



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



**“CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DE *Actinobacillus seminis*”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

**ALDO HUGO DE LA CRUZ MONTOYA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL

**SINODALES:**

DR. SERGIO VACA PACHECO

DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

DR. ERIC MONROY PÉREZ

BIOL. ALINA URIBE GARCÍA

Tlalnepantla, Estado de México, 2015.



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.

**Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México con apoyo del PAPIIT IN222313 y PAPCA-FESI, UNAM.**

" ... y lo asustó la sospecha tardía de que es la vida, más que la muerte, la que no tiene límites."

G.G.M. 1985

## DEDICATORIA

A mis padres Adriana Montoya y Hugo De La Cruz, por darme la vida y enseñarme a vivirla. A mi hermano Diego De La Cruz por existir. Este logro es tan mío como suyo, los amo.

A María Elena Mercado Corona por su casa, por la familia, por el arroz con leche, por las inyecciones tan sutiles, por las pláticas tan certeras, por el humor negro, por la sonrisa imborrable, por la infancia, por los cumplidos, por Mami... por el amor, porque no hay un solo día que no te piense, hasta allá para ti.

A Armando Montoya Mercado y a Armando "Tati" Montoya Rivera, por los recuerdos. Se fueron muy pronto, pero los recuerdos se quedan para siempre.

A Leonardo AKA "Chilteño", si a alguien le debo mis logros académicos, es a ti.

A ti, Cecilia Moreno por tu paciencia, apoyo y amor incondicional. Por enseñarme que el mundo es para correrlo, Te amo.

A mis abuelos Olga Moreno y José Manuel De La Cruz, los recuerdo con mucho amor. A mis tías Rosa Idalia y Patricia De La Cruz por su apoyo y amor en todas sus formas. A mi tío José Manuel De La Cruz, a mi Psicóloga/Prima/Hermana de cabecera Liliana De La Cruz y a Alonsito, a mi primita Nabila y a mi primo "Chema" De La Cruz, gracias por formar parte de mi familia.

A mi tía Alma Montoya y al Ingeniero Luis Rodríguez por hacer tan grata y perfecta mi infancia como mi juventud, a mis primos Lucho Rodríguez por Metallica, por el fútbol y por mi Pikiturris preciosa, y a Rodrigo Montoya "El Poste" por la música y por el rocanrol.

A mi tía Anna Montoya y a Daniel Lamas por tanto pozole vegetariano y a mi primo Daniel "Pato" Lamas. A mi Primich Paulina Lamas por enseñarme que el cielo es el límite y que somos infinitos.

A mi prima Adrianita Montoya, te quiero mucho. A mi tío Alfredo Montoya por la ayuda en los proyectos de secundaria de última hora, a mi tío Alejandro "Chente" Montoya por las idas a Chapul, a mi tío Arturo Montoya "El Fintas" por ser una de las mejores personas que conozco en la vida, me llevaría varias cuartillas enlistar el porqué.

A mis primos Alfredo, Oscar, Arturo y Elena Montoya. A mi tío Alfonso Montoya y a Pily, por los Beatles, los chistes, los conciertos y por los refrescos.

A mis amigos de la vida Ramón Santos, Alejandro Fortolís, Khristian Barrios, Daniel González y Benjamín Reyes, por la música. A mi hermana de diferente madre, Karlita Partida, por tanto.

## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Erasmo Negrete Abascal por la dirección en la realización de este proyecto, por su apoyo, tiempo y enseñanzas, le agradezco infinitamente.

Al Doctor Sergio Vaca Pacheco, por el apoyo a lo largo de la carrera, las pláticas y los consejos.

A la Maestra Alina Uribe García, por ser la mejor maestra de Genética, conducirme al mejor laboratorio, por ser mi revisora y por tantos buenos consejos.

A la Doctora Gloria Luz Paniagua Contreras y al Doctor Eric Monroy Pérez por su tiempo y conocimientos para la revisión y corrección de este trabajo.

Al Biólogo Frank Jiménez por siempre brindarme su apoyo y amistad. Al Biólogo Fernando Montes por ser colega en el laboratorio. A mis compañeros Biólogos de Genética: Miguel, Brenda, Carlos, Karina, e Ismael que me abrieron las puertas del Laboratorio, a Toño y a Abraham.

A mis compañeros del 52. A Héctor, Karen, Marilú, Raúl, Nuria, Fernando, Karina, Gustavo, Erik y Javi, por todos los buenos momentos.

A mis amigos y compañeros del Colegio Cristóbal Colón por tantos años. A todos los profesores que me formaron durante los 12 años que estudié allí, en especial al Profesor Porfirio Javier Tamayo, quien me sembró el interés por la carrera.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de formarme dentro de sus instalaciones.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	8
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>2.1</b> Descripción del microorganismo .....	9
<b>2.2</b> Factores de virulencia.....	10
<b>2.3</b> Proteasas.....	11
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	13
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	15
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	16
<b>6.1</b> Cultivo.....	16
<b>6.2</b> Precipitación y obtención de proteínas.....	16
<b>6.3</b> Actividad proteolítica.....	17
<b>6.4</b> pH óptimo.....	17
<b>6.5</b> Inhibidores.....	18
<b>6.6</b> Temperatura.....	18
<b>6.7</b> Western Blot.....	19
<b>6.8</b> Degradación de otros sustratos.....	19

<b>7. RESULTADOS</b> .....	20
<b>7.1</b> Pureza de cultivos.....	20
<b>7.2</b> Obtención de proteínas secretadas y actividad proteolítica.....	20
<b>7.3</b> Efecto del pH.....	21
<b>7.4</b> Efecto de la temperatura.....	22
<b>7.5</b> Efecto con inhibidores.....	22
<b>7.6</b> Degradación de otros sustratos.....	24
<b>7.7</b> Western Blot.....	25
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	26
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	29
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	29
<b>11. LITERATURA CITADA</b> .....	30

## RESUMEN

*Actinobacillus seminis* es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*, la cual es considerada parte de la micro-biota del tracto digestivo de los ovinos, aunque también causa infecciones en órganos genitales de los carneros, con una predilección por el epidídimo. Las enfermedades causadas por este microorganismo constituyen un factor importante en la tasa de infertilidad y esterilidad produciendo pérdidas económicas para la industria ovina. Existe poco conocimiento de los factores de virulencia expresados por *A. seminis*, así como de factores específicos que predisponen a los carneros a estas enfermedades. La participación de proteasas secretadas, producidas por diferentes bacterias patógenas que colonizan superficies mucosas, y que participan durante un proceso infeccioso, ha sido demostrada previamente. Estas proteasas extracelulares pueden romper componentes tisulares y moléculas importantes de la respuesta inmune, haciendo más fácil la invasión y colonización del hospedero.

