



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE *PASTEURELLA MULTOCIDA* TIPO A  
QUE CAPTURAN AL FACTOR H DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO**

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
**LUZ ELENA ALCARAZ SOSA**

TUTOR PRINCIPAL  
**ALFREDO SAHAGÚN RUIZ**  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
**EDGAR ZENTENO GALINDO**  
FACULTAD DE MEDICINA  
**ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA**  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOECNIA (CEIEPAA)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, ABRIL 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Dedicatorias**

A mi mami por su apoyo incondicional durante todos estos años. Porque día a día no dejó de mostrarme su entusiasmo y apoyo para llegar a esta meta.

A mi hermano Jesu y a mi sobrina Aimée quienes, con su particular forma de echarme porras, me apoyaron en todo momento.

A mis bendiciones Confetti, Luna, Flur flis y Arjún, quienes han estado todo este tiempo acompañándome.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca doctoral (beca 168668).

Esta investigación fue financiada por los proyectos DGAPA-UNAM PAPIIT IN222214 y IN221021.

Al Dr. Alfredo Sahagún Ruiz, por haberme ofrecido la oportunidad de realizar este trabajo, por haberme compartido su pasión y conocimiento por las bacterias y el Complemento, asimismo agradezco toda la paciencia que me tuvo en todo momento.

Al Dr. Carlos Alfredo Carmona Gasca, sin su apoyo y conocimiento, esto no hubiera sido posible.

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo y al Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma por haber sido parte del comité tutorial.

A Lizzi, Mariela, Osvaldo, Antonio, Maribel, Adriana, Ángeles y Fer que me apoyaron y entusiasmaron en todo momento para terminar este proyecto.

## Resumen

*Pasteurella multocida* es una bacteria que afecta a diferentes especies domésticas, causando infecciones respiratorias, sistémicas y procesos supurativos y por lo tanto pérdidas económicas importantes; además de causar una zoonosis con casos de sepsis en humanos infectados por los animales de compañía. El sistema del complemento activado causa la lisis de diversos microorganismos patógenos por la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). El objetivo del presente trabajo fue identificar proteínas de *Pasteurella multocida* capaces de capturar al Factor H del sistema del complemento y evadir la respuesta inmune del hospedero contra esta bacteria. Un aislado de *P. multocida*, fue enfrentado con suero normal observando una reducción significativa en la viabilidad con respecto al cultivo enfrentado a suero inactivado durante 30 min a 37°C utilizado como control ( $p < 0.0001$ ), sin embargo, alrededor de la mitad de las bacterias logran sobrevivir. Se identificó la captura del Factor H del sistema del complemento por las proteínas GroEL, Acetyl-CoA C-Acetiltransferasa, OmpA, peroxiredoxina C y RPL6 de la bacteria. Estos resultados sugieren que la interacción del Factor H con estas proteínas bacterianas es un mecanismo activo para evadir la respuesta inmune del hospedero.

Palabras clave: *Pasteurella*, Factor H, sistema del complemento, evasión inmune.

## **Abstract**

*Pasteurella multocida* affects different domestic animal species, causing respiratory and systemic infections and suppurative processes and therefore important economic losses; in addition to causing a zoonosis with cases of sepsis in humans infected by companion animals. The activated complement system causes the lysis of various pathogenic microorganisms by the formation of the membrane attack complex (MAC). This work aimed to identify *Pasteurella multocida* proteins capable of capturing Factor H from the complement system and evading the host's immune response against this bacterium. *P. multocida* was incubated with normal serum and with heat-inactivated serum for 30 min at 37°C as control, a significant reduction in the viability was observed in the bacteria incubated with normal serum, in contrast to the culture facing the heat-inactivated serum ( $p < 0.0001$ ), nevertheless, half of the bacteria survived. It was identified that the capture of Factor H from the complement system by the proteins GroEL, Acetyl-CoA C-Acetyltransferase, OmpA, peroxiredoxin C and RPL6 of the bacterium. These results suggest that the interaction of Factor H with these bacterial proteins is an active mechanism to evade the host immune response.

Keywords: *Pasteurella*, Factor H, complement system, immune evasion.

## Contenido

|  |      |
|--|------|
| Dedicatorias.....                            | I    |
| Agradecimientos.....                         | II   |
| Resumen.....                                 | III  |
| Abstract.....                                | IV   |
| Contenido.....                               | V    |
| Lista de Cuadros.....                        | VIII |
| Lista de Figuras.....                        | IX   |
| Introducción.....                            | 1    |
| <i>Pasteurella</i> .....                     | 2    |
| Factores de virulencia.....                  | 4    |
| Cápsula.....                                 | 4    |
| Lipopolisacárido.....                        | 5    |
| Adherencia.....                              | 6    |
| Proteínas de membrana externa.....           | 6    |
| Sistema inmune.....                          | 7    |
| Evasión del sistema del complemento.....     | 7    |
| Sistema del complemento.....                 | 8    |
| Vía clásica.....                             | 10   |
| Vía de las lectinas.....                     | 10   |
| Vía alterna.....                             | 10   |
| Complejo de ataque de membrana.....          | 11   |
| Reguladores del sistema del complemento..... | 11   |

|  |    |
|--|----|
| Factor H.....  | 13 |
| Medicina preventiva.....   | 13 |
| Tratamiento.....   | 14 |
| Justificación.....   | 16 |
| Hipótesis.....   | 17 |
| Objetivo General.....  | 17 |
| Material y Métodos.....  | 18 |
| Suero humano normal.....   | 18 |
| Cultivo bacteriológico.....  | 18 |
| Prueba de supervivencia.....   | 18 |
| Captura del Factor H por <i>Pasteurella multocida</i> tipo A.....                            | 19 |
| Identificación de proteínas de <i>Pasteurella multocida</i> que capturan el<br>Factor H..... | 20 |
| Preparación de la muestra.....   | 20 |
| Cuantificación de la muestra.....  | 20 |
| SDS – PAGE.....  | 21 |
| Tinción con azul de Coomasie.....  | 21 |
| Electrotransferencia.....  | 21 |
| Inmunodetección de la captura del Factor H.....  | 22 |
| Electroforesis Bidimensional.....  | 22 |
| Precipitación de proteína.....   | 22 |
| Isoelectroenfoque.....   | 22 |
| Resultados.....  | 25 |

|   |    |
|---|----|
| Supervivencia de <i>Pasteurella multocida</i> al complemento.....   | 25 |
| Captura del Factor H del sistema del complemento.....   | 27 |
| Inmunodetección de la captura del Factor H por proteínas de <i>Pasteurella multocida</i> mediante Western blot.....                       | 29 |
| Identificación de proteínas de <i>Pasteurella multocida</i> que capturan al Factor H.....   | 31 |
| Identificación de las proteínas de <i>Pasteurella multocida</i> que capturan al Factor H por análisis de espectrofotometría de masas..... | 33 |
| Discusión.....  | 36 |
| Conclusiones.....   | 42 |
| Referencias.....  | 43 |
| Apéndice.....   | 58 |

