglutinante con eritrocitos de diferentes especies.....	15
4.3 Determinación del peso molecular de la adhesina.....	16
4.4 Purificación de la adhesina.....	17
4.5 Procedimientos analíticos.....	19
5. Resultados.....	20
6. Discusión.....	33
7. Conclusiones.....	38
8. Perspectivas.....	39

Abreviaturas

AE	Actividad Específica
BHI	Infusión cerebro-corazón
CD	Grupos de diferenciación
FNR	Fracción No Retenida
FR	Fracción Retenida
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
LFA-1	Antígeno 1 con función asociada a linfocito
LKT	Leucotoxina
LPS	Lipopolisacárido de <i>Mannheimia haemolytica</i>
<i>Mh</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i> A1
<i>MhA1</i>	Adhesina de <i>Mannheimia haemolytica</i>
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
SA	Sulfato de amonio
SDS	Electroforesis en gel de poliacrimada con dodecil sulfato de sodio
UHA	Unidad Hemaglutinante

Resumen

La *Mannheimia haemolytica* A1 es un agente oportunista causal de la manheimiosis en el ganado, ocasionando pérdidas importantes en la producción ganadera por neumonía; esta bacteria tiene una Adhesina con capacidad hemaglutinante asociada a los mecanismos de patogenicidad que aún se encuentran en estudio. En el presente trabajo se hace un análisis de los métodos de purificación para la obtención de la Adhesina de *M. haemolytica* A1, con el objeto de identificar las mejores condiciones para su purificación y caracterización. La bacteria se cultivó a diferentes temperaturas y se determinó su capacidad de hemaglutinación, frente a eritrocitos de diferentes especies. En el sobrenadante de cultivo, la temperatura más favorable fue de 41 °C y la mejor capacidad de hemaglutinación se obtuvo frente a eritrocitos de conejo. Por precipitación fraccionada con sulfato de amonio (SA) se observó que la fracción precipitada con SA al 75% de concentración, presentó la mayor actividad hemaglutinante.

Se probaron 3 matrices para purificar la adhesina por cromatografía de afinidad: mucina, fetuina y estroma de conejo, el mayor rendimiento fue el obtenido empleando estroma de conejo como matriz. Se determinó la secuencia de aminoácidos por degradación de EDMAN la secuencia obtenida muestra identidad, con 18 proteínas de membrana externa A (OMP A), cercanas a la región amino terminal de éstas.

El peso molecular de la adhesina es de 45 kDa. En la composición de los aminoácidos los más frecuentes fueron Glicina, Serina, Isoleucina, Ácido glutámico, Alanina y Metionina; la Adhesina se inhibió con N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y en menor proporción con mucina y fetuina.

Los resultados sugieren que la adhesina podría participar en la patogenia de la infección mediante interacciones específicas con receptores glicosilados.

1. Introducción

La producción de ganado bovino en México representa una importante fuente de ingresos al país. En 2012, Estados Unidos de Norteamérica importó 2.3 millones de animales vivos, el 65 % provenía de México; dicha cantidad fue 8.5% mayor que en 2011, según The United States International Trade Commission (USITC). Si bien, las exportaciones mexicanas de ganado bovino representan un número importante para Estados Unidos, el crecimiento del volumen exportado fue sólo 4.4% mayor que en el 2011. Es decir, las exportaciones mexicanas crecieron a un menor ritmo que las importaciones de Estados Unidos.

De acuerdo con información de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa), entre el 2008 y el 2012, 99.1% de las exportaciones mexicanas de ganado bovino en pie tuvo como destino Estados Unidos. México tiene una ventaja competitiva, principalmente para los estados del norte, los cuales se han visto beneficiados por las exportaciones que en el 2012 generaron ingresos por 665.1 millones de dólares.

Cabe destacar que el comercio internacional de animales vivos requiere de puntos de cuarentena ubicados cerca de la frontera del país exportador o del importador, en dichas instalaciones se revisan las características del ganado, principalmente peso, fisiología y ausencia de virus o enfermedades que pongan en riesgo al país importador, su población y fauna.

La fiebre de embarque (Mannheimiosis) es la enfermedad de bovinos con mayor impacto económico a nivel mundial en la producción de ganado de carne y re-cría (Lekeu, 1996), es una de las enfermedades más costosas que afecta al ganado bovino productor de leche o productor de carne, se considera la enfermedad con mayor impacto económico y la segunda, después de las

enfermedades gastrointestinales, en becerros lecheros, (Katsuda, 2007). Desde el año de 1950 se reportaron por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica, pérdidas anuales de 25 millones de dólares (más de 250 millones de pesos; Shina, Abinanti, 1962). Esta enfermedad está relacionada con pérdidas económicas por más de mil millones de pesos anuales y los costos por la enfermedad en la industria ganadera de los E.E.U.U. son de, al menos 640 millones de dólares anuales. (Highlander, 2001; Jaramillo-Arango, cols., 2009).

En los Estados Unidos, las pérdidas anuales en la industria ganadera se estiman desde un billón hasta 3 billones de dólares por concepto de tratamientos, medicina preventiva, baja conversión alimenticia, pobre desempeño de animales con enfermedad crónica y muerte (Griffin, 1997; Snowden, cols. 2007). Los costos asociados con la prevención, tratamiento, morbilidad y mortalidad han sido estimados de \$13.90 (Snowden, cols., 2007) a \$15.57 (Faber, cols., 1999), dólares/cabeza de animal.

En el año 2010 de acuerdo con información de los E.E.U.U. a través del United States Department of Agriculture, (USDA, 2011), se han reportado alrededor de 450 mil muertes por fiebre de embarque, que representaron el 26.5% del total de muertes de ganado bovino registradas en ese año. En México no se cuenta con información actual al respecto, sin embargo, Trigo, (1987) reportó 8.7% de muertes de becerros Holstein por neumonía.

Se estima que las neumonías causan aproximadamente 75% en la incidencia de casos clínicos provocando de 45 - 55% de mortalidad; los costos de los tratamientos representan el 8% del costo de producción (Zecchinon, cols., 2005; Jaramillo, cols., 2009).

Mannheimia haemolytica biotipo 1 (*Mh*) es un patógeno oportunista considerado como el principal agente etiológico de esta enfermedad. *Mh* produce enfermedades, denominadas genéricamente pasteurelosis, principalmente en ovejas y vacas, también denominada neumonía por fiebre de embarque; enfermedad respiratoria y se caracteriza por una pleuroneumonía fibrinosa grave,

que afecta principalmente a animales menores de un año recientemente transportados, con una mayor incidencia en becerros de 1 a 5 meses de edad nacidos durante otoño e invierno (Trigo, 1987; Murphy, cols., 1993; Pijoan, 1999; Lo, 2001), cuyos cuadros clínicos incluyen: septicemias hemorrágicas, neumonías, enfermedades sistémicas, infecciones locales y mastitis, siendo las dos primeras las más importantes desde el punto de vista económico. En general el desarrollo de estas enfermedades esta siempre asociado a situaciones de estrés como pueden ser ciertas condiciones climáticas. Los animales presentan síntomas de la enfermedad durante épocas de tensión, y cuando se compromete el sistema inmune; estos acontecimientos se presentan durante el destete, alojamiento, transporte y cambios alimenticios (Cole, 1996).

Los mecanismos de defensa inmunológicos inducidos por la bacteria no inducen efectos protectores en el huésped, sin embargo, los mediadores producidos por la activación de las células del sistema inmune innato son responsables de la destrucción y daño tisular que se presentan en los animales afectados (ver más adelante). Las investigaciones en este rubro se han orientado a dilucidar la respuesta inmunológica de bovinos contra *Mh*, conocimiento de vital importancia para prevenir el desarrollo de la enfermedad y la mortalidad en bovinos afectados (Jaramillo, cols., 2009).

Mannheimia haemolytica (biotipo 1) es una bacteria gram negativa con actividad hemolítica y miembro de la familia *Pasteurellaceae*, es un microorganismo con estructura de cocobacilo, con ligero pleomorfismo, no móvil, no esporulado, aerobio y anaerobio facultativo, oxidasa y catalasa positivas, e indol negativa, esta bacteria produce distintos factores de virulencia que participan en la patogénesis de la pasteurolosis bovina. Es capaz de fermentar D-sorbitol, D-xilosa, maltosa y dextrina; no fermentan arabinosa o glucósidos, y son negativas a la ornitina descarboxilasa y nitrofenil- β -D-glucósido NPG (β -glucosidasa), pero positivas a 3S,4R,5R,6S)-6-metiloxano-2,3,4,5-tetrol ONPF (α -fucosidasa). La presencia de cápsula con propiedades de superficie antifagocíticas la hacen parcialmente resistente a la fagocitosis (Jaramillo y cols., 2009). *M. haemolytica* normalmente

se localiza en la cavidad nasofaríngea sin causar daño; pero, bajo condiciones de estrés físico asociado con la manipulación de los animales, el transporte prolongado, cambios climáticos, infecciones concurrentes etc., favorece su proliferación en este sitio. A este nivel, la respuesta inflamatoria puede evitar la colonización e invasión al tejido pulmonar; sin embargo, la bacteria puede evadir las defensas del hospedero y amplificar el proceso inflamatorio fundamentalmente debido a la secreción y producción de lipopolisacáridos (LPS) y leucotoxinas (Lkt), principales componentes bacterianos asociados con la patogenia de la enfermedad (Angen, cols., 1999; Highlander, 2001).