En este trabajo se describe la caracterización de una metaloproteasa secretada por *A. seminis*, la cual es capaz de degradar IgG y fibrinógeno de bovino. Esta proteasa tuvo actividad óptima en el rango de pH de 6-7 y fue inhibida por EDTA a una concentración de 30mM. La actividad proteolítica fue estable hasta 50°C, pero es inhibida a temperaturas más altas. Proteasas secretadas que degradan moléculas involucradas en la respuesta inmune y en la fisiología normal del hospedero, podrían ser importantes en la patogénesis de *A. seminis*.

## INTRODUCCIÓN

### DESCRIPCIÓN DEL MICROORGANISMO

*Actinobacillus seminis* es una bacteria Gram-negativa, pleomórfica, no móvil, no esporulada, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*. Es anaerobia facultativa y crece de manera óptima en una atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub>, a una temperatura de 37°C, en un medio enriquecido con sangre o suero, produciendo colonias pequeñas de color gris tenue después de 24 horas de crecimiento, en agar sangre. Después de 48 horas de incubación, presenta colonias blancas y largas (de 1 a 2 mm de diámetro) y después de 72 horas, la forma de las colonias se vuelve irregular (Swanepoel 1984; Burgess GW. 1992 y Koneman W. 1999).

*A. seminis* no crece en agar MacConkey y no es muy activa bioquímicamente, no fermenta azúcares, produce ácido pero no gas a partir de glucosa, no hidroliza urea y es oxidasa positiva (Baynes and Simmons 1960; Van Tonder 1979; Scanlan et al. 1989). *A. seminis* es sensible a la penicilina, estreptomycin, cloranfenicol, aureomicina, tetraciclinas, eritromicina, sulfonamidas y novobiocina pero resistente a la bacitracina y parcialmente resistente a la neomicina (Baynes and Simmons 1960; Erasmus et al. 1982).

*A. seminis* es considerada parte de la micro-biota del tracto digestivo de los ovinos, aunque también causa infecciones en diferentes órganos genitales de los carneros, con una predilección por el epidídimo. Entre los agentes responsables de esta enfermedad, además de *A. seminis*, se encuentran bacterias como *Brucella ovis*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni* (Genetzky R. 1995). Esta enfermedad representa un factor importante en la tasa de infertilidad y esterilidad produciendo pérdidas económicas en la industria ovina (Foster et al, 1999).

Por lo general, la ruta de entrada de estos microorganismos es una herida en la mucosa genital, aunque para *A. seminis* esta ruta no ha sido investigada adecuadamente (Núñez del Arco et al., 2006).

Los miembros de la familia *Pasteurellaceae* se caracterizan por formar parte de la microbiota normal de los organismos que infectan, sin embargo dependiendo del estilo de vida del hospedero, estas bacterias llegan a producir daños, convirtiéndose en bacterias patógenas. Las enfermedades crónicas son una fuente potencial de alteración de la flora normal, la diferencia entre patógenos y comensales radica en el papel que juegan los factores de virulencia presentes en estos organismos (Di Bonaventura *et al.*, 2010; Kuhnert *et al.*, 2006; Miller y Wolfe, 2011; Naushad y Gupta, 2011).

## FACTORES DE VIRULENCIA

El conocimiento de los factores específicos que predisponen a los carneros a estas enfermedades y los factores de virulencia expresados por *A. seminis* son escasos. El papel de proteasas secretadas en un proceso infeccioso ha sido demostrado en diferentes bacterias patógenas que colonizan superficies mucosas (Rivero *et al.*, 2005); las proteasas extracelulares pueden romper componentes de los tejidos y moléculas importantes en la respuesta inmune, haciendo más fácil la invasión y colonización del hospedero. En cuanto al conocimiento de los posibles factores de virulencia presentes en *A. seminis*, es escaso. Se ha identificado una proteína inmunogénica secretada por *A. seminis* asociada a microvesículas (Foster *et al.*, 1999) y se ha sugerido la expresión de una probable toxina de tipo RTX, sin embargo no ha sido caracterizada (Schaller *et al.*, 2000).

En 2006, Núñez del Arco y colaboradores identificaron una proteína con un peso molecular de 75 kD, inmunogénica y aparentemente específica para *A. seminis*, presente en microvesículas.

Existen diferentes factores que están involucrados en una enfermedad infecciosa bacteriana, algunos de estos incluyen la habilidad del microorganismo para adherirse a membranas mucosas y colonizar al hospedero (Byarugaba *et al.*, 2007).

Las proteasas son enzimas cuya función es catalizar la hidrólisis de proteínas o péptidos. Distintas proteasas se han encontrado en diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*, entre ellas algunas metaloproteasas extracelulares, las cuales se ha demostrado que juegan un papel importante en la virulencia de estas bacterias, como por ejemplo en *Pasteurella multocida* (Negrete *et al.*, 1999), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Negrete *et al.*, 1998), *Gallibacterium anatis* (García *et al.*, 2005) y *Avibacterium paragallinarum* (Rivero *et al.*, 2005). Algunas metaloproteasas son capaces de degradar IgA e IgG de pollo (Rivero *et al.*, 2005), por lo que esta actividad podría estar involucrada en los mecanismos de patogenicidad de estas bacterias.

## PROTEASAS

Las proteasas son una clase única de enzimas, debido a que su importancia va de lo fisiológico hasta lo comercial. Éstas poseen propiedades tanto de síntesis como de degradación y las podemos encontrar en animales, plantas y microorganismos; en estos últimos, está representada la mayor fuente de enzimas ya que estos tienen un crecimiento rápido y se requiere poco espacio para mantenerlos. Las proteasas de muchos microorganismos han sido utilizadas extensamente desde tiempos muy antiguos, pero existe un interés renovado en ellas para desarrollar agentes terapéuticos con el fin de contrarrestar diferentes enfermedades (Rao *et al.*, 1998).

