



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Identificación y purificación de una hemaglutinina de
Actinobacillus seminis”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

WILLY ANGEL DELGADO TAPIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. SERGIO VACA PACHECO

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2017



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.

Agradecimientos

A mis padres, ustedes que me han apoyado, aconsejado y motivado, para seguir adelante y continuar superándome, seguir alcanzando mis metas y sin lugar a dudas a nunca rendirme, les doy las gracias, que sin ustedes el camino hubiera sido más difícil para lograr culminar unas de las etapas más gratificantes de mi vida, ya que sin sus consejos, amor y cariño no sería lo que soy ahora.

¡Gracias por todo!

A mi esposa e hijo, por ser mi inspiración de continuar y seguir superándome a cada momento, apoyarme, escucharme y motivarme a cada paso, y que a pesar de encontrarme en momentos difíciles recordar que mi mayor motivación son ustedes.

Al Doctor Sergio Vaca por sus consejos y apoyo a lo largo de mi estancia en el laboratorio

A la Maestra Alina Uribe por brindarme su confianza y amistad, así como su apoyo y consejos.

Al Doctor Erasmo Negrete por guiarme en mi proyecto, que por su apoyo y paciencia constante he logrado finalizar.

A Fernando Montes por ser un gran amigo y compañero de laboratorio, el cual me enseñó que el trabajo puede ser laborioso, pero a pesar de encontrar el camino difícil, nunca hay que dejar de lado nuestros objetivos hasta cumplirlos.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética de la UMF
de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

apoyado por:

DGAPA-UNAM PAPIIT IN215616

PAPCA FESI-UNAM-2016-3.

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	4
4. JUSTIFICACIÓN.....	5
5. OBJETIVOS.....	6
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
- Cepa bacteriana.....	7
- Condiciones de crecimiento bacteriano.....	7
- Obtención de fracciones proteicas.....	7
- Purificación de la hemaglutinina por intercambio iónico.....	8
- Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	8
- Obtención de anticuerpos contra la probable hemaglutinina de <i>A. seminis</i>	8
- Inmunoreconocimiento (Western Blotting).....	9
- LC – MC/MC.....	10
- Fijación de eritrocitos con glutaraldehído.....	10
- Ensayo de hemaglutinación	10
7. RESULTADOS.....	11
8. DISCUSIÓN	17
9. CONCLUSIÓN	20
10. LITERATURA CITADA.....	21

RESUMEN

Actinobacillus seminis es una bacteria gram-negativa, no móvil, microaerófila, perteneciente a la familia Pasteurellaceae. Es uno de los agentes causales de la epididimitis ovina que ha sido menos estudiado y del cual no existe un tratamiento, por lo que es el responsable de una gran pérdida económica en la industria ovina, debido a que esta enfermedad representa un desorden reproductivo serio, con marcados cambios patológicos en el tracto genital que pueden causar esterilidad e infertilidad. El estudio de los factores de virulencia de *A. seminis* es escaso, uno de los factores de mayor relevancia para la infección del hospedero es la adherencia, fenómeno en el que las adhesinas, como las hemaglutininas, son de las principales responsables.

El objetivo de este trabajo fue identificar y purificar una hemaglutinina de *A. seminis*. Se identificó una probable hemaglutinina de 150 kDa mediante un suero policlonal anti-hemaglutinina de *G. anatis* cepa F149^T. La hemaglutinina fue identificada mediante espectrometría de masas (LC-MC/MC), en la que mostró identidad con una proteína denominada GroEL, que se ha descrito como una chaperonina dependiente de ATP. Sin embargo esta proteína se ha caracterizado en diversos microorganismos como una proteína multifuncional, que puede llevar a cabo funciones de adherencia. Al purificar la proteína mediante cromatografía de intercambio iónico se obtuvo una posible hemaglutinina de 63 kDa que fue reconocida por un suero policlonal anti-hemaglutinina de *G. anatis* cepa F149^T, por un suero policlonal contra la proteína de 150 kDa de *A. seminis* y por un suero de borrego infectado con *A. seminis*. Estos resultados nos permiten concluir que esta proteína purificada de 63 kDa es probablemente una subunidad de la proteína de 150 kDa que posee un papel como una proteína hemaglutinina, que se expresa durante la infección del hospedero. Con la proteína purificada se realizaron ensayos de aglutinación con eritrocitos de borrego confirmando su actividad hemaglutinante.

Introducción

La epididimitis ovina es definida como una infección del testículo y epidídimo en carneros. Esta afección se puede presentar en fases subagudas, agudas y crónicas, y es clínicamente detectada cuando el testículo se encuentra atrofiado y degenerado, es una enfermedad que representa un desorden reproductivo serio, con marcados cambios patológicos en el tracto genital que pueden causar esterilidad e infertilidad (Appuhamy *et al.* 1998). La epididimitis ovina causa daños en organismos jóvenes y adultos, por lo que es una de las principales causas de pérdidas en la industria ovejera. La epididimitis es causada por varias especies bacterianas, tales como: *Actinobacillus seminis*, *Brucella ovis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, y *Haemophilus somnus* (Genetzky. 1995). 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. *A. seminis* es una bacteria gram-negativa, no móvil, microaerófila, de alrededor de 4 µm de longitud, perteneciente a la familia Pasteurellaceae. Para su crecimiento óptimo requiere de un medio enriquecido con sangre o suero con 10 % de CO₂ a 37°C; después de 24 h de incubación forma colonias de color grisáceo. No fermenta azúcares y no hidroliza urea pero es oxidasa positivo (Al-Katib & Dennis. 2009).

Los primeros casos de epididimitis causados por *A. seminis* fueron descritos en Australia en 1960 por Baynes y Simmons, quienes describieron una epididimitis supurativa en un carnero causada por un microorganismo pleomórfico Gram-negativo. En Nueva Zelanda *A. seminis* fue aislado de un carnero con epididimitis y poliartritis (Ekdahl *et al.* 1968). En México el primer caso de epididimitis causado por *A. seminis* se reportó en animales importados de Nueva Zelanda (Pérez *et al.* 1979).