1.1 Cuadro Clínico y Anatomía Patológica.

Los síntomas clínicos de la enfermedad se presentan un mes después del destete/comercialización. La Mannheimiosis se caracteriza clínicamente en una fase temprana por depresión, pérdida de apetito, y ojos embotados (Duff, Gaylean, 2007; Perino, Apley, 1998; Noffsinger, Locatelli, 2004). La temperatura arriba de 40 °C indica la presencia de esta enfermedad. Los síntomas clínicos en el curso de la enfermedad incluyen aumento en la frecuencia respiratoria, oídos caídos, tos, diarrea, congestión nasal y en casos severos muerte (Duff, Gaylean, 2007; Bleul, 2009). Se considera que el aumento en la temperatura correlaciona con el grado y la severidad de los signos clínicos y más aún con la consolidación pulmonar observada en la necropsia. La fiebre de embarque es causada por una bacteria oportunista que se encuentra en el tracto respiratorio que por inmunosupresión del huésped ocasionada por factores que causan estrés, como: transporte, cambio de clima, destete, afecta sus mecanismos de defensa lo que permite que la bacteria se establezca y reproduzca rápidamente y penetre a los pulmones durante la inhalación e inicie una infección aguda del epitelio alveolar, de tipo fibrinosa (Jaramillo, cols., 2009). Macroscópicamente se observan áreas de consolidación con necrosis central y hemorragia en la periferia de estas

áreas, así como una pleuritis fibrinosa. Histológicamente se presentan múltiples áreas de bronconeumonía fibrino-hemorrágica aguda con necrosis, e intensa infiltración de neutrófilos polimorfonucleares, que no proporcionan un mecanismo de defensa efectivo en la respuesta del huésped, y de hecho, son consideradas las principales células que contribuyen a la destrucción del tejido y a la severidad del cuadro clínico.

1.2 Factores de Virulencia.

Entre los factores producidos por *Mh* que participan en la colonización e inducción de la respuesta inmunitaria se encuentran: la cápsula, las fimbrias, lipopolisacáridos, la neuroaminidasa, la sialoglicoproteínasa, las proteínas de membrana externa. Los factores de virulencia de *Mh* mejor estudiados son la Lkt, el LPS, y la adhesina bacteriana de *Mh*.

1.3 Lipopolisacárido de *Mannheimia haemolytica*. El LPS es estructuralmente similar al de una bacteria Gram negativa típica, tiene las actividades propias de las endotoxinas Gram negativas: pirogénicas, activan macrófagos, inducen al factor de necrosis tumoral, activan la cascada de la coagulación, la agregación de plaquetas e inducen el choque endotóxico (Zecchinon, 2005; Paulsen, cols., 1989 y Confer, cols., 1990).

La administración intrabronquial de LPS purificado de *Mh* en bovinos causa la exudación de fibrina y neutrófilos, edema pulmonar y agregación de plaquetas, implicando al LPS como la principal causa de necrosis microvascular y trombosis. (Boyce, cols., 2004). El LPS de *Mh* A1 es capaz de causar daño directo *in vitro* sobre las células del endotelio de las arterias pulmonares; demostrando la función potencial de las endotoxinas en la patogénesis de la lesión vascular en la manheimiosis de bovino (Paulsen, cols. 1989 y Confer, cols. 1990).

Estudios realizados con LPS de *Mh* cepa 12296, demostraron que los macrófagos alveolares aumentan la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa

con la consecuente producción de óxido nítrico (Zecchinon, 2005; Boyce y cols., 2004) efecto que aumenta por la adición de interferón gamma (IFN- γ , también llamado interferón inmunitario o de tipo II, tipo de citocina producida por los linfocitos T y células asesinas naturales (“Natural Killer”, NK)), el óxido nítrico generado causa daño por citotoxicidad en las células endoteliales vasculares pulmonares de manera dosis-dependiente (Yoo, cols., 1995; Jaramillo, cols., 2009). *Mh* participa en el proceso inflamatorio y en el daño tisular induciendo la síntesis de citocinas proinflamatorias en leucocitos de bovino. El LPS y la Lkt de *Mh* estimulan la liberación de interleucina-1 beta (IL-1 β , citocina generada por macrófagos alveolares activados, producida en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , citocina que estimula la fase aguda de la reacción inflamatoria), estas citocinas proinflamatorias inducen la expresión de la molécula asociada a la función del leucocito-1 (LFA-1, por sus siglas en inglés *Lymphocyte function-associated antigen 1*,) en leucocitos, expresión regulada positivamente por IFN- γ (Dileepan, cols., 2005).

Por otra parte, algunas evidencias experimentales apoyan un posible papel del LPS de *Mh* en la producción de citocinas proinflamatorias, una de las características patológicas de Mannheimiosis bovina es una mayor concentración de neutrófilos en los espacios alveolares. Esta afluencia sugiere la inducción indirecta de la quimiotaxis de los neutrófilos al estimular la producción de interleucina-8 (IL-8, citocina proinflamatoria). Los macrófagos alveolares del pulmón al parecer son los principales productores de IL-8, (citocina proinflamatoria) (Lafleur y cols. 1998; Lafleur, cols. 2001). La IL-8 exhibe un papel importante como mediador quimiotáctico para neutrófilos, el RNAm de esta citocina está elevado en macrófagos y neutrófilos residentes en el tejido pulmonar afectado, de esta forma se explica el infiltrado inflamatorio de neutrófilos presente en la Mannheimiosis. Por otra parte, durante la respuesta inflamatoria inicial, los neutrófilos atraviesan rápidamente la matriz extracelular de bronquios y bronquiolos con participación de la molécula de adhesión conocida como CD18,

que les permite llegar de forma eficaz al lumen de estas vías aéreas (Gopinath, cols., 2005).

1.4 Toxina de *Mannheimia haemolytica*. *Mannheimia haemolytica* produce una Lkt de 104 kDa miembro de la familia RTX de exotoxinas de bacterias gram negativas con reconocimiento exclusivo hacia leucocitos de rumiantes, que induce activación y/o muerte celular dependiendo de la concentración de la toxina.

La LFA-1 es un receptor para Lkt en leucocitos de bovinos también implicado en los efectos biológicos inducidos por la leukotoxina. Lkt crea poros en la membrana celular en leucocitos de bovinos que conduce a la hinchazón celular y lisis. En estudios anteriores utilizando leucocitos de bovino se han identificado a dos interleucinas como receptores de LktA. Las dos interleucinas tienen en común una subunidad que asocia la CD18 con cuatro distintas subunidades de CD11, que son: CD11a/CD18, también conocido como LFA-1, esta subunidad interacciona con el dominio de unión para esta leucotoxina situado entre los aminoácidos 1-121 de CD18 en la membrana plasmática de leucocitos. Esta toxina es considerada un importante factor de virulencia debido a los distintos efectos biológicos que desencadena en las células del sistema inmune. En neutrófilos polimorfonucleares estimula la producción de leucotrieno B₄ (LTB₄) considerado como un importante agente quimiotáctico responsable del influjo de neutrófilos dentro del pulmón infectado; estimula la apoptosis, ocasionando alteraciones en la membrana plasmática y lisis del neutrófilo. Los efectos biológicos de la Lkt son mediados por la interacción con LFA-1 (CD11a/CD18) en la membrana plasmática de leucocitos, de tal forma que estimula la liberación de productos reactivos del oxígeno y de elastasa.

La leucotoxina A (LktA) interactúa con macrófagos alveolares causando oncosis y/o apoptosis. El daño a estas células permite a la bacteria escapar de los mecanismos de defensa del huésped, prolongando su supervivencia e incrementando la severidad de la enfermedad (Dileepan, cols., 2005)

1.5 Proteínas de Membrana Externa. Las proteínas de membrana externa (OMP por sus siglas en inglés Outer membrane protein) permiten evadir la respuesta inmune del huésped. *Mh* produce dos proteínas de membrana externa OMP A de 32 kDa y OMP B de 35 kDa ambas con actividad de porina en la bicapa lipídica, con capacidad de destruir las células blanco. En cuanto a las lipoproteínas de superficie se ha identificado una lipoproteína útil en la inducción de la inmunidad hacia este patógeno, es una lipoproteína de membrana externa de 45 kDa en *M. haemolytica ST1* (PIpE), con un dominio inmunodominante localizado entre los residuos 26 y 76 del aminoterminal, que consiste en una región de ocho repeticiones de un hexapéptido (QVQMAP). La fabricación de una proteína recombinante para este antígeno (rPIpE) y su posterior utilización como vacuna, demostró resistencia de los bovinos experimentalmente inmunizados con el antígeno (Confer, cols., 1990 y 1997; Hounsone, cols., 2011).

1.6 Adhesinas. El estudio de las adhesinas bacterianas ha aportado nuevos conocimientos en los mecanismos de colonización e invasión de tejidos así como su papel en la respuesta inmunitaria. Las adhesinas son consideradas estructuras bacterianas que se localizan en la membrana. Entre otras funciones, se les asocia en la infección intestinal y extraintestinal en humanos por la bacteria *Aeromonas caviae* (Rocha-De-Souza, cols., 2001), la adhesina superficial de *M. leprae*, facilita la entrada en las células de Schwann (Shimoji, cols., 1999), también se propone que la interacción de la adhesina Fn de *Pasteurella multocida* pueda desempeñar un papel en la adherencia de la bacteria a las células huésped (Dabo, cols., 2005) asimismo, se han identificado varias adhesinas que tienen diferentes características y funciones (Tabla 1).

Tabla 1. Principales adhesinas identificadas en bacterias

Especie	Adhesina	PM /PI	Funciones	Referencia
<i>Helicobacter pylori</i>	HSBP (Heparin sulfato) OMP-HSBP	66.2 kDa pI 5.4 71.5 kDa pI 5.0 42.2 kDa OMP	Responsable de la Interacción con la mucosa de estómago humano en varias enfermedades.	Ruiz-Bustos, cols., (2001).*
<i>Aeromonas caviae</i>	Adhesina A6-HAG	43 kDa OMP	Adhesina asociada en la infección intestinal y extraintestinal en humanos.	Rocha-De-Souza, cols., (2001)
<i>Mycobacterium leprae</i>	ML-LBP21	21 kDa	Sugieren que puede funcionar como adhesina superficial y facilita la entrada en células de Schwann.	Shimoji, cols., (1999)
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Adhesina	110 kDa (dos subunidades de 54 y 28 KDa cada una)	Se adhiere al epitelio traqueal porcino y se sigue estudiando su función.	Chen, cols., (1998)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Adhesina superficial de pneumococo APsaA	34 kDa	Actualmente está bajo investigación como un componente potencial en las formulaciones de vacuna antineumocócica de tercera generación.	De, cols., (2000)
<i>Pasteurella multocida</i>	Fibronectina Fn	30 kDa	Adherencia de la bacteria a las células huésped.	Dabo, cols., (2005)
<i>Prevotella intermedia</i> 17	Adp B.	29 kDa	Mediador de la adherencia en la gingivitis y periodontitis.	Yu , cols. (2006)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA-IL PA-III	12,763 kDa 11,132 kDa	Asociadas con la virulencia cito tóxica.	Gilboa-Garber y Katcoj, (2000)

En *Mh* se ha identificado una adhesina de 68 kDa expresada durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano. La adhesina interacciona en la superficie celular a través de residuos de ácido siálico y N acetil glucosamina (GlcNAc) lo que indica que el receptor al que reconoce es una glicoproteína (Jaramillo y cols., 1999). Se ha demostrado que la adhesina participa en la adhesión de *Mh* a células epiteliales de la tráquea. De la Mora, cols., (2006) reportaron que la adhesina de *Mh* reconoce neutrófilos de bovino e induce la activación del estallido respiratorio, por lo que se considera que este factor de virulencia participa como molécula de adhesión en la colonización del epitelio ocasionando daño tisular por la producción de radicales libres.