Las proteasas se dividen en cuatro grupos principales de acuerdo a su mecanismo de acción:

- Serín proteasas
- Aspártico proteasas
- Cisteín proteasas
- Metaloproteasas

### Serín Proteasas

Estas proteasas se caracterizan por la presencia de una serina en su sitio activo y comprenden a la familia de las Quimiotripsinas, dentro de las cuales se encuentran enzimas como la quimiotripsina, tripsina y elastina. También comprende a otras enzimas como la subtilisina, una proteasa bacteriana (Rao *et al.*, 1998).

### Aspártico proteasas

Son las que dependen de residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica e incluyen a enzimas como la pepsina, proteasas presentes en hongos, como la penicilopepsina y proteasas presentes en virus como el VIH (Rao *et al.*, 1998).

### Cisteín proteasas

Estas proteasas están presentes tanto en procariontes como en eucariontes y la actividad de todas ellas depende de un elemento catalítico divalente, formado por la unión de una cisteína con una histidina. En este grupo encontramos proteasas presentes en parásitos como *Schistosoma* y *Trypanosoma* (Juárez, 2006) y otras presentes en plantas, como la papaína y la bromelina (Rao *et al.*, 1998).

### Metaloproteasas

Son el grupo más diverso de proteasas catalíticas, son encontradas en bacterias y hongos y se caracterizan por requerir de un ión metálico divalente para su actividad (Rao *et al.*, 1998).

## ANTECEDENTES

Las primeras proteasas de origen bacteriano para IgA fueron descubiertas accidentalmente por Mehta y colaboradores en 1973, durante un estudio de anticuerpos fecales en pacientes de cirrosis hepática. Estas proteasas expresadas por microorganismos patógenos, actúan como factores tóxicos dentro de los mecanismos de patogenicidad, ya que hidrolizan e inactivan las IgA1 presentes en la mucosa, facilitando la adherencia bacteriana y la colonización del hospedero (Rivero *et al.*, 2005).

Poulsen y colaboradores en 1989, reportaron como factor de virulencia para *Haemophilus influenzae* proteasas secretadas que son capaces de degradar IgA1. Determinaron la presencia de un gen que codifica para la proteasa IgA1, y cuando el gen fue expresado en *Escherichia coli* dio como resultado la secreción del mismo tipo de proteasa que en *H. influenzae*.

En cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de infecciones genitales y pulmonares en humanos, se demostró que producen enzimas extracelulares que hidrolizan inmunoglobulinas (IgA1, IgA2 e IgG) de humano (Pouedras *et al.*, 1992), por lo que se sugiere que éstas podrían ayudar a evadir la respuesta inmune del hospedero.

En 1998, Negrete-Abascal y colaboradores, caracterizaron y purificaron una metaloproteasa de alto peso molecular (>200kD), a partir de un sobrenadante de cultivo de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, el agente causal de la pleuroneumonía porcina, enfermedad respiratoria que causa grandes pérdidas económicas. Esta proteasa puede degradar IgA, IgG y hemoglobina de cerdo y es expresada por todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* (Negrete-Abascal *et al.*, 1994). Recientemente también se demostró que puede degradar fibrinógeno, lo cual podría estar relacionado con la inducción de neumonía fibrino-hemorrágica (López -Ruiz *et al.*, 2013).

Se reportó que *Actinobacillus pleuropneumoniae* secreta proteasas *in vitro* que degradan IgA y hemoglobina porcina. Experimentalmente se identificó un péptido de 24kDa que fue reconocido como un antígeno al utilizar suero de un cerdo en fase convaleciente de pleuroneumonía.

La proteasa identificada también degrada gelatina y actina, esta actividad proteolítica fue inhibida por dietilpírocarbonato, por lo que se sugiere que se trata de una metaloproteasa de zinc (García-Cuellar *et al.*, 2000).

Schaller y colaboradores en el 2000, realizaron un inmunoreconocimiento, utilizando anticuerpos policlonales monoespecíficos de ratón dirigidos contra Apx<sub>7</sub>, encontrando reconocimiento de una proteína menor a 100 kDa en las muestras de *A. seminis*. Se sugiere que la presencia de toxinas RTX o de proteínas que tienen reacción cruzada con toxinas de este tipo, en cerdos infectados con *Actinobacillus* a parte de *A. pleuropneumoniae*, podrían interferir con el serodiagnóstico de pleuroneumonía porcina.

Rivero-García y colaboradores demostraron en 2005, que *Haemophilus paragallinarum*, el agente causal de la coriza infecciosa, enfermedad que afecta el tracto superior de pollos, gallinas, faisanes y gallinas de guinea, y que produce altas pérdidas económicas en la industria avícola, es capaz de secretar metaloproteasas en diferentes medios de cultivo sin suero. Estas proteasas mostraron actividad proteolítica >100 kDa sobre gelatina porcina, fueron inhibidas por EDTA y reactivadas por calcio, por lo que se determinó que se trataba de metaloproteasas. Las proteínas secretadas fueron capaces de degradar parcialmente IgG de pollo y tuvieron reacción cruzada con un antisuero policlonal contra una proteasa purificada de *A. pleuropneumoniae*, por lo que podrían jugar un papel en la infección causada por este microorganismo.

En 2005 García-Gómez *et al* reportaron que metaloproteasas secretadas por *Gallibacterium anatis*, con un peso de aproximadamente 100 kDa, tienen actividad proteolítica sobre caseína, son activas a un pH alcalino e inhibidas con EDTA. Son capaces de degradar IgG de pollo y tuvieron una reacción cruzada con un anticuerpo policlonal contra una proteasa purificada de *A. pleuropneumoniae*, lo que sugiere la existencia de epítomos comunes en estas bacterias.

Para el caso de *A. seminis*, los mecanismos de patogenicidad y los factores de virulencia, son escasos; y en particular la expresión y participación de proteasas secretadas, son desconocidas.

## JUSTIFICACIÓN

La epididimitis representa un factor importante en la tasa de infertilidad y esterilidad produciendo pérdidas económicas en la industria ovina (Foster *et al*, 1999), por lo que es necesario conocer los factores de virulencia expresados por esta bacteria, ampliando el panorama de los mecanismos que participan en la patogénesis para poder combatir y/o controlar esta enfermedad.