La detección de la epididimitis ovina por *A. seminis* se basa en la correlación de los signos clínicos y el examen en laboratorio. La diagnosis de la epididimitis ovina ha sido basada sobre la aplicación de pruebas de laboratorio, que incluyen el aislamiento e identificación del organismo, pruebas serológicas y moleculares, así como exámenes cuantitativos y cualitativos de semen y de espermatozoides anormales. Sin embargo las pruebas moleculares no se han implementado completamente de manera rutinaria en

los laboratorios, además de que existe la posibilidad de no detectar a los microorganismos debido a su crecimiento lento. Por ello estos métodos de diagnóstico de *A. seminis* son ineficaces para el control de la epididimitis en carneros (Al-Katib & Dennis. 2009; Nuñez *et al.* 2006)

Al ser la epididimitis ovina una enfermedad asintomática en las primeras etapas de infección, resulta más difícil su control, por lo que se requiere de un diagnóstico más eficaz o la inmunización de los ovinos para controlar y erradicar esta enfermedad. El control de la epididimitis ovina se ha enfocado hacia otro de los microorganismos causales, *Brucella ovis*, del cual se tienen vacunas disponibles; lamentablemente estas son escasas. Es por ello que desafortunadamente, no existen vacunas comerciales para *A. seminis*, por lo tanto es importante el conocimiento de los factores específicos que predisponen a los carneros a esta enfermedad y los factores de virulencia expresados por *A. seminis* para obtener un panorama más amplio de este padecimiento y de el microorganismo que lo causa; sin embargo, el conocimiento de sus factores de virulencia es escaso.

Antecedentes

Algunos de los estudios que se han realizado en *A. seminis* son los siguientes: Healey y colaboradores describieron en 1990 un modelo para demostrar la adhesión de *A. seminis* a células epiteliales; sin embargo, no describieron las estructuras celulares involucradas. En *A. seminis* también se ha descrito una proteína de membrana externa de 75 kDa inmunogénica, presente en micro vesículas, que parece ser específica de este microorganismo (Nuñez et al. 2006). Además, De la Cruz, en el 2015 caracterizó las proteasas secretadas por *A. seminis*, las cuales fueron capaces de cortar inmunoglobulinas y fibrinógeno de bovino, otro de los hospederos de este microorganismo, lo cual sugirió, la posible participación de estas enzimas en la patogénesis y en la evasión de la respuesta inmune.

En especies de la familia Pasteurellaceae se han determinado diversos factores de virulencia, por ejemplo en diferentes serogrupos de *Pasteurella multocida* se caracterizaron vesículas de membrana externa (OMVs por sus siglas en inglés) en las que se encontraron proteínas inmunogénicas comunes y tres proteínas con capacidad proteolítica en los serogrupos A y E (Fernández et al. 2014). Montes y colaboradores determinaron en el 2016 que *Gallibacterium anatis* expresa una hemaglutinina (65 kDa) que es un factor de virulencia importante de este organismo, ya que es crucial para su adherencia a los eritrocitos de su hospedero.

Justificación

En *A. seminis* no se ha reportado la capacidad de expresar una hemaglutinina, por lo que es importante determinar si este microorganismo produce este factor de virulencia, para ampliar el conocimiento de su patogenicidad. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la producción de una hemaglutinina por *A. seminis* y purificarla para enriquecer el conocimiento de los factores de virulencia de esta bacteria y así contribuir a combatir y/o controlar la epididimitis ovina.

Objetivo general

- Identificar y purificar una hemaglutinina de *A. seminis*

Objetivos particulares

- Obtener el patrón de proteínas secretadas, de membrana externa y de extractos totales de *A. seminis*
- Evaluar diferentes métodos de precipitación y purificación de la probable hemaglutinina
- Determinar la capacidad de la proteína para aglutinar eritrocitos

Materiales y métodos

Cepa bacteriana

Se trabajó con tres cepas de *A. seminis*, una cepa de referencia (ATCC 15768) y dos aislados de campo (A4 y A8), las cuales forman parte del cepario del laboratorio de Genética de la Unidad de Morfología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM.

Condiciones de crecimiento bacteriano

Se realizó un pre cultivo de la bacteria en tubos de ensaye con 5 ml de TSB (Caldo soya tripticaseína) y se incubó durante 24 h a 37°C en agitación (175 r.p.m). Para determinar la pureza de los cultivos se inocularon placas de agar TSB y se incubaron a 37° C durante 24 h. Este pre cultivo en medio líquido se utilizó para inocular matraces (1:100) con 100 ml de TSB los cuales se incubaron a 37°C durante 24 h.

Obtención de fracciones proteicas

Obtención de extractos totales: Se centrifugó el cultivo bacteriano a 10500 rpm por 30 minutos a 8°C, posteriormente la pastilla celular se re suspendió en 1 ml de HEPES 10 mM pH 7.4 adicionado con lisozima (1.0 mg/ml). Se incubó 15 minutos a 37° C a 200 rpm. Posteriormente se sonicaron las células durante 10 ciclos (10 segundos de sonicación y 10 segundos de pausa) todo el tiempo en hielo. Enseguida de la sonicación, las muestras se centrifugaron a 13 400 rpm por 2 minutos y se recuperó la fracción soluble (Blackall *et. al.*, 1990).

Obtención de proteína de membrana externa (PME). El procedimiento para procesar las células bacterianas fue como se describió arriba, posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 13 400 rpm por 30 minutos. La pastilla se re suspendió en 200 µl de ácido N-2- Hidroxietipiperacina-N-2'Etanesulfónico (HEPES) 10 mM y se agregó 200 µl de HEPES 10 mM con 2% de Tritón X-100, las muestras se centrifugaron a 13 400 rpm durante 30 min. Se lavaron sin re suspender en 500 µl de HEPES, nuevamente se centrifugo 2 minutos a 13 400 rpm y la pastilla se guardó en congelación (Blackall *et. al.*, 1990).