Objetivo

Determinar el mejor método para la obtención y purificación de una adhesina de la *Mannheimia haemolytica*, y caracterizarla parcialmente.

Hipótesis

La obtención de la adhesina de *Mannheimia haemolytica* se modifica con la temperatura de cultivo bacteriano y del ligando empleado en la cromatografía de afinidad, el rendimiento difiere cuando se utiliza mucina, fetuina o estroma de conejo.

Material y Métodos

Obtención y manejo de la cepa de *Mannheimia haemolytica*

Bacteria

La cepa de *Mannheimia haemolytica* A1 (*Mh*) fue donada por el Dr. Francisco Suárez Güemes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de

la UNAM. Las bacterias se sembraron en agar sangre, manteniéndolas a 37° C durante 24 h. Posteriormente, la bacteria de *Mh* se resembró en 250 ml de medio de cultivo líquido BHI e incubó por 24 h a 37°C, con agitación constante. El procedimiento se repitió variando la temperatura en la segunda incubación a 39° C y 41°C respectivamente. Posterior al cultivo, se separó la biomasa obtenida en cada temperatura, por centrifugación a 15,000 x g a 4°C por 20 min, y el sobrenadante se concentró por el sistema Amicon (con membrana de corte PM 10000) y se conservó a 4°C hasta su posterior uso.

4.1 Obtención de la Adhesina de *Mh*.

El material obtenido en cada una de las 3 diferentes temperaturas (37, 39 y 41° C) se centrifugó a 12,000 x g por 20 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se precipitó en forma fraccionada al 25%, 50%, 75% y 100% con sulfato de amonio.

El sobrenadante se concentró con el sistema de Amicon y se conservó a 4°C hasta su uso.

4.2 Actividad de hemaglutinante con eritrocitos de diferentes especies animales.

Se realizaron pruebas de hemaglutinación, por el método de doble dilución seriada de los diferentes sobrenadantes, del medio y de la biomasa de *Mh*, frente a eritrocitos de diferentes especies animales, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM (conejo, cuyo, rata, caballo, bovino), y eritrocitos de sangre humana (Tipos A, B, O) que se obtuvieron de donadores sanos de la Facultad de Medicina, UNAM, de la siguiente manera: En placas de microtitulación con fondo en "U", se colocaron 25 µl de solución salina isotónica (SSI, NaCl 0.85%) por pozo, posteriormente, se agregaron 25 µl del extracto de *Mannheimia* a estudiar, al primer pozo, diluyéndolo de forma seriada. En seguida se agregaron 25 µl de la suspensión de eritrocitos al 2%, se mezcló cuidadosamente, se incubó a 4°C por 2 h y la lectura se tomó por observación

directa. Los resultados se presentan como actividad específica (título de la hemaglutinación/concentración de proteína) de acuerdo al método descrito por Vázquez y cols., (1993).

4.3 Determinación del peso molecular de la adhesina.

El peso molecular y el grado de homogeneidad de la adhesina purificada por cromatografía de afinidad se determinó por electroforesis de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Se realizaron geles de poliacrilamida al 10% y SDS, en condiciones reductoras, las muestras conteniendo 10-20 μg de proteína, se precipitaron con acetona y resuspendieron en amortiguador de muestra (Tris-HCl 75 mM, glicerol 10%, SDS 2%, (MSH 2%, azul de bromofenol 0.001%, pH 8.8).

Las muestras en el amortiguador, se sometieron a ebullición en baño seco por 10 min. Se utilizaron estándares de peso molecular de amplio rango de 6.5 a 200 kDa para tinción con azul de Coomassie (BioRad). La migración electroforética se realizó aplicando un voltaje constante de 80V y 200mA, en amortiguador de corrida (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1%, pH8.3). Se calcularon los Rfs de los estándares con la fórmula: $R_f = \text{Distancia de migración de la proteína} / \text{Distancia de migración del colorante}$. Los pesos moleculares fueron calculados en la gráfica de PM vs. Rfs, interpolando los valores del Rf de la lectina en la gráfica de los Rf de los estándares de pesos moleculares.

Precipitación fraccionada:

Se efectuó la precipitación fraccionada con Sulfato de Amonio a diferentes concentraciones: 25, 50, 75 y 100% de saturación. Se separó el precipitado de cada concentración de la precipitación fraccionada por centrifugación a 12,000 x g, por 20 min. Cada uno de los botones se resuspendió en solución salina al 0.9%, y dializó contra SSI y amortiguador salino de fosfatos (PBS, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 ,

NaCl, 0.15mM, pH 7.2); posteriormente, se determinó la actividad hemaglutinante con eritrocitos de conejo, especie con mejor actividad hemaglutinante. Las fracciones con actividad hemaglutinante se utilizaron para purificar la adhesina.

4.4 Purificación de la adhesina

Para la purificación, se usaron los extractos de las fracciones precipitadas que presentaron actividad hemaglutinante, el extracto concentrado y el sobrenadante de la biomasa obtenidos, por los procedimientos que a continuación se detallan.

a) Cromatografía de afinidad en estroma de conejo. Se preparó una columna de cromatografía de afinidad con estroma de eritrocitos de conejo tratados con glutaraldehído, de la siguiente manera: se obtuvo sangre de conejo en amortiguador salino de citratos (citrato de sodio dihidratado 4 g y NaCl 0.15 M, en proporción 1:1), a continuación se lavaron en solución salina isotónica (SSI, 0.85%) 300 x g/ 10 min, 4 veces, en seguida, los eritrocitos se rompieron por choque hipotónico con agua destilada fría (4°C), y se pusieron en agitación por 20 min. Las membranas de eritrocitos (o estroma), se lavaron 6 veces, con agua destilada, por centrifugación a 3,500 x g por 20 minutos, el botón se resuspendió en agua con una varilla de vidrio. Después de la última lavada, el botón se resuspendió con glutaraldehído al 2% y se colocó en agitación por 24 h a 4°C. Posteriormente, el estroma se lavó con agua y se bloquearon los sitios reactivos con glicina 1 M por 12 horas a 4°C. Finalmente se montó la columna usando Sephadex G25 como soporte y se equilibró con CaCl₂ 10 mM en SSI.

Se aplicaron diferentes cantidades de material, dependiendo de la procedencia de la muestra, la columna previamente equilibrada con PBS y un flujo de 10 ml/h, se lavó con PBS, para eliminar el material no retenido hasta tener una absorbancia < 0.001 a 280 nm. La adhesina se eluyó con ácido acético al 3% y el

pH ácido se neutralizó hasta 6.0 con NaOH1M. A cada fracción colectada de 2ml, se le midió la absorbancia a 280nm y la actividad hemaglutinante en presencia de eritrocitos de conejo al 2% en PBS. Las fracciones eluidas de la columna de afinidad se concentraron por ultrafiltración en una cámara Amicon (Amicon Colexington, Mass.) utilizando membranas PM/10 (límite de filtración de 10 kDa). La adhesina se conservó a -70°C hasta su uso.

Preparación de las matrices de Sepharose CL-4B con fetuína y mucina:

La Sepharose 4B-CL (5 ml para fetuína) y (5 ml para mucina), cada una se lavó con agua MilliQ (millipore) para eliminar el conservador y se mezcló con 10 ml de carbonato de potasio (K_2CO_3) 0.1 M y 0.5 ml de bromuro de cianógeno disuelto en acetonitrilo (1g/ml) en agitación constante por 20 min. a 4°C, se lavó la Sepharose activada con 3 L de agua MilliQ fría, y un lavado final de cloruro de sodio 0.5M, bicarbonato de sodio 0.5 M, pH 9, por último se añadió la fetuína (5 mg de fetuína/ml de Sepharose) y la mucina (5 mg de mucina/ml de Sepharose) en solución y se mantuvo en agitación constante por 24 h a 4°C. Una vez acopladas las glicoproteínas a la Sepharose, se bloquearon los sitios reactivos con glicina 1 M por 12 h a 4°C; finalmente se lavó la Sepharose-mucina y Sepharose-fetuína con PBS, se colocó en una columna y se equilibró con PBS hasta que se estabilizó el pH a 7.

b) Para la purificación de la adhesina, por cromatografía de afinidad en Sepharose-fetuína, se añadió a la columna el sobrenadante de los cultivos de *M. haemolytica*, la columna se lavó con PBS para eliminar el material no retenido hasta tener una absorbancia < a 0.001 a 280 nm. La adhesina se eluyó con ácido acético al 3% y el pH se neutralizó hasta 6.0 con NaOH 1M, cada fracción colectada de 1 ml, se le midió la absorbancia a 280 nm y la actividad hemaglutinante en presencia con eritrocitos de conejo al 2% en SSI-Ca. Las fracciones eluidas de la columna de afinidad fueron concentradas por

ultrafiltración en una cámara Amicon (Amicon Colexington, Mass.) utilizando membranas PM/10 (límite de filtración de 10 kDa). La adhesina se conservó a una temperatura de -70°C hasta su uso.

c) Para la purificación de la adhesina, por cromatografía de afinidad en Sepharose-mucina, se añadió a la columna el sobrenadante de los cultivos de *M. haemolytica*, la columna se lavó con PBS, para eliminar el material no retenido hasta tener una absorbancia menor a 0.001 a 280 nm. La adhesina se eluyó con ácido acético al 3% y el pH se neutralizó hasta 6.0 con NaOH 1M. A cada fracción colectada de 1ml, se le midió absorbancia a 280 nm y actividad hemaglutinante con eritrocitos de conejo al 2% en PBS. Las fracciones eluidas de la columna de afinidad fueron concentradas por ultrafiltración en una cámara Amicon (Amicon Colexington, Mass.) utilizando membranas PM/10 (límite de filtración de 10 kDa). La adhesina se conservó a -70°C hasta su uso.