## **Lista de Cuadros**

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 1. Reguladores del sistema de complemento.....  | 12 |
| Cuadro 2. Identificación de las diferentes proteínas de <i>P. multocida</i> que capturan al Factor H sérico del sistema del complemento..... | 35 |

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Activación del sistema del complemento.....   | 9  |
| Figura 2. Supervivencia de <i>Pasteurella multocida</i> a la acción del sistema del complemento presente en el suero.....                   | 26 |
| Figura 3. Captura de FH de suero por <i>Pasteurella multocida</i> tipo A.....   | 28 |
| Figura 4. Detección de proteínas de <i>Pasteurella multocida</i> que capturan Factor H.....   | 30 |
| Figura 5. Electroforesis bidimensional teñido con azul de Coomasie y WB superpuesto de <i>Pasteurella multocida</i> .....                   | 32 |
| Figura 6. Secuencias de péptidos de las proteínas de <i>Pasteurella multocida</i> que capturan el Factor H del sistema del complemento..... | 34 |

## **Identificación de proteínas de *Pasteurella multocida* tipo A que capturan al Factor H del Sistema de Complemento**

### **Introducción**

Las enfermedades infecciosas afectan la productividad de los animales, siendo las neumonías una de las causas más importantes de pérdidas económicas en las unidades de producción. La etiología de las neumonías puede ser muy variada constituyendo el complejo respiratorio bovino (CRB), que es una de las tres principales causas de desecho y por lo tanto representan pérdidas económicas importantes en los corrales de engorda de bovinos (Adler y col. 1999, Dabo y col. 2007).

Se ha observado que las pérdidas más importantes son por los animales afectados crónicamente, debido a gastos adicionales por servicios médicos y tratamientos, además de la pérdida de peso y retraso en el crecimiento por conversión alimenticia deficiente, lo que trae como consecuencia una menor producción de carne. En México no existen estudios sobre pérdidas económicas en la industria del engorde de ganado, mientras que en el Reino Unido calculan la pérdida de 22 libras esterlinas en promedio por becerro de engorda afectado y en Estados Unidos han estimado la pérdida de 1 billón de dólares anuales por este concepto. En los Estados Unidos, demostraron también que, en el ganado de carne, el 64% presentó evidencia de neumonía, de los cuales el 75% corresponden a pasteurelosis neumónica (Aguilar, 2010).

Las especies de *Pasteurella* pueden causar enfermedades en casi todas las especies animales, además de que son parte de la microbiota de orofaringe de varias especies, actúan como agentes primarios y oportunistas. *Pasteurella multocida* es la causante de cólera aviar, septicemia hemorrágica y una variedad de síndromes respiratorios, tales como neumonía en bovinos, rinitis atrófica en porcinos y rinitis purulenta en lepóridos (Al-Hasani y col., 2007; Wilkie y col., 2012; Aktories y col., 2012). El cólera aviar es una enfermedad de aves domésticas y silvestres, causando grandes pérdidas en la producción avícola, también es

responsable de una alta mortalidad en aves acuáticas. La septicemia hemorrágica es una enfermedad que afecta a ungulados en Asia y África, es aguda y letal. La rinitis atrófica es generalmente una enfermedad que afecta a porcinos en crecimiento; también se ha reportado en conejos, caprinos y bovinos, causando atrofia de los cornetes nasales, distorsión del maxilar y afección en su crecimiento. En los conejos esta bacteria está asociada a rinitis purulenta, otitis media, sinusitis, infecciones genitales, septicemia y neumonía. Particularmente en bovinos de todas las edades y en porcinos, *Pasteurella multocida* ocasiona bronconeumonías agudas y crónicas. Otras asociaciones comunes en cualquier especie incluyen abscesos subcutáneos o celulitis, mastitis, infecciones genitales y septicemia (Boyce y col., 2004; Harper y col., 2006; Al-Hasani y col., 2007; Aktories y col., 2012). La transmisión zoonótica se produce a través de mordeduras de animales, arañazos, lamidos en abrasiones de la piel o por contacto con secreciones nasales, donde *P. multocida* es el aislado más frecuente observado en las infecciones humanas (Souza, 2009; Wilson y Ho, 2013; Abreu y col., 2018; D'Amico y col., 2022). La prevalencia de anticuerpos frente a *P. multocida* fue 2 veces mayor en individuos sanos con exposición ocupacional (Wilson y Ho, 2013), lo que indica que la exposición a animales aumenta la probabilidad de infección y en casi todos los casos de muerte por pasteurelisis parece ser el resultado de una complicación de la infección adquirida a través del contacto con animales (Hey y col., 2012). La utilización de conejos como animales de compañía expone a la infección por *P. multocida*; lo anterior ha sido documentado, pero no ha sido considerado un problema de salud pública (Lin y col., 2006; Per y col., 2010; Ferreira y col., 2016; D'Amico y col., 2022).

### ***Pasteurella***

Los miembros del género *Pasteurella* son bacilos cortos pleomórficos con tinción bipolar con Giemsa, Gram negativos, no móviles, que miden 0.3–1.0 µm de ancho y 1.0–2.0 µm de longitud. Pueden desarrollarse bajo condiciones aeróbicas, microaerofílicas, o anaeróbicas a 37°C y son incapaces de multiplicarse en medio

MacConkey o citrato de Simmon. Las pruebas bioquímicas resultan en catalasa, oxidasa e indol positivos, fermentación de sacarosa, glucosa y maltosa (Boyce y col., 2004; Castillo y col., 2014).