## OBJETIVO GENERAL

- Identificar y caracterizar una posible proteasa secretada por *A. seminis*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Demostrar la producción de proteasas secretadas por *A. seminis*.
- Determinar el pH óptimo de actividad de dichas proteasas.
- Determinar la temperatura óptima de actividad de las enzimas obtenidas.
- Identificar el tipo de proteasa mediante el uso de inhibidores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo

Un cultivo de toda la noche de *A. seminis* se sembró en una placa de agar BHI para corroborar su pureza, y se utilizó para inocular (1%) medio BHI adicionado con  $\text{CaCl}_2$  10mM, el cual se mantuvo a 40°C en agitación durante 48 hrs.

### Precipitación y obtención de proteínas

El cultivo se centrifugó a 11,500 rpm durante 30 minutos a 4°C y las proteínas del sobrenadante libre de células fueron precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 70% a 4°C, toda la noche (Rivero-García *et al.*, 2005). Las proteínas precipitadas se recuperaron en las mismas condiciones, el sobrenadante se descartó, las pastillas fueron resuspendidas en un volumen mínimo de PBS 1X y almacenadas en congelación. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford.

## Actividad Proteolítica

Para demostrar la producción de proteasas secretadas y su actividad proteolítica, la muestra previamente obtenida fue separada por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) co-polimerizado (zimograma) con gelatina porcina o caseína al 0.1 y al 1% respectivamente, como ha sido reportado anteriormente para diversos miembros de la familia (Negrete *et al.*, 1998; 2004, García *et al.*, 2005). Se cargaron 20 $\mu$ l de la muestra mezclada con buffer de muestra al 5%. Las muestras no fueron hervidas ni tratadas con  $\beta$ -mercaptoetanol. El gel se incubó con Tritón X-100 al 2.5% y posteriormente con buffer de activación (Tris 20mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM) durante dos horas a 37°C y después se tiñó con azul de Coomassie. El exceso de colorante fue eliminado con una solución de ácido acético al 10% (Negrete-Abascal *et al.*, 1999).

## pH Óptimo

Para la determinación del rango de pH en el cual la actividad proteolítica es óptima, la muestra de proteínas que presentaron actividad proteolítica fue separada electroforéticamente (SDS-PAGE), los geles co-polimerizados con caseína fueron incubados con Tritón X-100 al 2.5%, después se cortaron y se incubaron con diferentes amortiguadores a diferentes pH:

- Buffer de acetatos 50 mM – pH: 4, 5 y 6.
- Buffer TRIS 50 mM – pH: 7-8.
- Buffer Glicina-NaOH 50 mM – pH: 9 y 10.
- 

(Negrete-Abascal *et al.*, 1999).

## **Inhibidores**

Para conocer qué tipos de proteasas son secretadas por *A. seminis* se incubaron muestras de la proteína a temperatura ambiente durante media hora, en presencia de los siguientes agentes inhibidores, previo a la separación electroforética:

- p-Hidroximercuribenzoato (pHMB) 10mM.
- Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMFS) 5mM.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 20mM.

Se les agregó buffer de muestra al 5% y fueron separadas electroforéticamente, para después incubarlas en Tritón X-100 al 2.5% a 37°C durante una hora y posteriormente en buffer con el pH óptimo de actividad, más cada uno de los agentes inhibidores a 37°C durante dos horas, sin calcio (Negrete-Abascal *et al.*, 1999).

## **Temperatura**

Para determinar la estabilidad térmica de la proteasa, las muestras se incubaron a las siguientes temperaturas durante 10 minutos:

- 4°C
- Temperatura ambiente (control)
- 37°C
- 40°C
- 50°C
- 60°C
- 70°C

Después se les agregó buffer de muestra al 5% y se evaluó la actividad proteolítica por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida con sustrato. Por último, los geles fueron incubados con el buffer de pH óptimo de actividad a 37°C, fueron teñidos y el exceso de colorante fue eliminado (Negrete-Abascal *et al.*, 1999).

## Western Blot

Para determinar la existencia de reactividad cruzada de las proteínas de *A. seminis* contra el anticuerpo policlonal de una proteasa purificada de *A. pleuropneumoniae*, éstas fueron separadas electroforéticamente para después ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante una hora a 300 MA. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% durante dos horas en agitación. Posteriormente la membrana fue lavada con PBS-Tween al 0.1% por 10 minutos, tres veces. Después fue incubada con el anticuerpo primario (antiproteasa de *A. pleuropneumoniae* 1:1000) diluido en PBS-Tween. Se lavó la membrana de la misma manera tres veces. Se incubó en el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa 1:1000). Se lavó de la misma manera tres veces. Para observar la reacción, se agregó una mezcla de diaminobenzidina, ácido fórmico y peróxido de hidrógeno (Negrete-Abascal *et al.*, 1998 y 1999).

## Degradación de otros sustratos

Para determinar el efecto sobre sustratos que participan en mecanismos inmunes tales como IgG o fibrinógeno, una muestra de *A. seminis* (20µg) con actividad proteolítica, fue incubada durante 24 horas a 37°C con 20µg de inmunoglobulina G o 20µg de fibrinógeno de bovino, respectivamente. Una muestra de sustrato a la cual no se le agregaron proteínas de *A. seminis*, fue utilizada como control negativo en cada ensayo, para descartar una degradación inespecífica. Los productos de degradación fueron separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 8%, los geles se tiñeron y el colorante en exceso fue eliminado, como se indicó previamente (Negrete-Abascal E. *et al.*, 1999).

## RESULTADOS

### Pureza de los cultivos

Esta pureza se confirmó al observarse el crecimiento de colonias grisáceas, puras y uniformes, en agar sangre (Fig. 1).



Figura 1. Prueba de pureza de los cultivos de *A. seminis*, al observar crecimiento uniforme y grisáceo en placa de agar sangre, después de 24 hrs de incubación a 37° C.

### Obtención de proteínas secretadas y actividad proteolítica

El patrón de proteínas secretadas por *A. seminis* nos permite observar proteínas en el rango de 200 a 20 kDa, entre las cuales se podría encontrar la(s) posible(s) proteasa(s) secretadas por *A. seminis* y que mediante ensayos previos se determinó que podrían ser ubicadas con un peso entre los 75 y 100 kDa (Fig. 2).