4.5 Procedimientos analíticos

Cuantificación de proteína

Para la determinación de la concentración de proteína de las muestras, se empleó el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos se determinó utilizando 100 µg de adhesina pura en 30 µl de fenol al 0.3%, para prevenir la degradación de los residuos de tirosina, la mezcla se sometió a hidrólisis con 2 ml de HCl 6N a 110°C por 24 h con vacío. La composición de aminoácidos se determinó en un analizador de aminoácidos Beckman 119-CL, según la metodología descrita por Bidlingmeyer, cols., (1984).

Determinación de la secuencia NH₂-terminal.

La secuencia NH₂-terminal de la adhesina se determinó por degradación automatizada de Edman. La adhesina se resolvió por SDS-PAGE y se transfirió a membrana de poli-fluoruro de vinilideno (PVDF, BioRad Richmond, CA, USA). La micro secuencia fue determinada en un secuenciador de proteínas Porton-Beckman LF-300 equipado con un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC, Pharmacia, Upsala, Suecia).

Análisis bioinformáticos de la Lectina.

La secuencia de aminoácidos de la adhesina, fue comparada para buscar homologías y/o similitudes por analisis de BLAST en la base de datos del Centro Nacional para Analisis Biotecnologicos (National Center for Biothecnology Information; NCBI). Las secuencias de proteínas con más del 70% de similitud se analizaron con alineamientos múltiples (ClustalW, NCBI).

5. Resultados

Bacteria.

Se utilizó la cepa de referencia de *Mannheimia haemolytica* (*Mh*) donada por el Dr. Francisco Suárez Güemes, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, la bacteria fue cultivada en agar sangre (de bovino) a 37°C incubándola por 24 h.

Obtención de la adhesina de *Mh*.

Se obtuvieron cultivos de la bacteria de *Mh* a tres diferentes temperaturas: 37°C, 39°C y 41°C en 250 ml de medio de cultivo líquido BH1 para cada temperatura con agitación constante por 24 h.

Al extracto crudo de *Mh* a 41°C, se le determinó la actividad hemaglutinante, en presencia de eritrocitos: humanos, tipos A, B, O y eritrocitos

de otras especies animales: ratón, rata, conejo, cuyo, gato, caballo, y bovino. Solo presentó actividad hemaglutinante frente a eritrocitos de conejo (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad hemaglutinante de la adhesina de <i>Mannheimia haemolytica</i> .	
Eritrocitos	UHA*/ml
A	SA
B	SA
O	SA
Ratón	SA
Rata	SA
Conejo	640
Cuyo	SA
Gato	SA
Caballo	SA

*Unidades Hemaglutinantes en presencia de una solución de eritrocitos diferentes especies al 2%.
El resultado corresponde al título de hemaglutinación/ml).
SA= Sin Actividad hemaglutinante.

A 250 ml de cultivo bacteriano obtenido en cada una de las tres diferentes temperaturas: 37°C, 39°C y 41°C, se les separó el sobrenadante por centrifugación (15,000 x g por 20 min a 4°C).

A los extractos totales obtenidos en cada una de las tres diferentes temperaturas se les determinó actividad hemaglutinante en presencia de eritrocitos de conejo (al 2%). El cultivo de *Mh* a la temperatura de 41°C contiene la mayor cantidad de actividad aglutinante, el doble que el cultivo a 39°C mientras que si se cultiva a 37°C no hay actividad aglutinante detectable en el sobrenadante (Tabla 3).

Tabla 3			
Actividad hemaglutinante y concentración de proteínas del extracto crudo del cultivo de <i>Mh A1</i> a diferentes temperaturas.			
Temperatura	[Proteína] mg/ml	UHA*	AE**
37°C	1.6	0	0
39 °C	1.8	320	178
41°C	1.8	640	356

*UHA= Unidad hemaglutinante por ml

**AE= Actividad específica UHA/mg de proteína

El sobrenadante obtenido a 41°C con mayor actividad aglutinante y actividad específica, se selecciono para continuar los ensayos, éste sobrenadante se sometió a precipitación fraccionada con diferentes porcentajes de sulfato de amonio (25%, 50%, 75% y 100%).

Las muestras obtenidas de la precipitación fraccionada a 25%, 50%, 75% y 100% con sulfato de amonio, se mantuvieron en refrigeración 1, 10 y 20 días, una vez centrifugadas, resuspendidas y dializadas, se hicieron pruebas de hemaglutinación en las tres condiciones de almacenaje. La mayor actividad aglutinante se encuentra en la muestra precipitada con SA al 75%, el doble de la que se identifica en la precipitación al 50%, mientras que en las otras dos condiciones (25 y 100%) disminuye considerablemente la actividad (Tabla 4). Por otro lado, la actividad hemaglutinante disminuyó en un 50% después de 5 y 10 días de almacenaje de la muestra, sin embargo, si la muestra se mantiene sin

precipitar (extracto total, Tabla 4), no se modifica la actividad hemaglutinante en los 10 días del ensayo.

Tabla 4. Precipitación fraccionada del sobrenadante de *Mh* a 41°C

Tiempo			
	[Proteína] mg/ml	UHA*	AE**
24 horas			
25%	1.43	320	224
50%	1.54	2560	1662
75%	1.63	5120	3141
100%	1.5	320	213
Extracto total***	1.8	640	356
5 días			
25%	1.45	160	110
50%	1.35	1280	948
75%	1.55	2560	1651
100%	1.45	320	221
Extracto total***	1.8	640	356
10 días			
25%	1.4	0	0
50%	1.5	1280	853
75%	1.63	2560	1571
100%	1.43	0	0
Extracto total***	1.8	640	356

(i)*UHA= Unidad hemaglutinante por ml

(ii)**AE= Actividad específica UHA/mg de proteína

(iii)***Sobrenadante sin precipitar almacenado en las mismas condiciones.

Purificación de la adhesina de *Mh* A1. Para purificar la adhesina, se realizaron tres procedimientos de cromatografía de afinidad: fetuina acoplada a Sephadex (5 mg/ml); mucina acoplada a Sephadex (5mg/ml) y estroma de eritrocitos de conejo-Sephadex G-10.

Una vez equilibrada cada columna se aplicó una muestra del extracto precipitado con sulfato de amonio a una saturación del 75% y dializado; se colectaron fracciones, se obtuvo la fracción no retenida y se eluyó con ácido acético al 3% para obtener la fracción retenida.

a) Purificación de adhesina en estroma de conejo

Se agregó sobrenadante a la columna de estroma de conejo, en la fracción no retenida (FNR) no se detectó actividad hemaglutinante (figura 1 y tabla 5). A partir de 18 mg se obtuvieron 0.637 mg de lectina. La actividad específica se incrementó once veces con respecto al extracto empleado.

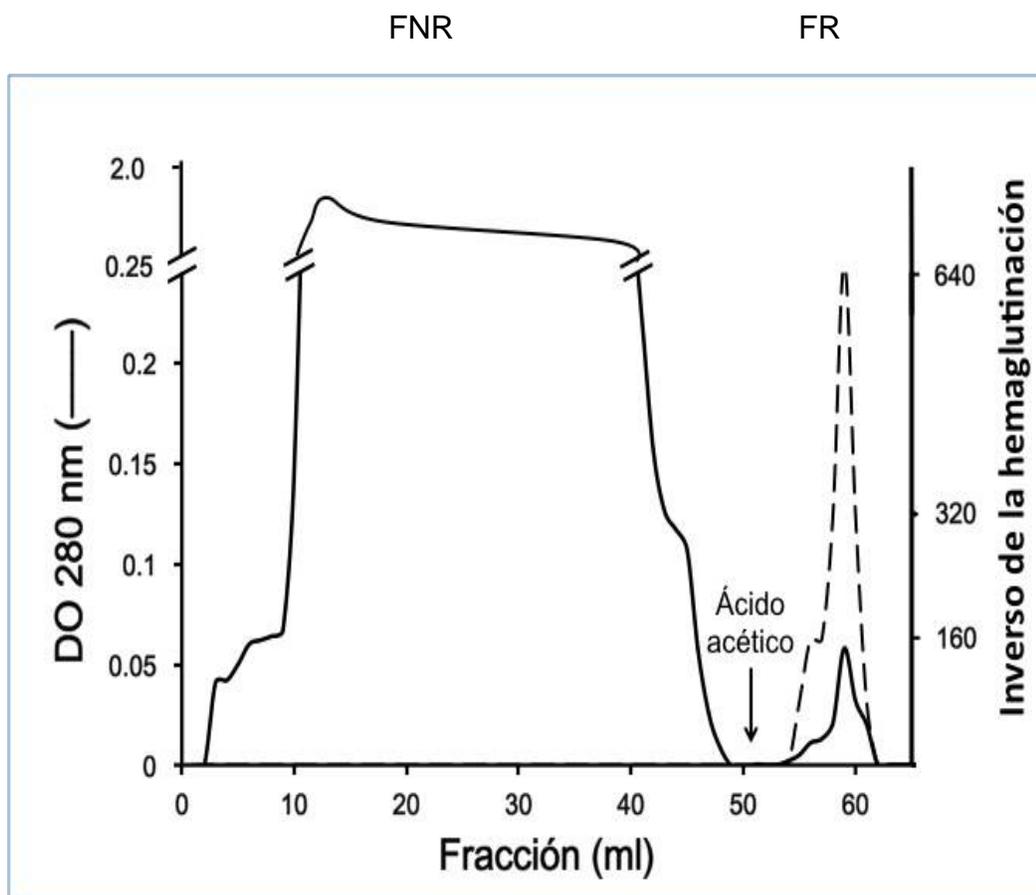


Figura 1. Perfil de elución de la adhesina de *Mannheimia haemolytica* por cromatografía de afinidad en estroma de eritrocitos de conejo. FNR Fracción no retenida; y FR Fracción retenida. La adhesina se eluyó con ácido acético al 3% y se ajustó el pH a 6 con NaOH 1M previo ensayo de aglutinación. A cada fracción se le determinó absorbancia a 280 nm (—) y actividad aglutinante (- -) reportada como el inverso del título de hemaglutinación (UHA), en presencia de eritrocitos de conejo al 2%.