Obtención de proteínas secretadas. Los cultivos líquidos fueron centrifugados (10 500 rpm, 20 min, 8° C) y el sobrenadante libre de células fue precipitado con sulfato de amonio (390 g/L) por 24 h a 4° C. El precipitado de proteínas se colectó por centrifugación (10 500 rpm, 20 min, 8°C). La pastilla se disolvió con buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 8 conteniendo 1 M de NaCl. A continuación la solución se centrifugó (10 500 rpm, 20 min, 8°C) y el sobrenadante se recuperó para ser colocado en una bolsa de diálisis y concentrarlo por deshidratación con sacarosa.

Purificación de la hemaglutinina por intercambio iónico

La fracción proteica de extractos totales fue precipitada con sulfato de amonio al 20% y las proteínas precipitadas fueron resuspendidas con buffer de fosfatos pH 6.5, posteriormente esta muestra se pasó a través de una columna de dietilaminoetil celulosa (DEAE-celulosa) previamente equilibrada con el mismo buffer. Las proteínas retenidas fueron eluidas con buffer de fosfatos pH 7.7, más diferentes concentraciones de NaCl (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 M). Las fracciones eluidas se precipitaron con 3 volúmenes de metanol en frío, y fueron colectadas por centrifugación (13 400 rpm, 10 min).

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Para visualizar las proteínas purificadas, incluidas las probables hemaglutininas, se realizó una SDS-PAGE al 10%, posteriormente los geles se tiñeron con una solución de Azul de Comassie R-250 al 0.25% en metanol y ácido acético y se destiñeron en una solución de ácido acético al 10%.

Obtención de anticuerpos contra la probable hemaglutinina de *A. seminis*

Se utilizaron conejos adultos proporcionados por el Bioterio de la FES-Iztacala, los cuales fueron mantenidos durante el periodo de obtención de anticuerpo bajo las condiciones señaladas en la NOM-062-Z00-1999).

Los conejos se inocularon por vía subcutánea cada dos semanas con cuatro dosis en total. Para cada inmunización, los conejos se inyectaron con la proteína de 150 kDa secretada por *A. seminis* cepa ATCC 15768 obtenida como se describió previamente. La proteína se mezcló con adyuvante completo de Freund (Sigam-Aldrich) para la primera inmunización. Posteriormente se dieron tres refuerzos con la misma cantidad de proteína, pero mezclada con una suspensión de Gelar, Aluminio, Magnesio y Dimeticona (Laboratorios Arlex) en lugar de adyuvante completo de Freund. Al término de este procedimiento los conejos se sangraron por punción cardiaca y de la sangre se separó el suero recuperarlo y conservarlo en congelación hasta su uso (Negrete *et al.* 1998).

Inmunoreconocimiento (Western Blotting)

Para identificar las probables hemaglutininas secretadas por *A. seminis*, las proteínas del SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por 2 h a 100 V. Después la membrana se bloqueó toda la noche en una solución de caseína al 5% en PBS-0.5% Tween-20. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween en intervalos de 10 min, con el fin de retirar el excedente de caseína (Negrete *et al.* 1999) Enseguida la membrana se incubó durante 2 hrs con el anticuerpo primario: suero anti-hemaglutinina de *G. anatis* cepa F149^T (Montes *et al.* 2016) suero de borregos infectados con *A. seminis*, o suero de conejo inmunizado con la probable hemaglutinina de *A. seminis* (150 kDa), todos ellos diluidos 1:1000 en PBS-Tween.

Terminada la incubación se retiró el primer anticuerpo y la membrana se lavó tres veces con PBS-Tween. Después se incubó con el anticuerpo secundario: anti-IgG de conejo o anti-IgG de borrego, marcados con peroxidasa (Sigma-Aldrich), diluidos 1:1000 con PBS-0.05% Tween-20. Posteriormente se lavó 3 veces más con PBS-0.05% Tween-20 y la reacción antígeno-anticuerpo se reveló con una solución de ácido fosfórico (50mM pH 7.4), con diaminobencidina (10 mg), CoCl₂, NiCl₂ y 30μl de peróxido de hidrógeno, la reacción se detuvo con agua destilada. (Negrete *et. al.*, 1999).

LC – MC/MC

Se realizó en un sistema de cromatografía líquida (LC) nanoAcquity nano flow (Waters), acoplado a un espectrómetro de masas LTQ velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), equipado con una fuente de iones de electronebulización nano utilizando métodos previamente descritos (Shevchenko *et al.* 2007). La adquisición de datos fue controlada por el software Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific). Los péptidos obtenidos se analizaron con BLAST en la base de datos GenBank para identificar proteínas codificadas en los genomas disponibles de *A. seminis*.

Fijación de eritrocitos con glutaraldehído

Los eritrocitos se prepararon según la técnica descrita por Soriano *et. al.*, (2002) que consiste en la recolección de sangre completa de ovino en solución Alsever, tres lavados con 0.15 M de NaCl. Enseguida los eritrocitos se fijaron en una solución que contiene Na₃PO₄ (pH 8.2) (1 volumen) y 0.15M de NaCl (9 volúmenes) en agua destilada (5 volúmenes) mas 1% de glutaraldehído. Los eritrocitos se incubaron en esta solución por 30 minutos a 4°C y se lavaron 3 veces con 0.15 M NaCl y posteriormente 5 veces con agua destilada. Al final se ajustaron los eritrocitos a una concentración de 1% en PBS con 0.01% de timerosal.