Las proteínas obtenidas de los sobrenadantes libres de células de los cultivos de *A. seminis*, presentaron actividad proteolítica entre los 75 y los 100 kDa, en zimogramas preparados con gelatina porcina, dicha actividad aumentó proporcionalmente con la cantidad de muestra cargada (5, 10, 20 y 30  $\mu\text{g}$ ) (Fig. 3).

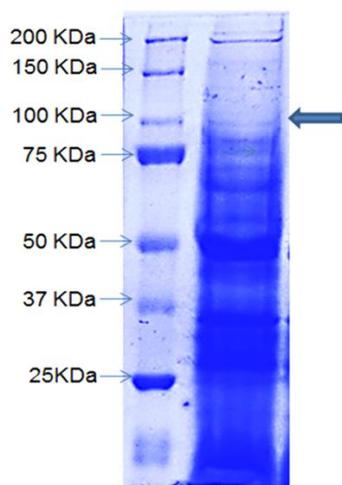


Figura 2. SDS-PAGE al 8%, donde se muestra el patrón de proteínas secretadas por *A. seminis*. La flecha señala la posición donde se podría ubicar la posible proteasa secretada por *A. seminis*.

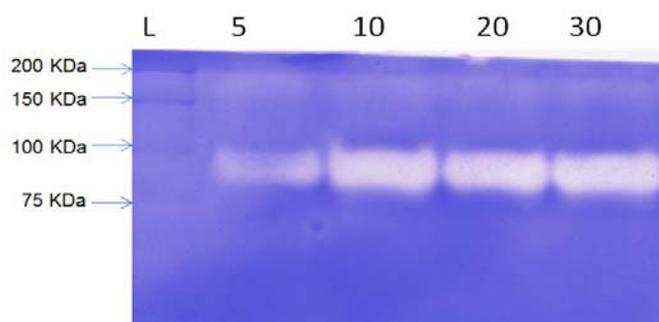


Figura 3. Zimograma con gelatina porcina que muestra la actividad proteolítica secretada por *A. seminis* usando diferentes cantidades de muestra (5, 10, 20 y 30  $\mu\text{g}$ ). L indica el marcador de peso molecular.

## Efecto del pH

La actividad proteolítica secretada por *A. seminis* puede degradar el sustrato con mayor facilidad en un rango de pH de 6-7 (Fig. 4). A pH 8, la actividad proteolítica disminuye aproximadamente un 50%. La incubación de muestras a pH por debajo de 4 o arriba de 8, disminuye considerablemente la actividad de la proteasa, siendo en algunos casos, nula; por lo que se puede concluir que se trata de una proteasa neutra. Se muestra un control sin tratar.

Control    4        5        6        7        8        9        10



Figura 4. Zimograma con gelatina porcina en el que se muestra el efecto del pH (4 a 10) en la actividad proteolítica secretada por *A. seminis*.

### Efecto de la temperatura

Muestras de proteínas secretadas por *A. seminis* presentan actividad proteolítica en un amplio rango de temperatura que va de los 4°C hasta los 60°C, inhibiéndose por completo al llegar a los 70 °C. Se muestra el control a temperatura ambiente (Fig. 5).

Control    4° C        37° C        40° C        50° C        60° C        70° C



Figura 5. Zimograma con gelatina porcina en el que se muestra el efecto de la temperatura (4 a 70) en la actividad proteolítica secretada por *A. seminis*.

### Efecto con inhibidores.

La actividad proteolítica producida y secretada por *A. seminis*, no fue inhibida por p-Hidroximercuribenzoato (pHMB) 10mM ni por fenilmetilsulfonilfluoruro (PMFS) 5mM (Fig. 6a), pero sí por ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Se observó una disminución considerable de la actividad en presencia de EDTA 10 mM; a una concentración de 20 mM la actividad es muy tenue y una completa inhibición de esta actividad, a una concentración de EDTA 30 mM o mayor (Fig. 6b); concluyendo con esto que se trata de una metaloproteasa neutra.

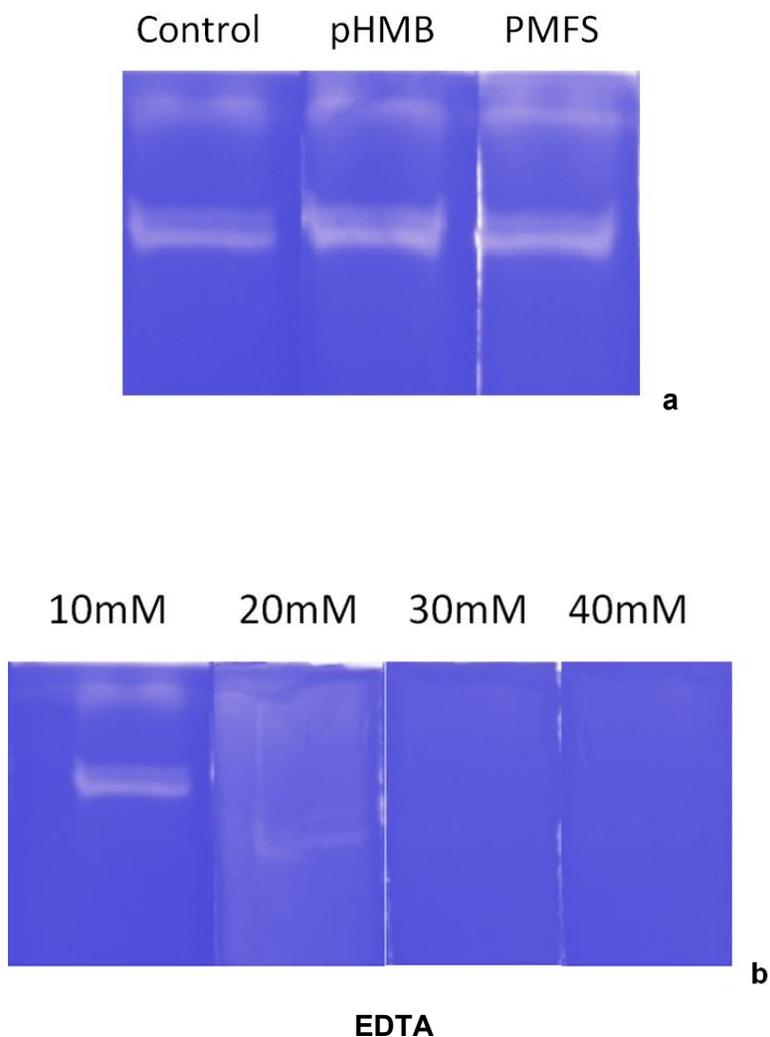


Figura 6. Zimograma con gelatina porcina en el que se muestra el efecto de diversos inhibidores de la actividad proteolítica de la proteasa secretada por *A. seminis*. La inhibición de dicha actividad se logra con 30 mM de EDTA (b). Los carriles con los inhibidores pHMB y PMFS no muestran ningún efecto sobre la actividad proteolítica (a).