Tabla 5. Purificación de la adhesina de *Mannheimia haemolytica* por cromatografía de afinidad con estroma de conejo.

Muestra	Proteína [mg/ml]	*UHA	AE**
Total***	1.8	640	353
FNR	1.2	0	0
Adhesina	0.637	2560	4019

*UHA= Unidad hemaglutinante por ml

**AE= Actividad específica UHA/mg de proteína

***Extracto total de *Mh* sin precipitar

b) Purificación de adhesina de *Mh* en columna de afinidad en fetuina

Se agregó sobrenadante a la columna de fetuina, en la fracción no retenida (FNR) no se detectó actividad hemaglutinante (figura 2 y tabla 6). A partir de 5.4 mg se obtuvieron 0.42 mg de lectina. La actividad específica se incrementó ocho veces con respecto al extracto empleado.

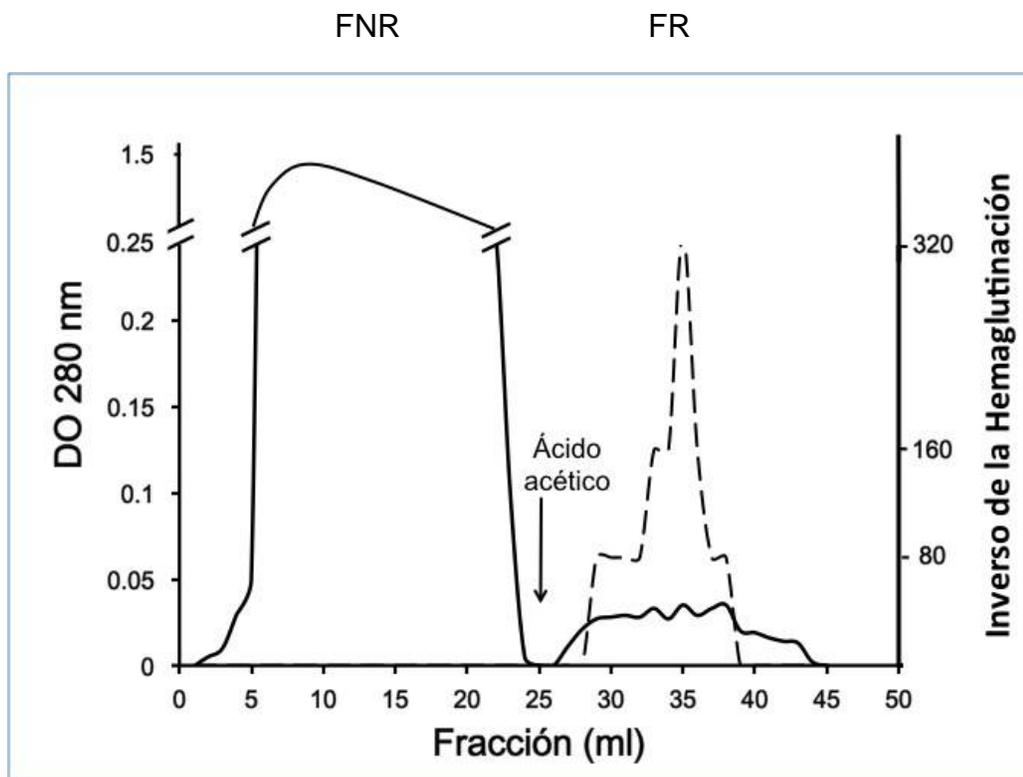


Figura 2. Perfil de elución de la adhesina de *Mannheimia haemolytica* por cromatografía de afinidad en fetuina. FNR Fracción no retenida; y FR Fracción retenida. La adhesina se eluyó con ácido acético al 3% y se ajustó el pH a 6 con NaOH 1M previo ensayo de aglutinación. A cada fracción se le determinó absorbancia a 280 nm (—) y actividad aglutinante (- - -) reportada como el inverso del título de hemaglutinación (UHA), en presencia de eritrocitos de conejo al 2%.

Tabla 6. Purificación de la adhesina de *Mannheimia haemolytica* por cromatografía de afinidad con Fetuina.

Muestra	Proteína [mg/ml]	*UHA	AE**
Total***	1.8	640	353
FNR	1.3	0	0
Adhesina	0.42	1280	3048

*UHA= Unidad hemaglutinante por ml

**AE= Actividad específica UHA/mg de proteína

***Extracto total de *Mh* sin precipitar

c) Purificación de adhesina de Mh en columna de afinidad en mucina

Se agregó sobrenadante a la columna de mucina, en la fracción no retenida (FNR) no se detectó actividad hemaglutinante (figura 3 y tabla 7). A partir de 1.8 mg se obtuvieron 0.395 mg de lectina. La actividad específica se incrementó ocho veces con respecto al extracto empleado.

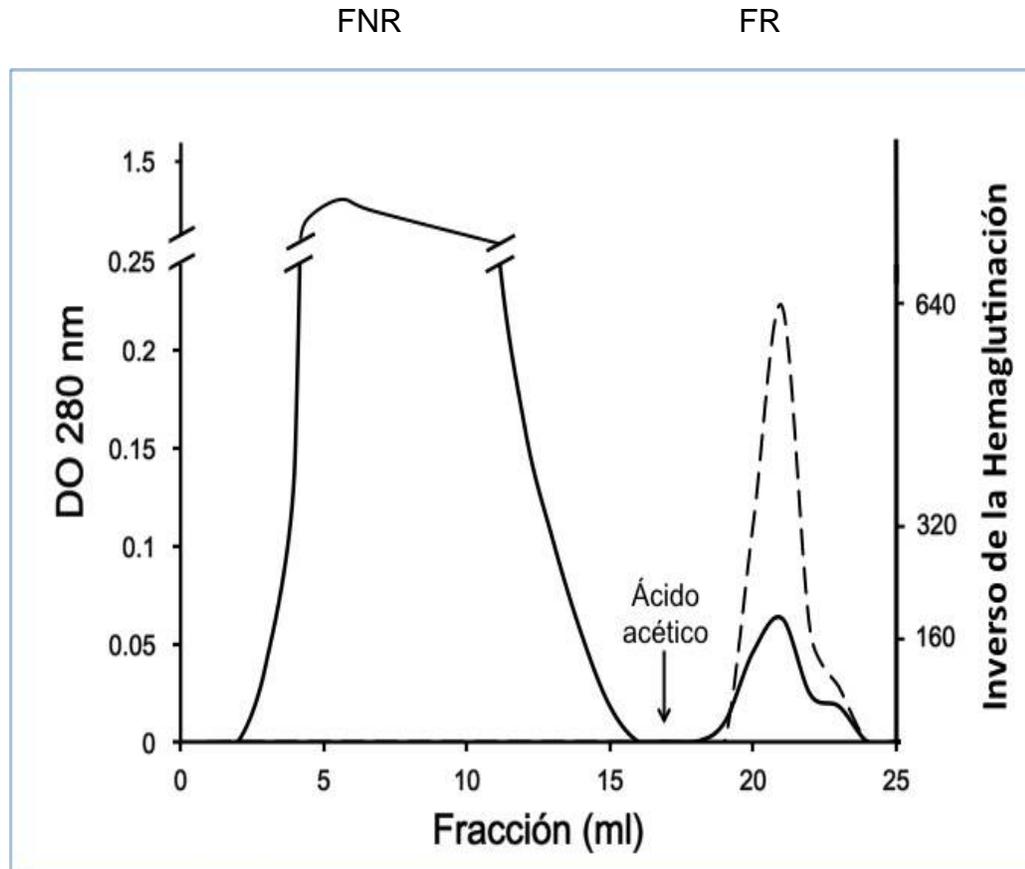


Figura 3. Perfil de elución de la adhesina de *Mannheimia haemolytica* por cromatografía de afinidad en Mucina. A) Fracción no retenida; y B) Fracción retenida. La adhesina se eluyó con ácido acético al 3% y se ajustó el pH a 6 con NaOH 1M previo ensayo de aglutinación. A cada fracción se le determinó absorbancia a 280 nm (—) y actividad aglutinante (- - -) reportada como el inverso del título de hemaglutinación (UHA), en presencia de eritrocitos de conejo al 2%.

Tabla 7. Purificación de la adhesina de *Mannheimia haemolytica* por cromatografía de afinidad con Mucina.

Muestra	Proteína [mg/mL]	UHA*	AE**
Total***	1.8	640	353
FNR	1.4	0	0
Adhesina	0.395	2560	6481

*UHA= Unidad hemaglutinante por ml

**AE= Actividad específica UHA/mg de proteína

***extracto total de *Mh* sin precipitar

La mayor cantidad de adhesina pura se obtuvo empleando la columna de estroma de conejo (0.637 mg/ml contra 0.395 mg/ml en columna de mucina), la mayor actividad específica 0.395 mg/ml se ve en la columna de mucina (Tabla 7).

Inhibición de la adhesina de *Mh*.

La inhibición frente a carbohidratos y glicoproteínas se muestra a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones mínimas de azúcares (μM) y glicoproteínas que inhiben la actividad hemaglutinante de la adhesina de *Mannheimia haemolytica*.

Azúcar y/o glicoproteína	Concentración (μM)	Potencia inhibitoria
N acetil-D-Glucosamina	25	6
Mucina Submaxilar Bovina	25	6
Fetaina	25	2
Metil β -galactopiranosida	25	0
Melobiosa	25	0
D (+) Galactosa	25	0
N acetil-D-Galactosamina	25	0
D-Glucosa anhidra	25	0
Methyl α -D-Manopiranosida	25	0
Lactosa	25	0
Mucina de estómago porcino	25	0

Azúcares que no inhibieron a 400 mM fueron: Metil β -galactopiranosida, Melobiosa, D(+) galactosa, N acetil-D Galactosamina, D- Glucosa anhidra, Metil α -D-manopiranosida y Lactosa.

La glicoproteína que no inhibió a una concentración máxima de 10 mg/ml fue la Mucina de estómago porcino.

Caracterización química de la Adhesina de *Mh*

La adhesina purificada de la *Mh*, es una proteína de 45 kDa, determinado por electroforesis desnaturizante (Fig.4).