A partir de 1980 se empezaron a reclasificar los géneros *Pasteurella*, *Actinobacillus* y *Haemophilus*, mediante el empleo de la secuenciación de los genes 16S ARNr y *rpoB*, surgiendo los géneros *Mannheimia*, *Bibersteinia*, *Gallibacterium* e *Histophilus*, entre otros, y a partir de 2007 el género *Pasteurella* que actualmente incluye 14 especies: *Pasteurella aerogenes*, *P. bettyae*, *P. caballi*, *P. canis*, *P. dagmatis*, *P. langaaensis*, *P. lymphangitidis*, *P. mairii*, *P. oralis*, *P. skyensis*, *P. stomatis*, *P. testudinis* y *P. multocida*. Dentro de *P. multocida* se reconocen 4 subespecies: *P. multocida multocida*, *P. multocida gallicida*, *P. multocida septica* y *P. multocida tigris* (Harper y col., 2006; Aktories y col., 2012; Huberman y Terzolo, 2015). La secuencia del genoma completo de *Pasteurella multocida* cepa PM70 (no virulenta asociada a pollos y pavos) ha sido determinada (May y col., 2001), contiene un cromosoma circular de 2,257,487 pb de longitud y codifica 2,015 marcos abiertos de lectura, 6 operones RNAr, 57 RNAt. *Pasteurella multocida* cepa PBA100 (serotipo A:1, importante patógeno en rumiantes y aves) tiene solamente 5 operones RNAr, estimándose un tamaño de 2.35 Mpb (Hunt y col., 1998). El genoma contiene 37.7 a 45.9% de contenido G + C (Mutters y col., 2003).

Las cepas de *Pasteurella multocida* son diferenciadas por métodos serológicos y genómicos. El método utilizado para el reconocimiento de los antígenos capsulares es la hemoaglutinación indirecta; y para el lipopolisacárido, se utiliza inmunodifusión en gel. Con estos métodos se han diferenciado 5 grupos capsulares (A, B, D, E y F) y 16 tipos de lipopolisacárido (1–16) (Boyce y col., 2004; Harper y col., 2006; Al-Hasani y col., 2007; Aktories y col., 2012). La septicemia hemorrágica es causada por los serogrupos B:2, B:2.5, B:6, E:2, E:2.5 y E:6; el cólera aviar es causado por los serogrupos A, F y ocasionalmente el D; la rinitis atrófica porcina por cepas productoras de toxinas dermonecróticas de los serogrupos A y D, y las infecciones respiratorias son causadas por el serogrupo tipo A (Townsend y col., 2001; Boyce y col., 2004). El serotipo más importante en bovinos es el A:3, seguido del D:3.

*Pasteurella multocida* es comúnmente aislado en síndromes respiratorios de individuos jóvenes incluyendo neumonía neonatal enzoótica, neumonía de terneros y fiebre de embarque, a esta última también se asocia *Mannheimia haemolytica*. Diversos factores, además de la bacteria, tales como estrés, clima, mal nutrición, transporte y otras infecciones tanto bacterianas como virales contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Okerman y col., 1979; Rideaud y col., 1992; Boyce y col., 2004; Aktories y col., 2012).

### **Factores de virulencia**

La patogenicidad y la virulencia de los microorganismos son proporcionales y esto se observa con la identificación de numerosos agentes etiológicos, siendo el huésped el principal determinante de la enfermedad (Isenberg, 1988). Los diferentes factores de virulencia que posee *P. multocida* puede causar una variedad de afecciones en los diferentes hospederos, donde se describen al lipopolisacárido, cápsula, adhesinas y proteínas de membrana externa (Aktories y col., 2012). En *Pasteurella* se han encontrado 104 genes asociados a virulencia, representando un 7% de la densidad de codificación del genoma. Existe una región de 24 kb con dos factores de virulencia, correspondientes a hemaglutininas filamentosas codificadas por los genes *pfhB1* y *pfhB2* con 7,845 y 11,757 pares de bases (pb), respectivamente (May y col., 2001). Con la finalidad de encontrar nuevas alternativas para el desarrollo de vacunas, se analizaron proteínas en la membrana externa de *P. multocida* encontrando el antígeno denominado Oma87, el receptor heme-hemopexina (HemR), la proteína lactato permeasa (LctP) y la proteína heptosil transferasa F (RfaF), (Tabatabai, 2008). Aproximadamente el 30% de los genes de la bacteria codifican para proteínas de membrana y el 50% de la membrana externa está constituida por proteínas con capacidad de interactuar con proteínas del huésped (Koebnik y col., 2002).

### **Cápsula**

La mayoría de las cepas de *P. multocida* producen una cápsula de polisacárido en su superficie. Se han identificado diferentes cepas de *P. multocida* que expresan

polisacáridos capsulares con diferentes composiciones químicas. Las cepas Carter tipo A expresan una cápsula de polisacárido compuesta principalmente de ácido hialurónico (Rosner y col., 1992). Las cepas Carter tipo D expresan una cápsula de polisacárido compuesta de heparina no modificada (De Angelis y col., 2002). Las cepas tipo F expresan una cápsula compuesta de condroitina no modificada (De Angelis y col., 2002). Estos polisacáridos capsulares son glicosaminoglicanos (GAGs) idénticos en su estructura primaria a los componentes de la matriz extracelular eucariótica; aunque la heparina y condroitina eucarióticas son sulfatadas, los polisacáridos capsulares bacterianos no lo son. En eucariontes, los componentes estructurales GAGs juegan un papel crítico en la adhesión célula a célula y en la regulación de la actividad de varias proteínas, proporcionando un mecanismo inmunológico para el mimetismo molecular bacteriano, resistencia a la fagocitosis y evasión inmune durante el proceso de infección (Borrathybay y col., 2003; Guan y col., 2019). La estructura química exacta de los polisacáridos expresada por las cepas Carter tipos B y E no ha sido elucidada pero la cápsula tipo B incluye en su composición manosa, arabinosa y galactosa (De Angelis y col., 2002).

#### Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es un componente estructural importante de la membrana externa de las bacterias Gram negativas con un rol en virulencia determinante, algunos factores de *P. multocida* son críticos para la virulencia, pero no en todas las especies hospedadoras, por ejemplo, el LPS es más importante en cólera aviar que en septicemia de ratones (Harper, 2003). Las enterobacterias expresan LPS con cantidad variable de repeticiones del antígeno polimérico O. Se ha examinado con detalle la estructura del LPS de *P. multocida* extraído de la cepa VP161 serotipo A:1; esta cepa expresa cantidades iguales de dos diferentes glicofomas de LPS designados como A y B; estas glicofomas comparten una estructura nuclear externa idéntica pero sus estructuras nucleares internas son diferentes (St. Michael y col., 2005). La estructura del LPS en *P. multocida* es variable y producen

estructuras similares al componente carbohidrato de las glicoproteínas del huésped, lo cual le permite mimetizarse con las moléculas del huésped jugando un papel importante en su supervivencia, asimismo desempeña un papel importante en la resistencia a la acción de las catelicidinas de pollo, además de estimular a la respuesta inmune del huésped (Harper y Boyce, 2017).

#### Adherencia

Las fimbrias son filamentos que se asocian a la colonización de superficies epiteliales del hospedador y en consecuencia a la patogénesis de la enfermedad (Virji y col., 1992; Virji y col., 1993; Doughty y col., 2000). En *P. multocida* la fimbria tipo 4, codificada por el gen *ptfA* (Doughty y col., 2000), es un factor importante en la adhesión a células del epitelio del tracto respiratorio superior (Glorioso y col., 1982; Esquinas e Iregui, 2007). Otro tipo de adhesina es la hemaglutinina filamentosa (PfhA), codificada por el gen *pfhA*; esta posee una estructura similar a la hemaglutinina de *Bordetella pertussis*, que desarrolla una función importante en la colonización del tracto respiratorio, favoreciendo la adhesión al epitelio (Kimura y col., 1990; Mooi y col., 1992) y se ha sugerido que funciona de manera similar en *P. multocida* (May y col., 2001, Tatum y Briggs, 2005).

#### Proteínas de membrana externa (Omps)

Se han caracterizado algunas Omps de *P. multocida*, incluyendo OmpH, OmpA, proteína de tipo P6, PlpB, GlpQ, Lpp y Oma78. Según estudios proteómicos revelaron la existencia de otras 28 proteínas y 10 de éstas podrían ser porinas (Boyce y col., 2006). Se demostró que varias Omps actúan como factores de virulencia, la OmpH ha sido caracterizada y se ha encontrado en todos los aislados de bovinos (Dabo y col., 2007); inclusive se ha propuesto como una vacuna, ya que protege ratones y pollos contra el desafío con *P. multocida* (Vasfi y Mittal, 1997; Luo y col., 1999). La OmpH es una porina trimérica que también se conoce como proteína H con un peso de 37.5 kDa (Chevalier y col., 1992), es la única porina que ha sido probada por su capacidad para estimular las células inmunes. En un estudio comparando los efectos inmunogénicos de la porina recombinante con el LPS de *P.*

*multocida*, la OmpH indujo la expresión de citocinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  e IL-12 a partir de monocitos y macrófagos de esplenocitos murinos (Iovane y col., 1998). Actualmente, se desconoce cómo OmpH de *P. multocida* interactúa con la célula huésped.

### **Sistema inmune**

La capacidad del individuo para controlar la infección local por bacterias de la familia Pasteurellaceae depende de la producción de anticuerpos IgA que inhiben la colonización y el desarrollo de la bacteria en la mucosa respiratoria, mientras que el control de su invasión a tejidos depende de la producción de anticuerpos IgG y de la activación del sistema del complemento (Aktories y col., 2012). Varias bacterias de la familia Pasteurellaceae tienen la capacidad de diseminarse a órganos internos por lo que han evolucionado diferentes mecanismos para evadir el sistema inmune innato. El sistema del complemento es la principal respuesta humoral del sistema inmune innato y tiene gran relevancia en la protección contra las bacterias y otros patógenos invasores debido a su actividad opsonica y citolítica sobre el patógeno, además de su actividad proinflamatoria. La evasión del sistema del complemento por algunas bacterias ha sido documentada (Zipfel y col., 2013), y uno de los mecanismos para la evasión es por medio de la captura de reguladores negativos del complemento. En estudios anteriores, se demostró que *Rodentibacter pneumotropicus* (antes *Pasteurella pneumotropica*) es capaz de capturar los reguladores negativos del complemento Factor H y C4bBP (C4b binding protein) (Sahagún-Ruiz y col., 2014). Adicionalmente, algunas bacterias producen proteasas capaces de desdoblarse componentes centrales del complemento como C3 y C5 (Fraga y col., 2014).

### **Evasión del sistema del complemento**

Se ha reportado que especies de bacterias de los géneros: *Neisseria* (Ram y col., 1998), *Bordetella* (Berggard y col., 2001), *Helicobacter* (Rautemaa y col., 2001), *Moraxella* (Nordström y col., 2004), *Leptospira* (Meri y col., 2005), *Treponema* (Mcdowell y col., 2005), *Staphylococcus* (Jongerius y col., 2007), *Pseudomonas*

(Kunert y col., 2007), *Escherichia* (Maruvada y col., 2008), *Porphyromonas* (Potempa y col., 2008), *Streptococcus* (Maruvada y col., 2008), *Aggregatibacter* (Henderson y col., 2010), *Salmonella* (Ho y col., 2011), *Borrelia* (Kisova-Vargová y col., 2012), *Mycobacterium* (Zhang y col., 2013), *Yersinia* (Ho y col., 2014), *Haemophilus* (Fleury y col., 2014), *Pasteurella* (Sahagún-Ruiz y col., 2014), *Acinetobacter* (Koenigs y col., 2016); evaden el complemento capturando reguladores negativos solubles. *Rodentibacter pneumotropicus* (antes *P. pneumotropica*) captura Factor H y C4BP y es incapaz de sobrevivir al suero carente del Factor H; por lo que la captura del Factor H por las proteínas de unión a reguladores del complemento es crítica para su supervivencia en suero (Sahagún-Ruiz y col., 2014).

### **Sistema del complemento**

El sistema del complemento participa en la respuesta inmune innata y se activa por el reconocimiento de patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs), células dañadas y complejos inmunes (Bajic y col., 2015). Al activarse la cascada del complemento, para la eliminación de dichos patógenos, se provoca una respuesta proinflamatoria que conduce al reclutamiento y la activación de células inmunitarias tanto de la respuesta inmune innata, como de la respuesta inmune adaptativa. A través de estas actividades, complementan funciones en la primera línea de defensa contra patógenos, pero también contribuyen significativamente al mantenimiento de la homeostasis y a la prevención de la autoinmunidad (Bajic y col., 2015). También participa en la angiogénesis y regeneración de tejidos (Mastellos y Lambris, 2002; Ricklin y col., 2010).