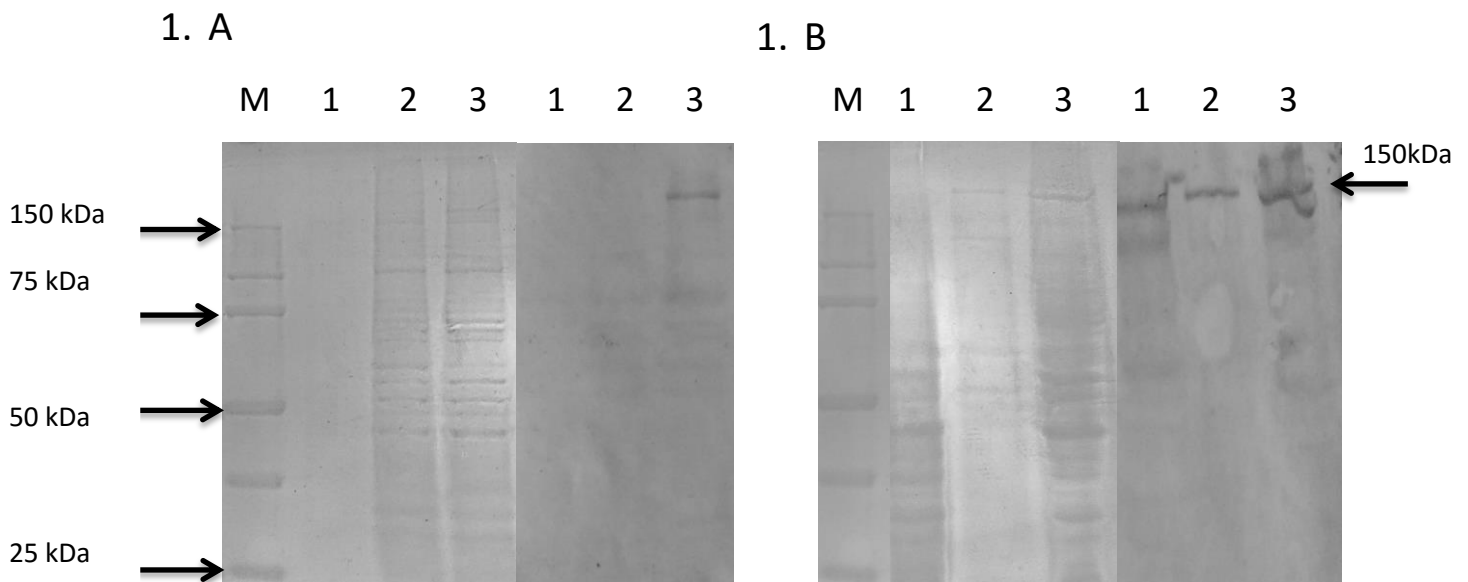
Ensayo de hemaglutinación

La capacidad hemaglutinante de la proteína purificada de *A. seminis* fue determinada como se describió previamente usando el método de micro-titulación. Para ello se realizó una incubación de la proteína purificada con eritrocitos de ovino fijados con glutaraldehído al 1%, usando como diluyente PBS que contiene 0.01% de timerosal. Se consideró como positivo a la aglutinación completa de los eritrocitos después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Como controles positivo y negativo, se emplearon células completas (*G. anatis* F149^T) y una suspensión de eritrocitos sin ninguna adición, respectivamente. Los ensayos se realizaron por triplicado en dos ocasiones diferentes (Soriano *et. al.*, 2002; Zepeda *et. al.* 2009).

Resultados

Obtención e inmunoreconocimiento de fracciones proteicas de *A. seminis*

Para identificar la probable hemaglutinina de *A. seminis* se trabajó con 4 fracciones proteicas (extractos totales, proteínas de membrana externa solubles e insolubles y proteínas secretadas) de la cepa de referencia ATCC 15768 y de aislados de campo (A4 y A8), con el fin de determinar la fracción proteica y la cepa que produjera la proteína de interés en mayor cantidad o con menos contaminantes, y que permitiera continuar con el proceso de purificación de una manera relativamente más fácil. A continuación se realizó una SDS-PAGE al 8% de cada fracción proteica y el gel se tiñó con azul de Comassie. Se observaron proteínas de 65 kDa y de alto peso molecular (>100 kDa) posibles hemaglutininas (ver más adelante) en las cuatro fracciones proteicas, sin embargo, se mostró una mayor expresión de posibles hemaglutininas y con menor cantidad de contaminantes en la fracción proteica de extractos totales principalmente, en las cepas A4 y A8, en las proteínas secretadas, mientras que en las proteínas de membrana externa solubles e insolubles también se observaron posibles hemaglutininas, pero en menor cantidad. La cepa A8 tuvo un mejor rendimiento para la obtención de las distintas fracciones proteicas (Fig.1).