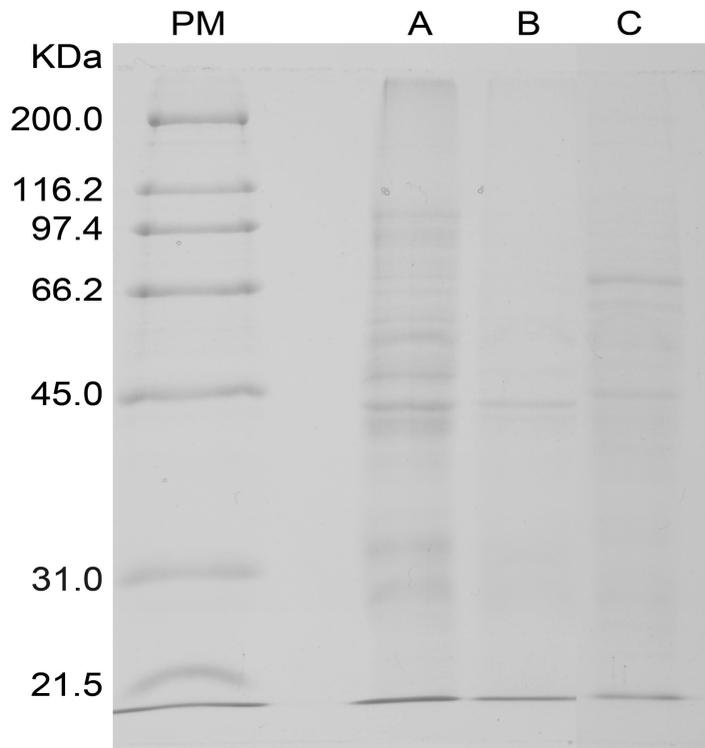


Figura 4. Electroforesis de *Mannheimia haemolytica*: PM: Pesos moleculares; A: sobrenadante de cultivo de Mh; B: mezcla de fracciones retenidas de adhesina pura; C: Fracción no retenida.

Contenido de aminoácidos.

Los aminoácidos que se encuentran en mayor proporción son glicina, serina, isoleucina, ácido glutámico, alanina, metionina y ácido aspartico, y en menor cantidad valina y lisina; carece de leucina, fenilalanina, tirosina, cisteína, prolina, treolina, arginina, histidina y prolina (Tabla 9).

Tabla 9. Composición de aminoácidos

Aminoácido	Porcentaje (%)
Ácido Aspártico	7.14
Acido glutámico	9.34
OH Prolina	0
Serina	22.35
Glicina	22.8
Histidina	0
Arginina	0
Treonina	0
Alanina	8.52
Prolina	0
Tyrosina	0
Valina	3.57
Metionina	7.69
Cisteína	0
Isoleucina	16.21
Leucina	0
Fenilalanina	0
Lisina	2.47

Estructura primaria

Se identificó la secuencia de aminoácidos de la adhesina con el método de Edman y se obtuvo la secuencia: APQANTFYAGAKAGWASF, al realizar una búsqueda en BLAST (el análisis se realizó en el programa BLAST del NCBI en una base de datos no redundante), el resultado marca identidad -de los 18 aminoácidos analizados- en mas de 500 proteínas, principalmente con proteínas de membrana y con proteínas de membrana externa A (Outer membrane protein A, OMPA); para limitar la búsqueda, se repitió el ensayo indicando la especie de búsqueda a "Mannheimia", en esta búsqueda se presentó identidad de la secuencia con 18 proteínas de todos los aminoácidos indicados en la secuencia (Tabla 10) como en el caso de la búsqueda inicial, la identidad corresponde a proteínas de membrana y proteínas de membrana externa modificable por calor

(Heat modifiable outer membrane protein; HM-OMP); se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias que presentaron el mayor puntaje total (puntaje = 71.3), que corresponde a una proteína de membrana y a dos HM-OMP (Tabla 11) la posición de la secuencia obtenida por Edman, se observa cercana a la región amino terminal de las proteínas de membrana.

Tabla 10. Proteínas identificadas por BLAST.

Descripción ¹	Puntaje Max.	Puntaje Total	E value	Ident	Acceso
Proteína de membrana [serotipo A1/A6 str. PKL10]	59.6	59.6	1e-12	100%	EXI62280.1
Proteína de membrana externa modificable por calor	59.6	71.3	1e-12	100%	AAO85790.1
Proteína de membrana	59.6	59.6	1e-12	100%	WP_006251917.1
Proteína de membrana	59.6	59.6	1e-12	100%	WP_020824288.1
Proteína de membrana externa modificable por calor	59.6	59.6	1e-12	100%	AAO85787.1
Proteína de membrana externa modificable por calor	59.6	59.6	1e-12	100%	AAO85786.1
Proteína de membrana externa modificable por calor	59.6	71.3	1e-12	100%	AAO85789.1
Proteína de membrana	59.6	59.6	1e-12	100%	WP_006252598.1
Proteína de membrana	59.6	71.3	1e-12	100%	WP_021280481.1
Proteína de membrana externa modificable por calor (OMP P5)	59.6	59.6	1e-12	100%	WP_006253600.1
Proteína de membrana externa modificable por calor	59.6	59.6	1e-12	100%	AAO85782.1
Proteína de membrana externa modificable por calor	59.6	59.6	1e-12	100%	AAO85784.1

La búsqueda se realizó en una base de datos no redundante, limitando a la especie de *Mannheimia*.

¹ Todas las proteínas corresponden a *M. haemolytica*.

Tabla 11. Alineamiento de la secuencia en las proteínas identificadas en BLAST.

AA085790.1	1	MKKT <small>LV</small> ALAVLSAAAVAQAAPQANTFYAGAKAGWASPHDGLTQFDHK-DGGEF-----GINRNSVTYGVFGGYQILN	71
AA085789.1	1	MKKT <small>LV</small> ALAVLSAAAVAQAAPQANTFYAGAKAGWASPHDGLTQFDHKKDGGEFSIQYG----INRNSVTYGVFGGYQILN	76
WP_021280481	1	MKKT <small>LV</small> ALAVLSAAAVAQAAPQANTFYAGAKAGWASPHDGLTQFDHKKDGGEFSIQYGlkyGINRNSVTYGVFGGYQILN	80
AA085790	72	QNNFGLATELGYDYFGRVVRGNTTFAGDDKEKTAAKHSAHGAHLSLKPSYEVVPNLDVYGKVGVALVRNDYYVQQRVAKDS	151
AA085789	77	QNNFGLATELGYDYFGRVVRGNTTFAGDDKEKTAAKHSAHGAHLSLKPSYEVVPNLDVYGKVGVALVRNDYYVQQRVAKDS	156
WP_021280481.1	81	QNNFGLATELGYDYFGRVVRGNTTFAGDDKEKTAAKHSAHGAHLSLKPSYEVVPNLDVYGKVGVALVRNDYYVQQRVAKDS	160
AA085790	152	RIKAHNLKPSLLLGAGLEYAITPELAARVEYQYLNVRVGNLDKAARKTANIE-GTNFQYSPDIHSVSAGLSYRFGQGAAPV	230
AA085789	157	RIKAHNLKPSLLLGAGLEYAITPELAARVEYQYLNVRVGNLDKAVRKTVSLPTGTNFQYSPDIHSVSAGLSYRFGQGAAPV	236
WP_021280481.1	161	RIKAHNLKPSLLLGAGLEYAITPELAARVEYQYLNVRVGNLDKAVRKTVSLPTGTNFQYSPDIHSVSAGLSYRFGQGAAPV	240
AA085790	231	EAPVVTKNFAFSSDVLDFGKSSSLKPAATSLDAAHAEISNLGLANLAIQVNGYTDRIKESNLKLSQRRRAETVANYI	310
AA085789	237	EAPVVTKNFAFSSDVLDFGKSSSLKPAATSLDAAHAEISNLGLANLAIQVNGYTDRIKESNLKLSQRRRAETVANYI	316
WP_021280481.1	241	EAPVVTKNFAFSSDVLDFGKSSSLKPAATSLDAAHAEISNLGLANLAIQVNGYTDRIKESNLKLSQRRRAETVANYI	320
AA085790	311	VSKGTNPANVTAVGYGEANPVTGHTCDAVKGRKALIACLAPDRRVEIQVQGSKEVTM	367
AA085789	317	VSKGTNPANVTAVGYGEANPVTGHTCDAVKGRKALIACLAPDRRVEIQVQGSKEVTM	373
WP_021280481	321	VSKGTNPANVTAVGYGEANPVTGHTCDAVKGRKALIACLAPDRRVEIQVQGSKEVTM	377

Para el alineamiento se seleccionaron las que presentaron el mayor puntaje total del análisis de BLAST y remarcado en amarillo se presenta la posición de la secuencia obtenida por degradación de EDMAN.

6. Discusión

En el presente estudio se analizaron métodos alternativos para conocer las mejores condiciones para obtener la adhesina pura de *Mannheimia haemolytica*, y facilitar el estudio e investigación con relación a los mecanismos de acción de la fiebre de embarque que se presenta en el ganado.

El estudio de las adhesinas en bacterias patógenas es de gran importancia por el papel que representan en la invasión al hospedero. Se han reportado diversas adhesinas de bacterias cuya función está asociada a facilitar la invasión bacteriana, algunos ejemplos de éstas se pueden ver en la Tabla 1.

En la primera parte se obtuvieron cultivos bacterianos de una cepa de *M. haemolytica* serotipo A1, a tres diferentes temperaturas 37, 39 y 41 ° C. De ellas la de 37°C no presentó actividad aglutinante en el sobrenadante de cultivo, la mayor actividad se identificó en el sobrenadante que se obtuvo a 41°C (Tabla 3); la

liberación de la adhesina bacteriana a diferentes temperaturas, de normal a una fase de fiebre en bovinos, sugiere que puesto que la *Mh* es un hospedero normal en el bovino, para su activación requiere de un factor estresante, que cause disminución en la inmunidad del organismo y permita la infección de otro agente patógeno, posiblemente algún agente viral, para que induzca la fiebre y con ello desencadene la pasteurelisis. Asimismo, se encontró que al aumentar la liberación de la adhesina a 41°C, pudiera favorecerse la adhesión bacteriana probable responsable del inicio de los mecanismos de invasión al hospedero, de manera similar a como actúan otras adhesinas de bacterias (Tabla 1).