El sistema del complemento está constituido por más de 50 proteínas. La mayoría de las proteínas circulantes se producen en el hígado, aunque la biosíntesis extrahepática del complemento ocurre en fibroblastos, células T y B, adipocitos y células endoteliales (Bajic y col., 2015). El sistema puede ser activado por tres vías: la vía clásica, la vía alterna y la vía de las lectinas, como se puede observar en la Figura 1.

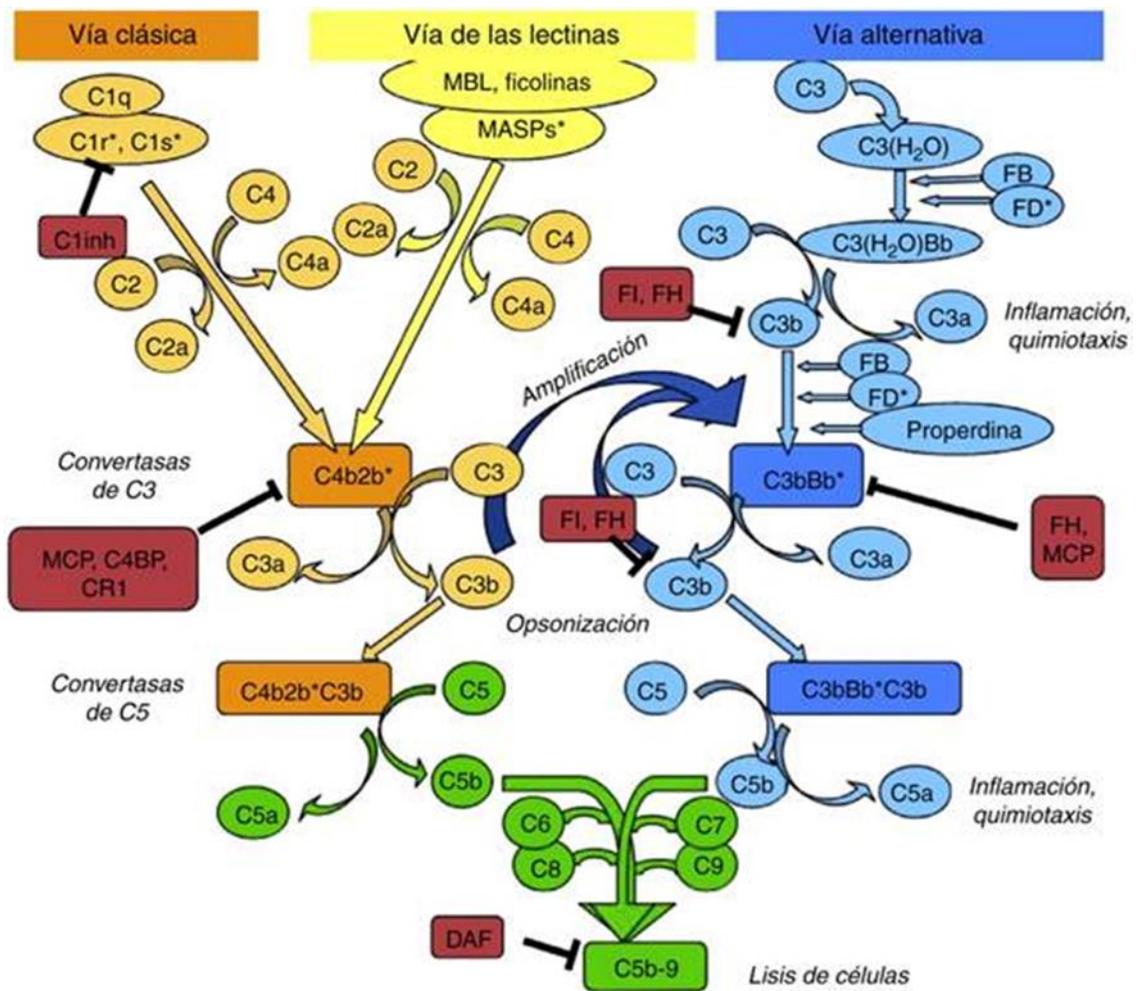


Figura 1. Activación del sistema del complemento (obtenido de Nozal y López-Trascasa, 2016). El sistema se activa mediante 3 vías, generando convertasas de C3 (C4b2b o C3bBb). La unión de una nueva molécula de C3b a las convertasas de C3 les confiere la capacidad de activar a C5, dividiéndolo en C5a y C5b. Este último inicia la fase terminal del complemento, para finalmente formar el complejo de ataque a la membrana (C5b-9), lisando a la bacteria.

### Vía clásica

Esta vía es dependiente de anticuerpos, ya que es iniciada cuando una molécula de C1q se une a los anticuerpos IgM o IgG unidos al antígeno. C1q se compone de 18 cadenas agrupadas en seis hélices triples tipo colágena, asociadas a las serin proteasas C1r y C1s dos moléculas de cada una (Kindt y col., 2007). Adicionalmente, C1q es capaz de activar al complemento directamente, mediante el reconocimiento de estructuras microbianas y células apoptóticas, o bien, a través de pentraxinas, como la proteína C reactiva (Bajic y col., 2015). C1r activa a C1s, que desdobra C4 en C4a y C4b. C4b se deposita en la superficie bacteriana actuando como opsonina. Enseguida, C4b capta C2 y C1s desdobra C2 en C2a y C2b. C2a permanece unido a C4b y constituye la convertasa de C3 (C4b2a) (Ricklin y col., 2010).

### Vía de las lectinas

Esta vía se activa por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, por la Mannose Binding Lectin (MBL), que es una colectina que reconoce manosa en la superficie de los microorganismos. Otras moléculas activadoras de la vía de las lectinas son la colectina 11, y las ficolinas H, L y M, que contienen dominios similares a colágeno y fibrinógeno, que reconocen carbohidratos acetilados en la superficie de los patógenos llevando a la activación subsecuente de las proteasas de serina asociadas a MBL (MASPs 1, 2 y 3). MASP2 activa C4 y C2, formando la convertasa de C3, similar a la vía clásica de complemento (C4b2a). Adicionalmente, MASP1 puede cortar directamente a C3 como ocurre en la vía alterna del complemento (McMullen y col., 2006).