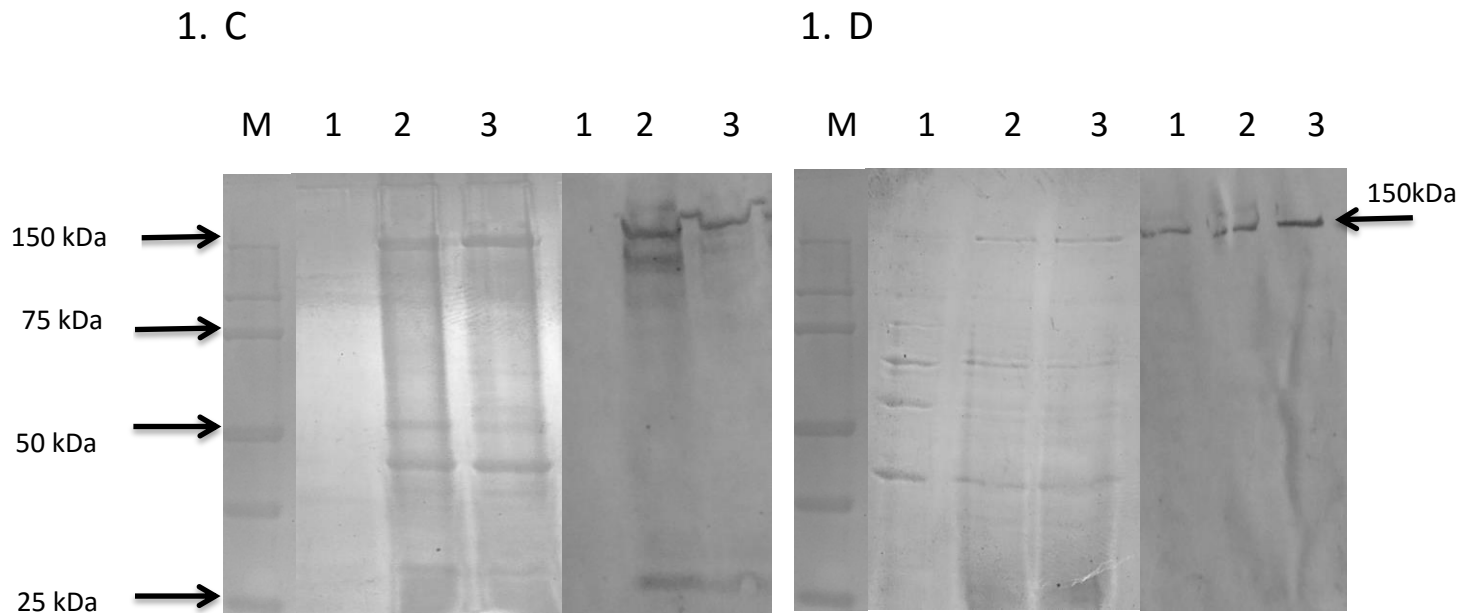


Fig.1 Fracciones proteicas de *A. seminis* cepas ATCC 15768 (1), A4 (2) y A8 (3) en SDS-PGE 8% e inmunoreconocimiento por suero α -hemaglutinina de *G. anatis* cepa *F149^T* 1.A: Proteínas de membrana externa solubles 1.B: Proteínas de membrana externa insolubles 1. C: Extractos totales 1. D: Proteínas secretadas

Posteriormente se realizó un inmunoreconocimiento con las fracciones obtenidas con un suero policlonal α -hemaglutinina de *G. anatis* (Montes *et al.* 2016), para determinar las proteínas reconocidas y discriminar la proteína posible hemaglutinina. Se determinó en el inmunoreconocimiento una posible hemaglutinina de 150 kDa la cual fue reconocida en todas las fracciones proteicas de la cepa A8. Sin embargo se observa en el gel una concentración muy baja de la proteína de 150 kDa en la fracción de proteínas de membrana externa solubles e insolubles y proteínas secretadas por la cepa A8, por el contrario en la fracción proteica de extractos totales se observó una mayor mayor cantidad (Fig.1).Purificación parcial de la proteína probable hemaglutinina.

Con el fin de identificar la proteína hemaglutinina, la fracción proteica de extractos totales se fraccionó usando precipitación con sulfato de amonio (20% – 40%) de manera que pudiera identificarse una banda bien separada por SDS-PAGE y utilizarse

para la secuenciación por espectrometría de masas. La proteína de 150 kDa fue identificada mediante el inmunoreconocimiento con un suero policlonal α -hemaglutinina de *G. anatis* cepa F149^T (Montes *et al.* 2016).