## Degradación de otros sustratos

La actividad proteolítica de las proteasas secretadas por *A. seminis* es capaz de degradar fibrinógeno bovino (Fig. 7, carril 2) así como IgG de bovino (Fig. 8, carril 2), mientras que las muestras de fibrinógeno (Fig. 7, carril 1) y de IgG (Fig. 8, carril 1) incubadas en ausencia de proteínas secretadas de *A. seminis*, permanecen intactas.

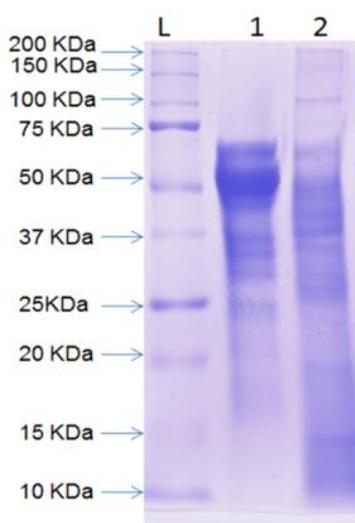


Figura 7. SDS-PAGE al 8% que muestra la degradación de fibrinógeno bovino por el extracto crudo de *A. seminis* después de una incubación de 24 horas a 37°C (Carril 2). L: Marcador de peso molecular. Carril 1: Control de fibrinógeno sin extracto crudo de *A. seminis*.

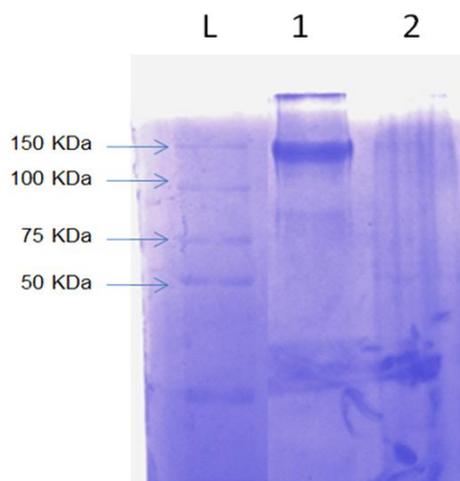


Figura 8. SDS-PAGE al 10% en el que se observa la degradación de IgG de bovino. L: Marcador de peso molecular. Carril 1: IgG de Bovino. Carril 2: IG de bovino mezclado con *A. seminis* después de 24 horas de incubación a 37°C.

## Western Blot

Al utilizar un antisuero policlonal dirigido contra la proteasa de *A. pleuropneumoniae*, se observó un reconocimiento inmune en forma de un barrido que va de aproximadamente 150 kDa hasta más de 250 kDa (Fig. 9b). Las bandas de reconocimiento corresponden con las bandas de actividad observadas en el zimograma (Fig. 9a).

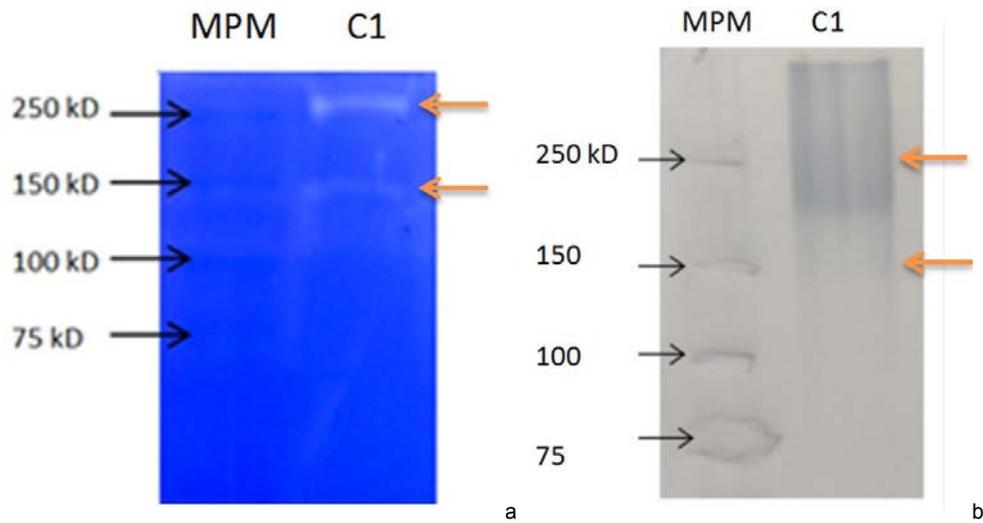


Figura 9. Zimograma (a) e inmunoreconocimiento (b) de una proteína de alto peso secretada por *A. seminis*. El inmunoreconocimiento se observó al utilizar un antisuero contra una proteasa purificada de *A. pleuropneumoniae*. MPM: Marcador de peso molecular, C1: Carril 1. LA flechas naranjas indican las bandas de actividad proteolítica (a) y de reconocimiento (b).

## DISCUSIÓN

Las bacterias, durante su crecimiento, son capaces de liberar productos extracelulares, dentro de los cuales se pueden encontrar las enzimas (proteasas), éstas pueden tener importancia en la patogénesis del microorganismo. A pesar de que las proteasas llevan a cabo diversas funciones fisiológicas y homeostáticas en la mayoría de los organismos, las producidas por algunas bacterias patógenas están involucradas en la virulencia, promoviendo así la invasión y colonización del hospedero (Otulakowski *et al.*, 1983, Miyoshi y Shinoda, 2000).