### Vía alterna

Esta vía se activa mediante la hidrólisis espontánea del enlace tioéster de C3. El C3 hidrolizado (C3H<sub>2</sub>O) se une al componente B, el cual es desdoblado por el Factor D en Ba y Bb produciendo una convertasa soluble de C3 (C3H<sub>2</sub>O-Bb), la cual desdobra C3 en C3a y C3b. C3b se une a la superficie del microorganismo y se une al componente B, que es desdoblado por el Factor D, formando la convertasa de C3

de la vía alterna (C3bBb), fija a la superficie del patógeno. La fracción C3a, tiene función anafilotóxica y quimiotáctica para leucocitos. La molécula C3bBb es estabilizada por la properdina con iones de magnesio. A la convertasa de C3 se une otro C3b produciendo C3bBb3b, que tiene actividad de convertasa de C5. La amplificación de la vía alterna del complemento incrementa la densidad de C3b depositado sobre la superficie del patógeno, favoreciendo su fagocitosis ya que C3b actúa como opsonina, además de conducir a la formación de las convertasas de C5 (C4b2a3b o C3bBb3b) (Ricklin y col., 2010).

#### Complejo de ataque de membrana (MAC)

El MAC es la fase terminal donde confluyen las tres vías del complemento. Las convertasas de C5 (C4b2a3b o C3bBb3b) desdoblan C5 en C5a y C5b, esta última queda unida a la superficie del patógeno y permite la agregación de los componentes C6 y C7, el complejo se inserta en la membrana celular cuando se integra el componente C8, el cual permite la subsecuente polimerización de 12-18 unidades de C9 que forman un poro de 90 a 110 Å de diámetro (C5b6789n). Estos poros son responsables de causar la lisis del patógeno blanco (Bajic y col., 2015).

#### **Reguladores del sistema del complemento**

Para evitar que la activación del complemento dañe a las células del hospedero se requiere de una regulación muy fina (Bajic y col., 2015). La regulación se lleva a cabo mediante proteínas reguladoras negativas solubles y fijas a la membrana celular. Varios reguladores actúan a nivel de las convertasas de C3 (C4b2a y C3bBb), se unen a C4b o C3b evitando la formación de las convertasas, facilitan el desensamble de las convertasas, y actúan como cofactores de la proteasa de serina Factor I para la inactivación de C3b y C4b. La regulación se completa con el decaimiento espontáneo de las proteínas activadas y complejos enzimáticos debido a que poseen una vida corta. En el Cuadro 1, se muestran las proteínas reguladoras del complemento, donde el Factor H es el más potente inhibidor de la vía alterna del complemento, así como el más estudiado (Ferreira y col., 2010; Bajic y col., 2015).

| <b>Reguladores del complemento presentes en la membrana celular</b> |                       |                      |   |
|---|-----------------------|----------------------|---|
| <b>Regulador</b>  | <b>Vía que regula</b> | <b>Ligando</b>       | <b>Función</b>  |
| CR1<br>(CD35)   | C3                    | C3b, iC3b, C4b y C1q | Limpieza de complejos inmunes, inducción de fagocitosis, acelerador de decaimiento de convertasas, cofactor para Factor I                         |
| DAF<br>(CD55)   | C3                    | C4b2b y C3Bb         | Acelera el decaimiento de la convertasa de C3   |
| MCP<br>(CD46)   | C3                    | C3b y C4b            | Acelerador de decaimiento de convertasas, cofactor para Factor I  |
| Protectina<br>(CD59)  | MAC                   | C8                   | Inhibe el ensamble y formación de MAC   |
| <b>Reguladores del complemento solubles</b>                         |                       |                      |   |
| <b>Regulador</b>  | <b>Vía que regula</b> | <b>Ligando</b>       | <b>Función</b>  |
| Factor H<br>(FHL-1 y FHR-1 a 5)                                     | Alternativa           | C3b, C3d             | Reconoce superficies propias, acelera el decaimiento de la convertasa de C3/C5, cofactor para Factor I, evita que se forme la convertasa de C3/C5 |
| C4BP  | Clásica y lectinas    | C4b                  | Cofactor para Factor I y acelera el decaimiento de la convertasa de C3, evita que se forme la convertasa de C3                                    |
| Vitronectina<br>(Proteína S)  | MAC                   | C5b-7 y C9           | Evita el ensamble del MAC   |

**Cuadro 1.** Reguladores del sistema de complemento (Liszewski y col., 1996; Zipfel y Skerka, 2009; Ricklin y col., 2010; Bajic y col., 2015).

## Factor H

El Factor H (FH) es una glicoproteína presente en el suero que se produce constitutivamente en el hígado (Ferreira y col., 2010), y puede ser expresada localmente por diferentes células como las células epiteliales de pigmento retinal, células endoteliales, plaquetas, células mesenquimales y túbulos seminíferos (Sakaue y col., 2010), se reportan como valores promedio en el suero humano normal  $442.7 \pm 105.8 \mu\text{g/mL}$  (De Paula y col., 2003), sus variaciones son dependientes de factores genéticos, nutricionales y ambientales (Esparza-Gordillo y col., 2004).

La regulación de la vía alterna del complemento ocurre en el plasma, el FH posee 3 funciones: unirse a C3b, evitando la formación de la convertasa de C3, desplazar Bb de la convertasa de C3 y actuar como cofactor del Factor I, para la hidrólisis de C3b (Ferreira y col., 2010). El FH se une a las células del hospedero y evita la progresión de la activación del complemento por la vía alterna, interactuando con el C3b depositado en las células adyacentes al sitio de activación (Pangburn y col., 2009). Las estructuras que contienen alta cantidad de heparina sulfatada y glucosaminoglicanos (GAG), como el heparán sulfato y dermatán sulfato, fijan más al FH regulando negativamente al complemento (Esparza-Gordillo y col., 2004; Pangburn y col., 2009).

La adquisición del FH por *Pasteurella multocida* le permite regular negativamente el sistema del complemento, como ha sido sugerido para el patógeno *Leptospira*. Las proteínas de *P. multocida* responsables de la captura de los reguladores de complemento podrían ser útiles como antígenos vacunales. Al dirigir la respuesta inmune hacia ellas se podría aumentar la susceptibilidad de *P. multocida* a la acción del complemento evitando así su evasión (Fraga y col., 2014).