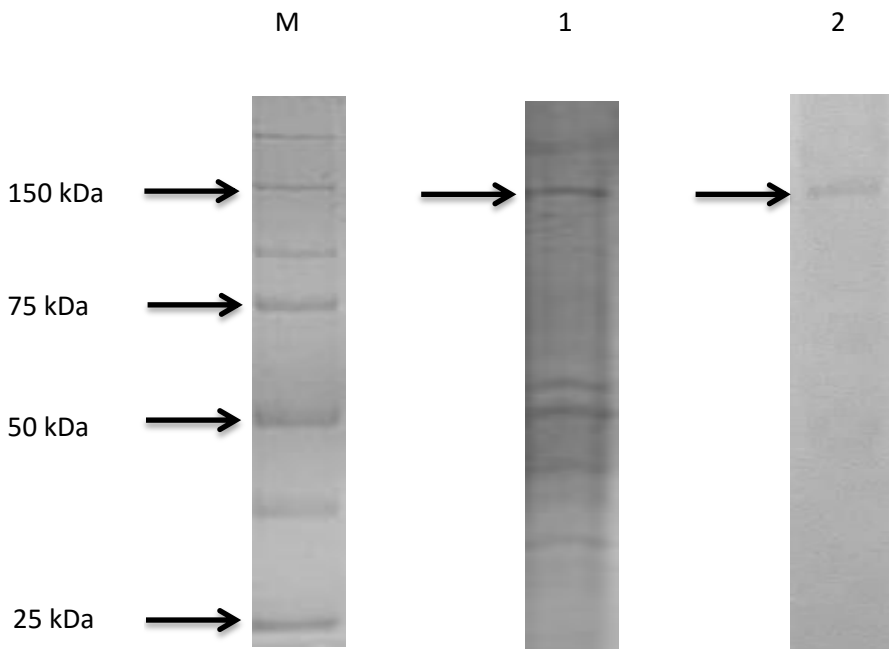


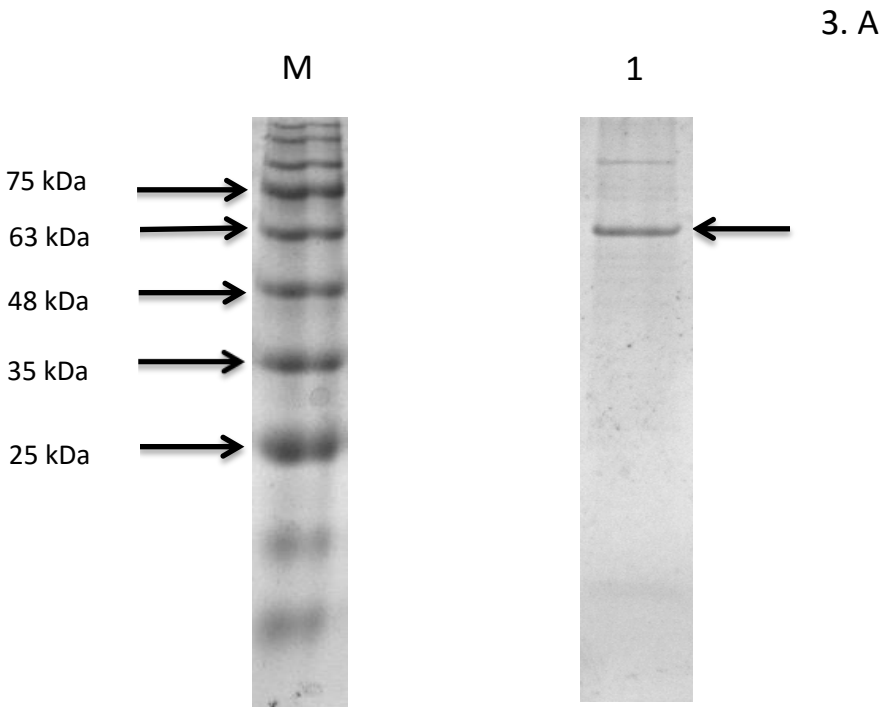
Fig. 2 Purificación parcial de la probable hemaglutinina de *A. seminis* de extractos totales de cepa A8 precipitados con sulfato de amonio al 30%. M: Marcador de peso molecular. 1: SDS-PAGE 8% 2: Inmunoreconocimiento con suero policlonal α -hemaglutinina de *G. anatis* cepa F149^T.

LC – MC/MC

Mediante el análisis de espectrometría de masas se encontró que la proteína de 150 kDa mostró identidad con una proteína denominada GroEL.

Purificación de la probable hemaglutinina mediante cromatografía de intercambio iónico

La muestra de extractos totales precipitada con sulfato de amonio al 30% se pasó por una columna de intercambio iónico (1.5 ml). Después de eluir la muestra con diferentes concentraciones de NaCl, se identificó una posible hemaglutinina con un peso molecular de 63 kDa mediante el inmunoreconocimiento con un suero de conejo α -150 kDa, suero policlonal de conejo α - HA de *G. anatis* y suero de Borrego infectado con *A. seminis*.



3. B

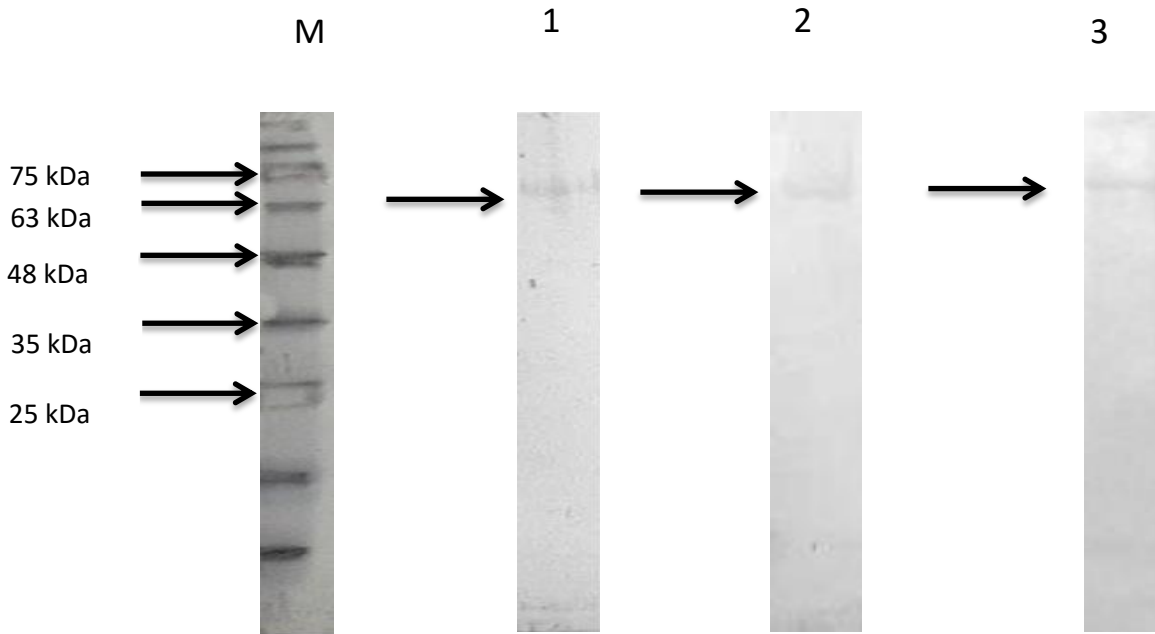


Fig. 3 Extractos totales de la cepa A8 purificadas por Cromatografía de Intercambio Ionico (C. I. I) en SDS-PAGE 10% e Inmunoreconocimiento 3 A: SDS-PAGE 10% M: Marcador de peso molecular 1: fracción eluida de la C. I. I. con 0.6 M de NaCl. 3 B: Inmunoreconocimiento de fracción eluida de la C. I. I. con 0.6 M de NaCl. M: Marcador de peso molecular, 1: suero α -150 kDa de *A. seminis* 2: suero α - HA de *G.anatis* 3: suero de Borrego infectado con *A. seminis*.

Ensayo de Hemaglutinación

Al confirmar que la proteína purificada era reconocida por un suero α - HA de *G.anatis*, así como por el suero α -150 kDa de *A. seminis* y el suero de Borrego infectado con *A. seminis*, se realizó el ensayo de hemaglutinación, usando como control positivo células de *G. anatis cepa F149^T* y como control negativo eritrocitos de borrego.