Este fenómeno de expresión de proteínas a diferentes temperaturas se ha demostrado en otras bacterias, por ejemplo, en un estudio realizado por Valvatne, cols., (1996), se identificó un polipéptido de 20.8 kDa cuando la bacteria *Escherichia coli* creció a 37 °C, si la bacteria se desarrolla a 22°C se pierde la expresión del polipéptido.

Precipitación Fraccionada

De acuerdo con Englard y Seifer, 1990, la eficiencia de la separación de proteínas por cromatografía depende en gran medida de las etapas preliminares que involucran, entre otros el procedimiento de precipitación. La purificación de proteínas es mejor cuando se incluye al menos un procedimiento de precipitación previo. De acuerdo con Ito, 1999, la precipitación salina con gradientes de concentración con sulfato de amonio y un sistema de cromatografía permite fraccionar proteínas en función de su solubilidad. En el presente estudio se llevó a cabo la precipitación con sulfato de amonio del sobrenadante de *Mh* del cultivo a 41°C con gradientes de 25, 50, 75 y 100%, y la determinación de hemaglutinación, el mejor resultado se obtuvo al 75% de precipitación. Según Englard y Seifer 1990, una proteína que precipita favorablemente, en concentraciones altas de sales como el sulfato de amonio, decrementa su solubilidad y precipita debido a que disminuye la repulsión electrostática entre

cargas y se altera la estructura de moléculas de agua alrededor de la proteína globular, los iones de sal compiten con las moléculas de agua de la proteína.

De conformidad con los resultados la adhesina es una proteína que al precipitarla pierde su actividad, debido a que se modifica su solubilidad al competir las sales con los sitios hidrofílicos de las proteínas, y a la fuerza iónica generada por los grupos amino y carboxilo. La adhesina sufre una desnaturalización reversible, que con la eliminación de las sales evento que permite recuperar su actividad.

Algunas adhesinas requieren metales y/o iones, tales como el calcio, para recuperar su actividad, lo que se puede confirmar al realizar pruebas de hemaglutinación de la adhesina y añadirles diferentes metales como calcio, manganeso.

En estudios preliminares realizados por Jaramillo, cols., (2000), se observó que al 66% de saturación rinde al menos 90 por ciento de la actividad de hemaglutinación, con nuestros resultados, es indicativo que al precipitar al 75% de saturación, obtenemos una mayor cantidad de la actividad hemaglutinante del extracto total (Tabla 4), el doble que al 50% y 16 veces más que al 25 y 100% de saturación.

Una vez precipitada, la muestra de extracto bacteriano, se almacenó en sulfato de amonio al 75%, días después se dializó contra SSI. Tras su restitución, se observó que a los 5 días, perdió el 50% de su actividad, lo que sugiere que la estabilidad de la adhesina se compromete en función de la permanencia en sulfato de amonio, haciendo un cambio irreversible en su estructura. Por lo cual para usos posteriores, se recomienda que la muestra, una vez realizado el procedimiento de precipitación se procese de inmediato, o bien, en el momento de obtener el sobrenadante se congele y posteriormente se realice el proceso de precipitación.

Los tres métodos alternativos para la purificación de la adhesina nos permitieron confirmar que la eficiencia de la cromatografía es mayor cuando en

forma previa se realiza una precipitación y que es posible obtener la adhesina, utilizando los tres tipos de cromatografía. Sin embargo, de acuerdo a los resultados y a la cantidad de muestra, se tiene mayor rendimiento cuando se utiliza la columna de estroma de conejo, con las ventajas de que es más económico y, por los reactivos empleados, menos riesgoso preparar una columna de estroma y es posible aplicar mayores cantidades de extracto. Desafortunadamente, la cantidad de adhesina que se purificó no fue suficiente para realizar una electroforesis comparativa de los tres métodos la que se presenta en este trabajo corresponde a una mezcla de adhesina de las tres columnas; lo que sí se puede decir, en función de la pureza de la lectina purificada, es que la obtenida de la columna de mucina es más pura, pues presenta mayor actividad específica.

La caracterización de la adhesina de *Mh* indica que se trata de una glicoproteína con un peso molecular de 45 kDa que difiere del peso molecular reportado por Jaramilo, cols., (1999), tiene mayor actividad hemaglutinante con eritrocitos de conejo y es específica actividad a N acetyl D-glucosamina, mucina submaxilar bovina y fetuina (Jaramillo, 2000; De la Mora, cols., 2006). Las mucinas son glicoproteínas macromoleculares que constan de un núcleo central polipeptídico lineal (100 a 250 KDa) denominado apomucina y de una porción glicosilada (Wolinsky, cols 1996), y se caracteriza por la presencia de cadenas laterales de carbohidratos como GlcNAc, N-acetil galactosamina (GalNAc), galactosa, fucosa, manosa y ácido N-acetilneuramínico unidos covalentemente, mediante enlaces O-glicosídicos, conforman más de un tercio del contenido de aminoácidos de la región glicosilada (Rima, cols. 1995); la MEP, además contiene disacáridos simples de ácido siálico y GalNac en su región glicosilada (Wolinsky, 1996) no inhibe la actividad de la adhesina, posiblemente porque los ácidos siálicos que se presentan en esta mucina son diferentes a los de la mucina submaxilar bovina (Blix, cols., 1956).

A pesar de la diferencia en masa molecular, con la reportada por Jaramillo, cols., (1999) tiene similitudes en sus características inhibitorias.

La adhesina de *Mh*, a diferencia de otras adhesinas bacterianas que generan cuadros inflamatorios, presenta especificidad dirigida a azúcares N acetilados (tabla 1); las adhesinas de: *Helicobacter pylori* y *Pseudomonas aeruginosa* también reconocen azúcares N acetilados como GalNAc β 1 y 4GlcNAc y otros azúcares como galactosa, fucosa y manosa, en todos los casos las adhesinas de estas bacterias están asociadas con la virulencia citotóxica.)

Se identificó que la adhesina de *M. haemolytica*, está constituida por altas concentraciones de Glicina, Serina, Isoleucina, Ácido glutámico, Alanina y Metionina, alguno de estos aminoácidos (Gly, Ser, Glx) también se encuentran en mayor proporción en la composición de la adhesina reportada por Jaramillo y cols., (2000). No obstante la secuencia amino-terminal identificada APQANTFYAGAKAWASF, difiere de la reportada por Jaramillo (ANEVNVYIKQPYLI), Con relación a otras adhesinas, se cuenta con poca información relacionada con la secuenciación y composición de aminoácidos; esta adhesina también difiere de la reportada por Bertin, cols. (1996). Dados los datos presentados, peso molecular, composición de aminoácidos, actividad hemaglutinante e inhibición de la aglutinación, se sugiere que *M. haemolytica* conserva una adhesina, que posiblemente se ha modificado, debido al tiempo de conservación de los cultivos de la cepas con pérdida de virulencia, o que la bacteria exprese una lectina diferente en función de la pérdida de virulencia por los tiempos prolongados de cultivo. Esto se ha demostrado en otras bacterias, con cultivos bacterianos prolongados, en donde se ha reportado que las bacterias cambian sus características y con ello las proteínas que expresan y/o su virulencia.

La secuencia muestra identidad con proteínas de membrana y OMP's, de diferentes especies, la búsqueda específica da un perfil similar. Se ha reportado que las HM OMP de *M. haemolytica*, es una proteína de 45 kDa que tiene la capacidad de reconocer fibronectina (lo, Sorensen, 2007), y la secuencia que identificamos corresponde a los aminoácidos 20 al 37 de las proteínas alineadas

(Tabla 10.). En otras especies, las HM- OMP's tienen la función de reconocer fibronectina (Tabla 1), pero no se han identificado como lectinas, así que la identificación de esta lectina que reconoce al fibrinógeno, abre la posibilidad de estudiar el mecanismo de invasión o evasión que presenta la bacteria, ya que al reconocerlo, su presencia se puede “enmascarar” y así puede circular libremente en el torrente sanguíneo e infectar sistémicamente o bien, pueden funcionar como mecanismo de adhesión para la invasión de la bacteria a las células; como sucede en el caso de *Prevotella intermedia* (Yu, cols. 2006) y en *Helicobacter pylori* (Ruíz-Bustos, cols., 2001).

7. Conclusiones

La mejor temperatura para el cultivo bacteriano y la obtención de adhesina de *Mh* es 41°C.

Almacenar la muestra con sulfato de amonio reduce la actividad de la adhesina.

La adhesina, obtenida por cromatografía en columna de mucina es más pura.

La adhesina purificada de *Mh* es una proteína de 45 kDa con especificidad a N-acetil –glucosamina, mucina y fetuina.

8. Perspectivas

Identificar la participación de la adhesina en los mecanismos de evasión del sistema inmune o en los mecanismos de adhesión de la bacteria durante la infección:

Identificar si la fibronectina y ácidos siálicos, inhiben la actividad de la adhesina

Comprobar la presencia de dos adhesinas.

Estudiar la proteína de membrana que es el ligando de la adhesina.

Caracterizar las proteínas identificadas por espectrometría de masas.

Analizar el uso potencial uso de la adhesina como vacuna contra la manhemiosis.

9. Bibliografía

Angen, O., Mutters, R., Caugant, D.A., Olsen, J.E., Bisgaard, M., (1999), Taxonomic relationships of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16 rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 67-86.