## **Medicina preventiva**

Las vacunas vivas atenuadas brindan una buena protección, aunque sólo son serotipo específicas, y además pueden presentar un riesgo sanitario para las unidades pecuarias, pues las cepas vacunales son parcialmente atenuadas y

pueden revertir a la virulencia de las cepas originales (Adler y col., 1999). En conejos, se evaluó una vacuna viva de *Pasteurella multocida* dependiente de estreptomycin, observando inmunidad parcial por los primeros dos meses, posteriormente se observó la presencia de pasteurelisis tanto en los vacunados como en los no vacunados, observando la falta de eficacia en esta vacuna (Deeb y col., 1989). Se estudiaron dos cepas mutantes autotróficas aro-A de *P. multocida* designadas PMP1 (serotipo 1) y PMP3 (serotipo 3) como candidatas vacunales para proteger aves contra el cólera aviar, resultando con una mortalidad >75% tanto en pollos libres de patógenos específicos como en reproductoras comerciales después de 24 horas del desafío, observando una falta adecuada de protección en las especies experimentales (Scott y col., 1999). En pavos de 14 semanas, que fueron vacunados con un cultivo vivo de *P. multocida* en el agua de bebida, dos semanas antes de exponerlas al desafío, la vacuna viva mostró conservar cierta virulencia pues produjo un 4.2% de mortalidad sobre 120 pavos vacunados (Huberman y Terzolo, 2015). Por otro lado, se demostró que la vacunación con el péptido RFHAB2 confiere una protección significativa ( $P < 0.01$ ) contra el desafío experimental (Tatum y col., 2012).

### **Tratamiento**

El tratamiento con antibióticos es muy común y de uso frecuente, dando resultados variables. Mientras que el uso de antibióticos como profilácticos está contraindicado debido a efectos adversos en la microbiota a la selección de cepas resistentes a los antibióticos utilizados; además de la prohibición de su uso semanas previas a su salida al mercado para evitar su presencia en los productos de consumo humano. La administración de antibióticos en dosis preventivas en el alimento balanceado, reduce sensiblemente su eficacia. Como es sabido, la resistencia genética de las bacterias a los antibióticos puede ser transferida de manera horizontal y vertical entre ellas, aunque no pertenezcan a la misma especie bacteriana. Se ha detectado en cepas de *P. multocida* un plásmido denominado pVM111 que confiere multi-resistencia a sulfonamidas, a estreptomycin y a tetraciclina. La resistencia

antimicrobiana en *P. multocida* cambia a través del tiempo y está asociada a los antimicrobianos utilizados en la zona (Kehrenberg y col., 2003).

## Justificación

Existen pocos estudios sobre los mecanismos del sistema del complemento para eliminar las bacterias del género *Pasteurella*. Hasta la fecha, se ha demostrado que las cepas de *Pasteurella multocida* que son resistentes al complemento, son más virulentas, dos diferentes cepas de *P. multocida* PBA 1514 (capsulada) y PBA 875 (mutante sin cápsula), mostraron una sobrevivencia del 64% y 42%, respectivamente, en la presencia de suero bovino fresco normal, en comparación con suero bovino inactivado (100%) después de 4 horas de incubación (Boyce y Adler, 2000).

Sahagún y col., 2014, observaron que *Rodentibacter pneumotropicus* (antes *P. pneumotropica*) tuvo una sobrevivencia de 50%, cuando se incubó con suero humano normal (SHN) durante 30 minutos. Se probó que la bacteria no sobrevivía en suero carente de Factor H, pero si sobrevivía al reconstituirlo de manera dosis dependiente. Por lo que las proteínas bacterianas de unión al regulador del complemento FH son críticas para la sobrevivencia de la bacteria. Aún no se conoce que proteínas están involucradas en la captura del Factor H en esta bacteria (Sahagún-Ruiz y col., 2014).

Por lo anterior, la identificación de proteínas de *Pasteurella multocida* que capturan el FH, podría contribuir al conocimiento de los mecanismos de evasión del complemento por la bacteria y dichas proteínas podrían ser la base para el desarrollo de inmunógenos como alternativas de prevención de la pasteurelisis.

**Hipótesis**

*Pasteurella multocida* tipo A tiene proteínas que capturan el Factor H del sistema del complemento.

**Objetivo General**

Identificar proteínas de *Pasteurella multocida* que capturan el FH del sistema del complemento.

## **Material y Métodos**

### **Suero humano normal**

El suero humano normal (SHN) se obtuvo a partir de muestras de sangre de personas anónimas. Se colectaron 10 mL de sangre sin anticoagulante de voluntarios adultos sanos, los cuales firmaron de manera individual un consentimiento informado.

Posteriormente, la sangre se mantuvo a 4°C permitiendo la formación del coágulo. El suero se separó de la sangre por centrifugación a 2,380 XG por 10 min a 4°C, se obtuvieron 5 mL aproximadamente de suero por muestra de cada persona y finalmente los sueros de 6 personas se juntaron en un tubo de 50 mL y la mezcla se dividió en alícuotas de 500 µL, que fueron congeladas a -80°C hasta su uso. Como control se utilizó suero humano normal inactivado por calor (SHIC) 30 minutos a 56°C.

### **Cultivo bacteriológico**

La cepa de *Pasteurella multocida* tipo A fue aislada a partir de un hisopado nasal de una coneja que presentaba semiología compatible con neumonía productiva remitida al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. La identificación del aislado en cultivo puro se realizó mediante la caracterización de técnicas de identificación fenotípica estándar, tales como oxidasa, agar TSI, motilidad, glucosa, indol, urea y citrato de Simmon y para la identificación del serotipo se hicieron las pruebas de hialuronidasa y acriflavina siguiendo las metodologías descritas por Koneman y Allen (2008).

### **Prueba de supervivencia**

Para los ensayos de supervivencia, la bacteria se subcultivó en agar sangre (AS) por 24 h, posteriormente una colonia fue inoculada en caldo infusión cerebro corazón (CICC) durante 16 h a 37 °C con agitación a 185 rpm hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.43 a 600 nm (aproximadamente  $3.42 \times 10^8$

bacterias/mL). Posteriormente el cultivo fue centrifugado a 4,400 XG a 21 °C por 15 min, el sedimento bacteriano se lavó una vez con solución salina de fosfatos (PBS) y se ajustó a  $1 \times 10^3$  bacterias/tubo.