Al igual que otras proteasas reportadas con anterioridad que infectan mucosas, tales como: *Pasteurella multocida* (Negrete *et al.*, 1998), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Negrete *et al.*, 2004), *Gallibacterium anatis* (García *et al.*, 2005) y *Avibacterium paragallinarum* (Rivero *et al.*, 2005), las proteínas obtenidas a partir de los sobrenadantes libres de células de *A. seminis*, tuvieron actividad proteolítica sobre glicoproteínas (Fig. 3).

El peso molecular de las proteasas de *A. seminis* obtenidas fue variable (Fig. 3 y 9a), esto es posible que se deba al procesamiento de las muestras, ya que como ha sido previamente reportado en otras bacterias, estas proteasas son capaces de asociarse y disociarse formando agregados de diferentes pesos moleculares. Han sido reportadas en pesos bajos desde 35 kDa (Abdullah *et al.*, 1999), 65 kDa (Tabatabai *et al.*, 1995) así como en pesos arriba de los 200 kDa (Núñez del Arco *et al.*, 2006).

Se utilizaron distintos agentes inhibidores para conocer la naturaleza de las proteasas secretadas por *A. seminis*. Las muestras se incubaron en pHMB, PMFS y EDTA, y solo las muestras con el último agente presentaron una inhibición de la actividad proteolítica a una concentración 20 mM o mayor (Fig. 6b). De esta manera se determinó que se trata de una metaloproteasa, ya que el EDTA funge como un quelante, el cual secuestra iones metálicos, y este tipo de proteasas se caracterizan por requerir de un ion metálico divalente para su actividad (Rao *et al.*, 1998). Varias metaloproteasas ya han sido reportadas para miembros de la familia *Pasteurellaceae* como en: *M. haemolytica* (Abdullah *et al.*, 1991), *A. pleuropneumoniae* (Negrete-Abascal *et al.*, 1998), *P. multocida* (Negrete-Abascal *et al.*, 1999) y *G. anatis* (García Gómez *et al.*, 2005) entre otras.

La actividad proteolítica permaneció estable después de que las muestras fueran incubadas a 4, 37, 40 y 50° C, pero comenzó a disminuir a partir de los 60° C hasta inhibirse por completo a los 70° C (Fig. 5). Un comportamiento similar fue descrito en proteasas secretadas por *A. pleuropneumoniae* (Negrete-Abascal *et al.*, 1998) y en *A. paragallinarum* (Rivero-García *et al.*, 2005). Estas enzimas son capaces de resistir la temperatura de los organismos que infecta la bacteria, la cual es alrededor de los 39° C, e incluso un aumento considerable en ésta, en el caso de una infección. En un estudio del gen que codifica para una proteasa secretada por *A. pleuropneumoniae*, fueron encontrados dos sitios tras-membranales putativos, los cuales indican un posible anclaje de la proteasa a la membrana de la bacteria. Es posible que esto permita una asociación proteasa-lipopolisacárido y explica la resistencia al calor de dicha proteasa (García-González *et al.*, 2004). Un fenómeno similar podría estar ocurriendo con las proteasas secretadas por *A. seminis*.

La actividad proteolítica fue observada en un rango amplio de pH (5-8), siendo óptimo en los valores de 6 a 7 (Fig. 4). Dicha amplitud en el rango de pH es similar a la reportada anteriormente para *A. pleuropneumoniae* y para *P. multocida* (Negrete-Abascal *et al.*, 1994 y 1999) así como para *A. paragallinarum* (Rivero-García *et al.*, 2005). Ha sido sugerido, que un rango tan amplio de pH, el microorganismo podría obtener ventajas para sobrevivir en condiciones ambientales adversas, convirtiéndose en un factor de virulencia que le ayudaría a evadir la respuesta inmune del hospedero.

Las proteínas secretadas degradaron IgG y fibrinógeno de bovino después de ser incubadas por 24 hrs a 37° C (Fig. 7 y 8). Una proteasa de *G. anatis* con capacidad de degradar IgG de pollo ya ha sido descrita (Rivero-García *et al.*, 2005). Este tipo de actividad proteolítica podría ser un factor de virulencia, permitiendo a patógenos que se adhieren a superficies mucosas, evadir la respuesta inmune y obtener nutrientes (Jansen *et al.*, 1995).

En cuanto al inmunoreconocimiento, las proteínas secretadas por *A. seminis* tuvieron una reactividad cruzada al utilizar un antisuero policlonal contra una proteasa purificada de *A. pleuropneumoniae* (Fig. 9b).

Estos resultados sugieren la presencia de proteínas con características similares expresadas por diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Esta conclusión es fortalecida por la homología observada en secuencias de nucleótidos y aminoácidos de metalloproteasas secretadas por *A. pleuropneumoniae*, *H. influenzae*, y *P. multocida*, previamente descritas (García-González *et al.*, 2004).

Debido a todas las características presentadas anteriormente, se determina que las proteínas secretadas por *A. seminis* podrían desempeñar un rol importante dentro de los mecanismos de patogenicidad y virulencia del microorganismo y participar en la evasión de la respuesta inmune, facilitando así la colonización de tejidos de hospedero.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se describe la caracterización de una metaloproteasa secretada por *A. seminis*, la cual es capaz de degradar IgG y fibrinógeno de bovino. Esta proteasa tuvo actividad óptima en el rango de pH de 6-7 y fue inhibida por EDTA a una concentración de 30mM. La actividad proteolítica fue estable hasta 50°C, pero es inhibida a temperaturas más altas. Es probable que esta proteasa esté involucrada en la patogenicidad de *A. seminis*

## PERSPECTIVAS

- Realizar la purificación de la proteína de interés.
- Elaborar un anticuerpo policlonal contra la proteína purificada.
- Determinar su participación en patogénesis a través de la generación de una mutante.