- Bertin, Y., Girardeau, J.P., Darfeuille-Michaud, A., Contrepolis, M., (1996). Characterization of 20K fimbria, a new adhesin of septicemic and diarrhea-associated *Escherichia coli* strains, that belongs to a family of adhesion with N-acetyl-D-glucosamine recognition. *Infect.Immun*, Jan; 64 (1):332-342.
- Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S. A., Tarvin, T.L., (1984), Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.* 336: 93-104.
- Bleul, U., (2009). Respiratory distress syndrome in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* Mar; 25 (1): 179-93.
- Blix, G., Svennerholm, L. and Werner, I (1956). *Acta Soc. Med. Upsal.*,61,1
- Boyce, J., Lo, R., Willkie, I., Adler, B. (2004). *Pasteurella* and *Mannheimia*. In: Giles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O., editors. *Pathogenesis of Bacterial Infectious in Animals*. Carlton, Australia: Blackwell Publishing; 273-294.
- Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Chen, J.R., Lin, J.H., Weng, Ch.N, Lai, S.S. (1998), Identification of a novel adhesion-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 62: 97-110.
- Cole, N.A., (1996). Review of bovine respiratory disease: Nutrition and disease interactions. Pages 57-74 in *Review of Bovine Respiratory Disease*-Schering Plough Animal Health. R. Smith, ed. *Veterinary Learning Systems*, Trenton, NJ.
- Confer, A., Paulsen, D., Clinkenbeard, K., Mosier, D. (1990). *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-induced arachidonic acid release from a neutrophil adherence to bovine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Vet Res* ; 51:1635-1639.

- Confer, A., Mahasreshti, P.J., Murphy, G.L., Wyckoff III, J.H., Farmer, S., Hancock, R.W., (1997). Purification and Partial Characterization of the OmpA Family of Proteins of *Pasteurella haemolytica*. I Immun, NUMERO O VOLUMEN: 211–218.
- Dabo, S.M., Confer, A.W., Harston, S.D. (2005) Adherence of *Pasteurella multocida* to fibronectin. Veterinary Microbiology 110; 265–275.
- De la Mora, A., Trigo, F., Jaramillo, L., Garfias, Y., Solórzano, C., Agundis, C., Pereyra, A., Lascurain, R., Zenteno, E., Suárez-Guemes, F., (2006). The N-acetyl-D-glucosamine specific adhesin from *Mannheimia haemolytica* activates bovine neutrophils oxidative burst. Vet. Immunol Immunopathol 113, 148-156.
- De, B.K., Sampson, J.S., Ades, E.W., Huebner, R.C., Jue, D.L., Johnson, S.E., Espina, M., Stinson, A.R., Briles, D. E., Carlone, G.M., (2000). Purification and characterization of *Streptococcus pneumoniae* palmitoylated pneumococcal surface adhesion A expressed in Escherichia coli. Vaccine 18:1811-1821.
- Dileepan, T., Thumberkat, P., Walcheck B., Kannan, M.S., Maheswaran, S.K. (2005). Recombinant expresión of bovine LFA-1 and characterization of its role as a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. Microb. Pathog. 2005; May-Jun;38 (5-6): 249-57.
- Duff G.C, Gaylean M.L., (2007). Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. J Anim Sci 2007;85:823-40. ; Perino L J, Apley MD. Clinical trial design in feedlots. 1998; Pages 343–365 in Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. E. Hunt and G. L. Stokka, ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA. Vol. 14. No. 2. ; Noffsinger, T, Locatelli, L. Low-stress cattle handling: An overlooked dimension of management. 2004; Pages 65–78 in Proc. Meet. Academy of Veterinary Consultants. Vol. XXXII, No. 2.

- Englard, S., Seifer, S.,(1990). Precipitation Techniques. In Deutscher MP, editor. Methods in Enzymology: Guide to protein Purification. San Diego, CA. USA: Academic Press;1990.pp 285-300
- Faber, R., N. Hartwig, D. Busby, R. BreDahl. (1999). The costs and predictive factors of bovine respiratory disease in standardized steer tests. AS Leaflet R1648. 1999 Beef Res. Rep. Iowa State. Univ. Press, Ames.
- Gilboa-Garber, N., Katcoj, D.J., (2000). Identification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin gene and protein compared to PA-IL. FEMS Immunology and Medical Microbiology 29. 53-57.
- Gopinath, R.S., Ambagala, T.C., Deshpande, M.S., Donist, R.O., Srikumaran,S. (2005) Mannheimia (Pasteurella) haemolytica Leukotoxin Binding Domain Lies within Amino Acids 1 to 291 of Bovine CD18. Infect.Immun. Sep- 73 (9): 6179-6182.
- Griffin, D. (1997). Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 3:367–377.
- Highlander, S.K., (2001), Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Frontiers in Bioscience 6:1128-1150.
- Hounsome, J.D.A., Baillie, S., Noofeli, M., Alan Riboldi-Tunncliffe, A., Burchmore, R.J.S, Isaacs N.W. and Davies, R.L. (2011). Outer membrane protein A of bovine and ovine isolates of *Mannheimia haemolytica* is surface exposed and contains host species-specific epitopes. Infect. Immun. 79(11): 4332-41.
- Ito, T., Suzuki, Y., Mitnaul, L., Vines, A., Kida, H., Kawaoka, Y. (1997). Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. Virology. Jan 20;227(2):493-9.

- Jaramillo L., Díaz O.F., Hernández P., Debray H., Trigo F., Mendoza G., Zenteno G., (2000), Purification and Characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiology*. 10:31-41.
- Jaramillo L., Zenteno, E., Trigo F., (1999). Mecanismos de patogenicidad y Adherencia de *Pasteurella Haemolytica*. *Rev. Lat-Amer. Microbiol* 41:105-116.
- Jaramillo-Arango, C.; Trigo-Tavera,F.J., Suárez-Güemes.,(2009). Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *Rev. Vet. Méx.*, 2009, 40 (3):293-314. ISSN 0301-5092.
- Katsuda,K., Kamiyama, M., Kohmoto, M, Kawas Hima, K, Tsunemitsu, H., Eguchi, M. (2007). Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987-2006. *Vet J* 2007; 178:146-148.
- Lafleur, R.L., Abrahamsen, M.S., Maheswaran, S.K. (1998). The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*. 66:4087-4092.
- Lafleur, R.L., Malazdrewich,C., Jeyaseelan, S., Bleifield, E, Abrahamsen, M.S., Maheswaran, S.K. (2001) Lipopolysaccharide enhances cytolysis and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin. *Microb. Pathog*. 30:347-357.
- Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lekeu P. (1996). Bovine respiratory disease complex. *Ann Med Vet* 1996; 140: 101–105.
- Lo, R.Y. (2001). Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet Microbiol*; 83:23-35.
- Murphy, G.L., Robinson, L.C., Burrows, G.E. (1993). Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. *J Clin Microbiol*; 31:2303-2308.

Noffsinger, T., Locatelli, L., (2004). Low-stress cattle handling: An overlooked dimension of management.; Pages 65–78 in Proc. Meet. Academy of Veterinary Consultants. Vol. XXXII, No. 2.

Perino L J, Apley MD. (1998). Clinical trial design in feedlots. 1998; Pages 343–365 in Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. E. Hunt and G. L. Stokka, ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA. Vol. 14. No. 2.

Pijoan, P., Aguilar, R., Morales, A. (1999). Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California. Vet Méx; 30:149-155.

Paulsen, D., Mosier, D., Clinkenbeard, K., Confer, A. (1989). Direct effects of Rima B, Alexander DJ, Billeter MA et al. (1995). Family Paramyxoviridae. En: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL et al. (Eds). Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses Springer-Verlag. Viena Nueva York. pp. 265-274.

Pasteurella haemolytica lipopolysaccharide of bovine pulmonary endothelial cells in vitro. Am J Vet Res 1989; 50:1633-1637.

Rima B, Alexander DJ, Billeter MA et al. (1995). Family *Paramyxoviridae*. En: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL et al. (Eds). Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses Springer-Verlag. Viena Nueva York. pp. 265-274.

Rocha-De-Souza, C.M., Colombo, A.V., (2001). Identification of 43-KDa outer membrana protein as an adhesin in *Aeromonas caviae*. J.Med. Microbiol.-Vol. 50, 313-319.

Ruiz-Bustos, E., Ochoa, J.L., Wadström, T., Ascencio, F. (2001), Isolation and characterization of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. J.Med. Microbiol.-Vol. 50, 215-222.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [Página de inicio en internet] México, D.F., Coordinación General de

Ganadería; 2005 [actualizado en 2005; citado el 5 de julio de 2010].
Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/>

Shimoji, Y., Ng, V., Matsumura, K., Fishetti, V.A., Rambukkana, A., (1999), A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion, *Microbiology Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Vol. 96, pp. 9857–9862, August 1999 *Microbiology*.

Shina, S.K., Abinanti, F.R. (1962). Shipping fever of cattle. *Adv. Vet. Sci. Comp Med.* 7:225-271.

Snowder, L. D., Van Vleck, L. V., Cundiff, G. L., Bennett, M. Koohmaraie, M. E. Dikeman. (2007). Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Phenotypic, environmental, and genetic correlations with growth, carcass, and longissimus muscle palatability traits G. D. *J Anim Sci* 2007.85:1885-1892. doi: 10.2527/jas.2007-0008 originally published online May 15.

Trigo, F.J. (1987). El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Vet. Mex.* 4:1-36.

United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service Veterinary Services National Animal Health Monitoring System. Cattle and Calves Nonpredator Death Loss in the United States, 2010. USDA. December 2011.

USITC. The year in trade (2011). Operation of the trade Agreements Program. United States International Trade Commission. 63rd Report. July 2012. Pub 4336.

Valvatne H., Sommerfelt, H., Gaastra, W., Bhan, M.K, Grewal, H.M. (1996). Identification and characterization of CS20, a new putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* Jul; 64 (7): 2635-2642.

Vázquez, L., Masso, F., Montaña, L., Zenteno, E. (1993). Purification and Characterization of lectin from *Macrobachium rosenbergii*, *Comp. Biochem. Physiol.* 105B, 617-623.

- Wolinsky J.S., (1996). Mumps virus. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM *et al.* (Eds). Fields Virology. Tercera Ed. Lippincott-Raven Publishers. Filadelfia-Nieva York. pp.1243-1266.
- Yoo, H.S., Rajagopal, B.S., Maheswaran, S.K., Ames, T.R. (1995). Purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces expression of inflammatory cytokines from bovine alveolar macrophages. Microb Pathog, 18:237–52.
- Yu, F., Iyer, D., Anaya, C. Lewis, J. (2006). Identification and characterization of a cell surface protein of *Prevotella intermedia* 17 with broad-spectrum binding activity for extracellular matrix proteins Proteomics. 6, 6023–6032.
- Zecchinon L, Fett T, Desmecht D. (2005). How *Mannheimia haemolytica* defeats host defense through a kiss of death mechanism. Vet Res 2005; 36:133–156.