Fig. 4 Ensayo de aglutinación de la proteína purificada probable hemaglutinina de 63 kDa empleando eritrocitos de borrego. 1: células de *G. anatis cepa F149^T*. 2: Proteína purificada probable hemaglutinina de *A. seminis*. 3: eritrocitos de borrego.

Discusión

Las proteínas hemaglutinantes de bacterias patógenas son de particular interés debido a el gran potencial que poseen para ser candidatos como vacunas y a su papel como factores de virulencia. Se ha sugerido el uso potencial de las hemaglutininas de las bacterias patógenas *Haemophilus paragallinarum*, *Gallibacterium anatis* y *Avibacterium paragallinarum* como componentes de vacunas (Hobb *et al.* 2002., Gómez G. R. J. 2014 y Wang *et al.* 2014). Sin embargo para lograr el desarrollo de una vacuna viable a partir de una proteína hemaglutinante es necesario purificarla y caracterizarla para determinar el papel que juega la proteína en la virulencia del patógeno.

La purificación de la probable hemaglutinina de *A. seminis* se llevó a cabo evaluando previamente tres cepas, una cepa de referencia ATCC 15768 y dos aislados de campo: A4 y A8, así como diversas metodologías para su obtención, con el fin de determinar la cepa bacteriana y la muestra que presentara mayores cantidades de la proteína con menos proteínas adicionales. Para ello se realizó una SDS-PAGE al 8% para definir las proteínas expresadas por las tres cepas, posteriormente mediante el inmunoreconocimiento de las cuatro fracciones proteicas obtenidas, incubadas con un suero policlonal α -hemaglutinina de *G. anatis cepa F149^T*, se determinó que la proteína de 150 kDa era reconocida por este antisuero, así como por el suero de borrego infectado con *A. seminis*, por lo que se concluyó que esta podría ser la probable hemaglutinina. El presente estudio se enfocó en la fracción de extractos totales de la cepa aislada de campo A8 debido a que a partir de ella se obtuvo una mayor cantidad de la posible hemaglutinina en comparación con la cepa de referencia ATCC 15768 y el aislado de campo A4. Por ello, se decidió continuar trabajando únicamente con esta cepa (Fig.1).

Después de la purificación parcial mediante el fraccionado de las proteínas por precipitación con sulfato de amonio, la proteína de 150 kDa, posible hemaglutinina (Fig. 2), se identificó mediante el análisis de espectrometría de masas, que arrojó identidad con la proteína GroEL.

GroEL es una chaperonina del grupo 1, que actúa en compañía de una chaperonina llamada GroES. Este complejo de chaperoninas depende de ATP para llevar a cabo su actividad, que consiste en enlazar proteínas con pesos moleculares no mayores a 70 kDa. Las proteínas chaperonas llegan a reconocerse por ser importantes inhibidores de agregación de proteínas, uniendo los productos intermedios de plegado propensos a la agregación y bloqueando las reacciones de auto-asociación que conducen a la formación de agregados, aunque la unión simple de proteínas no nativas por GroEL inhiben la agregación pasivamente de proteínas, se ha sugerido que para muchas proteínas de sustrato GroEL participa activamente en la facilitación del plegamiento de proteínas (Ventura. 2005). GroEL también se considera como una proteína multifuncional; se ha descrito en diferentes organismos con funciones alternas a las mencionadas, algunos de ellos son: un homólogo de GroEL en larvas de Myrmeleon el cual funge como una toxina paralizante producida por los endosimbiontes bacterianos (*Enterobacter aerogenes*) en la saliva del insecto (Yoshida *et al.* 2001), GroEL se ha identificado como una proteína importante para la unión a la actina en *Enterococcus faecalis*, realizando un papel importante en la unión a las células epiteliales del hospedero (Peng *et al.* 2014). Por lo tanto se puede sugerir que esta proteína identificada mediante espectrometría de masas como GroEL, juega un posible papel como una proteína con capacidad hemaglutinante de *A. seminis*, debido a que es considerada como una proteína multifuncional, a el reconocimiento de la misma por un suero α - Hemaglutinina de *G.anatis* policlonal y a que aglutina eritrocitos de borrego.

Enseguida de la purificación de las proteínas mediante una cromatografía de intercambio iónico se realizó una SDS-PAGE al 10% y en el gel se observó una proteína purificada posible hemaglutinina de 63 kDa, la cual tuvo actividad inmunogénica frente a 3 diferentes sueros (Fig.3). Un resultado similar al encontrado en este trabajo, fue reportado previamente por Montes y colaboradores (2016) quienes describieron la purificación y caracterización de una proteína de aproximadamente 65 kDa con capacidad hemaglutinante y que probablemente también pudiese provenir de una proteína de mayor tamaño, como se observó en este trabajo. El reconocimiento inmune de una proteína de 150 kDa por un suero anti-HA, pero la purificación de una proteína de aproximadamente 63 kDa, da una idea acerca de la naturaleza de esta

proteína. O se trata de un agregado, y la proteína de 63 kDa es la subunidad más estable, o la proteína de aproximadamente 150 kDa se degrada, pero puede mantener sus características, ya que puede seguir siendo reconocida por los diferentes antisueros, y mantiene su función, pues es capaz de aglutinar eritrocitos de carnero. El reconocimiento por un suero de conejo inmunizado con una hemaglutinina de *G. anatis* (Montes *et al.* 2016) sugiere un posible papel como una proteína hemaglutinante y su reconocimiento por un suero de borrego infectado con *A. seminis* nos indica que esta proteína se expresa durante la infección del hospedero.