## LITERATURA CITADA

1. - Abdullah KM, Lo RYC and Mellors A. 1991. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease gene. J. Bacteriol. 173:5597-5603.
2. - Al-Katib WA, Dennis SM. 2009. Ovine genital actinobacillosis: a review. N Z Vet J. Dec 57:352-358.
3. - Baynes ID and Simmons GC. 1960. Ovine Epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*, N. SP. Aust Vet J. 36:454-459.
4. - Burgess GW. 1982. Ovine contagious epididymitis: a review. Anim Rev Vet Microbiol. 7:551-575. Aust Vet J. 36:454-459.
- 5.- Byarugaba DK, Minga UM, Gwakisa PS, Katunguka-Rwakishaya E, Bisgaard M, Olsen JE. 2007. Virulence characterization of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Uganda. Avian Pathol. 36:35-42.
6. - Di Bonaventura M, Lee E, DeSalle R, Planet P. 2012 A whole-genome phylogeny of the family *Pasteurellaceae*. Mol Phlogenet Evol. 54:950-956.
- 7.- Dubin G, Koziel J, Pyrc K, Wladyka B, Potempa J. 2013. Bacterial proteases in disease - role in intracellular survival, evasion of coagulation/ fibrinolysis innate defenses, toxicoses and viral infections. Curr Pharm Des. 19:1090-1113.
8. - Erasmus JA, De Wet JA, Prozesky L. 1982 *Actinobacillus seminis* infection in a Walrich ram. J S Afr Vet Assoc. 53:129.
9. - Foster G, Collins MD, Lawson PA, Buxton D, Murray FJ, Sime A. 1999. *Actinobacillus seminis* as a cause of abortion in a UK sheep flock. Vet Rec. 144:479-480.

10. – García-Cuellar C, Montañez C, Tenorio V, Reyes-Esparza J, Durán M, Negrete E, Guerrero A, De la Garza M. 2000. A 24-kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleaves actin in vitro. *Can J Vet Res.* 64:88-95.
- 11.- García-Gómez E, Vaca S, Pérez-Méndez A, Ibarra-Caballero J, Pérez-Márquez V, Tenorio VR, Negrete-Abascal E. 2005 *Gallibacterium anatis*-secreted metalloproteases degrade chicken IgG. *Avian Pathol.* 34:426-429.
12. – García-González O, García RM, de la Garza M, Vaca S, Paniagua, GL, Mejía R, Tenorio VR, y Negrete-Abascal E. 2004. *Actinobacillus pleuropneumoniae* metalloprotease: cloning and in vivo expression. *FEMS Microbiol Lett.* 234:81-86.
13. - Genetzky R. 1995. Epididymitis in rams. *Food Anim.* 17:447–454.
14. - Healey MC, Hwang HH, Elsner YY, Johnston AV. 1991. A model for demonstrating the adhesion of *Actinobacillus seminis* to epithelial cells. *Can J Vet Res.* 55:121-127.
15. – Jansen HJ, Grenier D, Van der Hoeven JS. 1995. Characterization of *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*. *Orla Microbiol.* 10:138-145.
16. - Juárez M. 2006. Caracterización de secuencias involucradas en la secreción de proteasas en *Pasteurella multocida*. Tesis de Maestría, Benemérita Universidad de Puebla.
17. - Koneman W. 1999 *Diagnóstico Microbiológico*. 5th ed., Buenos Aires, Argentina. Ed Panamericana. 394:395.
18. - López-Ruiz BA, Vaca S, de la Garza M, Reyes M and Negrete-Abascal E. 2013 *Actinobacillus pleuropneumoniae* secretes a metalloprotease that degrades porcine fibrinogen. *Afr J Microbiol Res.* 7: 2803-2807.

19. – Miller MW, Wolfe LL. 2001. *Pasteurellaceae* from Colorado Bihorn Sheep Herds. J Wildl Dis. 47:800-804.
20. - Miyoshi S. and Shinoda S. 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. Microbes Infect. 2:91-98.
21. – Naushad S, Gupta R. 2011. Molecular signatures (conserved indels) in protein sequences that are specific for the order *Pasteurellales* and distinguish two of its main clades. Springer. 101:105-124.
- 22.- Negrete-Abascal E, Tenorio VR, de la Garza M. 1999 Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. Curr Microbiol. 38:64-67.
23. - Negrete-Abascal E, Tenorio VR, Guerrero AL, García RM, Reyes ME, de la Garza M. 1998. Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. Can J Vet Res. 62:183-190.
- 24.- Negrete-Abascal E, Tenorio VR, Serrano JJ, Garcia C, de la Garza M. 1994 Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. Can J Vet Res. 58:83-86.
- 25.- Núñez-del Arco A, Salas-Télez E, de la Garza M, Díaz-Aparicio E, Tenorio-Gutiérrez V. 2006. Identification of an immunogenic protein of *Actinobacillus seminis* that is present in microvesicles. Can J Vet Res. 70: 43–49.
26. – Otulakowski GL, Shewen PE, Udoh AE, Mellors A, Wilkie BN. 1983. Proteolysis of sialoglycoprotein by *Pasteurella multocida* cytotoxic culture supernatant. Infect. Immun. 42:64-70.
27. - Potempa J, Pike RN. 2009. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. J Innate Immun 1:70-87.

29. – Pouedras P, Andre, PM, Donnio PY, Avril JL. 1992. Cleavage of immunoglobulin A1, A2 and G b proteases from clinical isolates of *Pasteurella multocida*. J Med Microbiol. 37:128-132.
28. – Puolsen K, Brandt J, Hjorth JP, Thogersen HC, Kilian M. 1989. Cloning and sequencing of the Immunoglobulin A1 protease gene (*iga*) of *Haemophilus influenzae* Serotype b. Infect immune. 57:3097-3105.
30. - Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev. 62:597-635.
- 31.- Rivero-García PC, Cruz CV, Alonso PS, Vaca S, Negrete-Abascal E. 2005 *Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases. Can J Microbiol. 51:893-896.
- 32.- Schaller A, Kuhnert P, de la Puente-Redondo VA, Nicolet J, Frey J. 2000. Apx toxins in *Pasteurellaceae* species from animals. Vet Microbiol. 74:365-376.
33. - Swanepoel ML. 1984. A study for the differentiation of *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Histophilus ovis* and *Pasteurella haemolytica*. Onderstepoort J of Vet Res. 51:41–46.
34. – Tabatabai LB. 1995. Fetuin is a substrate for *Pasteurella haemolytica* O-sialolycoprotease. Biochem Biophys Res Commun. 212:981-987.
35. - Van Tonder EM. 1979. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa. III. Growth and cultural characteristics of *A. seminis*. Onderstepoort J of Vet Res. 46:141–148.