El ensayo de hemaglutinación con la proteína purificada de 63 kDa permitió confirmar que la proteína tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos de borrego (Fig. 4) fungiendo un rol importante en la adhesión. Por lo tanto se le puede atribuir esta actividad a la proteína de 150 kDa, identificada como GroEL, sugiriendo su capacidad como una proteína multifuncional. Se ha determinado anteriormente que GroEL tiene una posible función de adhesina en bacterias ácido lácticas unidas a la mucosa intestinal porcina (Kinoshita *et al.* 2016). GroEL no es la única proteína multifuncional que cumple con un papel importante en la adhesión a las células del hospedero, la proteína multifuncional de *G. anatis* identificada como EF-Tu, se sugirió como una proteína con función de adhesina por la formación de filamentos y su interacción con fibronectina y fibrinógeno (Lopez *et al.* 2017). Además Chincoya en el 2016 demostró que una proteína de *A. seminis* identificada como EF-Tu interactúa con diversos sueros que reconocen proteínas con funciones de adhesinas.

Conclusión

- *A. Seminis* expresa una posible hemaglutinina.
- Se encontró que la fracción proteica de extractos totales permitió una eficiencia mayor para la purificación de la posible hemaglutinina.
- La proteína purificada probable hemaglutinina de 63 kDa fue reconocida por los anticuerpos policlonales α -hemaglutinina de *G. anatis cepa F149^T* y de conejo inmunizado con esta proteína.
- La proteína purificada tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos de borrego.

Literatura citada

Al-Katib W. A. y Dennis S.M. 2009. Ovine genital actinobacillosis: A review, *New Zealand Vet J*, 57: 352-358.

Appuhamy S., Coote J.G., Low J.C., Parton R. 1998. PCR methods for rapid identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strains. *J Clin Microbiol.* 36:814–817.

Blackall P. J., Rogers D. G. Yamamoto R. 1990. Outer-membrane proteins of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 34: 871-877.

Baynes I, Simmons G. 1960. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*. *Aust Vet J.* 36: 454–459.

De la Cruz M. A. H. 2015. Caracterización de proteasas de *Actinobacillus seminis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tlalnepantla Edo. de México.

Delil Andrea Chincoya Martínez. 2016. Caracterización de adhesinas de *Actinobacillus seminis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tlalnepantla Edo. de México.

Ekdahl M.O., Money D. F. L. y Martin C. A. 1968. Some aspects of epididymitis of rams in New Zealand. *N Z Vet J.* 16: 81–82.

Fernandez R. M. A., Vaca S., Reyes L. M., Garza M., Aguilar R. F., Zenteno E., Soriano V. E. y Negrete A. E. 2014. Outer membrane vesicles of *Pasteurella multocida* contain virulence factors. *Microbiol. Open* 3: 711-717.

Genetzky R. 1995. Epididymitis in rams. *Food Anim.*17:447–454.

Gomez G. R. J. 2014. Identificación y purificación de una Hemaglutinina de *Gallibacterium anatis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Edo. de México.

Healey M. C., Hwang H. H., Elsner Y. Y. y Johnston A. V. 1990. A Model for Demonstrating the Adhesion of *Actinobacillus seminis* to Epithelial Cells. *Can J Vet Res* 55: 121-127.

Hoob R.H., Tseng H. J., Downes J. E., Terry T. D., Blackall P. J., Takagi M. y Jennings M. P. 2002. Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. Microbiol. 148: 2171-2179.

Kinoshita H., Ohuchi S., Arakawa K., Watanabe M., Kitasawa H. y Saito T. 2016. Isolation of lactic acid bacteria bound to the porcine intestinal mucosa and an analysis of their moonlighting adhesins. Bioscience of Microbiota, Food and Health. 35: 185-196.

Lopez O. J., Montes G. J. F., Vázquez C., Sánchez A. P., Pérez M. V. M., Blackall P. J., Vaca S. y Negrete A. E. 2017. J. Microbiol. 55: 1-8.

Montes G. J. F., Vaca S., Vazquez C. C., Soriano V. E., Aguilar R. F., Blackall P. J. y Negrete A. E. 2016. Identification of a Hemagglutinin from *Gallibacterium anatis*. Curr Microbiol. 72: 450-456.

Negrete A. E., Tenorio V. R., Guerrero A. L., García R. M., Reyes M. E. y 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.

Negrete A. E., Tenorio V. R. y De la Garza M. 1999. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. Curr. Microbiol. 38: 64-67.

Núñez A. A., Salas T. E., Garza M., Aparicio E. D. y Tenorio G. V. 2006. Identification of an immunogenic protein of *Actinobacillus seminis* that is present in microvesicles. Can. J. Vet. Res. 70: 43-49.

Peng Z., Krey V., Wei H., Tan Q., Vogelmann L., Ehrmann M. A. y Vogel R. F. 2014. Impact of actin on adhesion and translocation of *Enterococcus faecalis*. Arch Microbiol. 196:109–117.

Pérez D. P., Trigo T.F., De la Higuera J.J. y Flores C.R. 1979. Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México causada por *Brucella ovis*. Vet Mex 10:221–226.

Soriano V. E., Longinos P. G., Navarrete P. G. y Fernández R. P. 2002. Identification and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from México. Avian Dis. 34: 1005-1008.

Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J., Mann M. 2007. Ingel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc 1:2856–2860

Ventura S. 2005. Secuencia de los factores determinantes de la agregación de la proteína: herramientas para aumentar la solubilidad de proteínas. Microbial Cell Factories, 4: 11-11.

Wang Y. P., Hsieh M. K., Tan D. H., Shien J. H., Ou S. H., Chen C. F. y Chang P. C. 2014. The haemagglutinin of *Avibacterium paragallinarum* is a trimeric autotransporter adhesin that confers haemagglutination, cell adherence and biofilm formation activities. Vet. Microbiol. 174: 474–482.

Yoshida N., Oeda K., Watanabe E., Mikami T., Fukita Y., Nishimura K., Komai K. y Matsuda K. 2001. Chaperonin turned insect toxin. Nature. 411: 44.

Zepeda A., Ramirez S., Vieja V., Morales V., Talavera M., Salgado M. C., Simon M. J., Bojessen A. M. y Soriano V. E. 2009. Hemagglutinin activity of *Gallibacterium* strains. Avian Dis. 53: 115-118.