Para los ensayos de supervivencia, las bacterias fueron incubadas en tubos con 40% SHN (con complemento activo) o con SHIC (con complemento inactivo) a 37°C por 30 min bajo agitación de 190 rpm. Después el cultivo se centrifugó a 5,500 XG decantando el sobrenadante, la pastilla fue suspendida en 100 µL de PBS, se realizaron diluciones decuples hasta  $10^{-4}$ , para sembrar por extensión en AS por triplicado incubando a 37 °C por 18 h. Para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC), se calculó el porcentaje de supervivencia considerando el número de colonias obtenidas tras la incubación con SHIC como el 100% de supervivencia.

### **Captura del Factor H por *Pasteurella multocida* tipo A**

El cultivo se cuantificó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan GO, Waltham, MA, Estados Unidos) utilizando una longitud de onda de 600 nm. La concentración fue ajustada a  $2 \times 10^8$  bacterias/mL. El cultivo fue lavado en PBS pH 7.4 a 21°C, centrifugando a 11,600 XG por 15 min. La suspensión bacteriana fue incubada con 40% de SHN en PBS o sólo PBS, durante 15 min a 37°C. Enseguida, la suspensión fue lavada 3 veces con 500 µL de PBS, pH 7.4, centrifugando a 11,600 XG por 10 min a 10°C, retirando el sobrenadante y homogenizando en un agitador. La pastilla fue resuspendida en 100mM de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9.6 y fijada por duplicado ( $1 \times 10^8$ / pozo) a la placa de ELISA de alta afinidad por 16 h a 4°C. Posterior a la incubación, la placa se lavó 3 veces con PBS + 0.05% Tween 20 (PBS – T), 200µL/ pozo. Para evitar interacciones inespecíficas del anticuerpo, se realizó el bloqueo con 3% de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS-T (200µL /pozo), durante 1 h a 37°C. La placa fue lavada 1 vez con PBS-T y se incubó con el anticuerpo policlonal de oveja anti-Factor H humano (1:5,000) por 1 h a 37°C (ABcam, Cambridge, Reino Unido). Después de la incubación, la placa fue lavada 3 veces con 200 µL de PBS pH 7.4 e incubada con el anticuerpo de conejo anti-IgG

de oveja conjugado con peroxidasa (1:10,000) por una 1 h a 37°C (ABcam, Cambridge, Reino Unido). Después de la incubación, la placa fue nuevamente lavada tres veces con PBS – T. Finalmente se agregó 0.015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0.004% de OPD (1,2-ortho-phenylenediamine dihydrochloride Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unidos) en amortiguador citrato fosfato pH 5. La reacción fue detenida con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Como control negativo se utilizó una suspensión bacteriana no tratada con suero, incubada con el anticuerpo primario y secundario. Como control del Factor H se utilizó SHN fijado en la placa (40% en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 100 mM pH 9.6) y PBS como su control negativo. Las placas fueron leídas a 492 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan GO, Waltham, MA, Estados Unidos).

### **Identificación de proteínas de *Pasteurella multocida* que capturan el Factor H**

#### **Preparación de la muestra**

La cepa de *P. multocida* tipo A fue inoculada en agar sangre e incubada a 37 °C toda la noche, posteriormente se tomó una colonia y se inoculó en 500 mL de caldo infusión cerebro corazón (CICC) y fue incubada toda la noche a 37°C. Se centrifugó a 3,500 XG durante 15 min. Después, el sobrenadante se retiró y la pastilla bacteriana se lavó con 15 mL de PBS pH 7.4, centrifugando a 3,500 XG por 15 min a 4°C.

#### **Cuantificación de la muestra**

La pastilla bacteriana fue sonicada por 4 ciclos de 30 segundos a una amplitud de 9.2 Hz , siempre mantenida en hielo. La concentración de proteína de la muestra se determinó mediante el método de Bradford, en placa de 96 pozos. Las lecturas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan GO, Waltham, MA, Estados Unidos) y se compararon con una curva de referencia con concentraciones de 1 – 12 µg/µL de albúmina sérica bovina.

## **SDS-PAGE**

Para la identificación de proteínas de *Pasteurella multocida* se realizó la electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12% (cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Cell de Bio-Rad Laboratories Inc) sumergidos en una solución de corrida (tris-glicina-SDS). Las muestras de trabajo se prepararon con amortiguador Laemmli 2X en una proporción 1:1 y se mantuvieron en ebullición durante 5 min. La electroforesis se realizó a 50V en el gel concentrador y 100V en el gel separador. Se prepararon dos geles idénticos, para uno se tiñó con azul de Coomasie y otro se utilizó en el ensayo de inmunotransferencia tipo Western blot (WB).

### **Tinción con azul de Coomasie**

El gel con las proteínas se tiñó con una solución de azul de Coomasie (BioRad) durante 2 h y después se sumergió en solución desteñidora (10% ácido acético, 30% metanol y 60% agua destilada), realizando varios cambios hasta que las bandas fueron visibles. Se desechó la solución y se lavó el gel varias veces con agua destilada.

### **Electrotransferencia**

Una membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel y el mismo gel de poliacrilamida se sumergieron durante 30 min en amortiguador de Towbin frío. Las esponjas del equipo de electrotransferencia y el papel filtro también se humedecieron en el mismo amortiguador antes de ensamblar todos los componentes. El ensamblaje del sistema de transferencia se realizó en un recipiente de plástico conteniendo el amortiguador Towbin frío en el siguiente orden: En contacto con la tapa negra se colocó una esponja, encima de ésta se colocó una hoja de papel filtro previamente humedecido en Towbin, luego se colocó el gel y sobre éste se colocó la membrana de nitrocelulosa; otra hoja de papel filtro humedecida se colocó encima de la membrana y por último se colocó la otra esponja, cerrando el sistema perfectamente para ser colocado dentro de la cámara de electrotransferencia. La transferencia se

realizó durante 1 h a 100V.

### **Inmunodetección de la captura del Factor H**

Posteriormente se realizó la inmunodetección tipo Western blot superpuesto. La membrana se bloqueó mediante una incubación de 2 horas en agitación orbital a 15 rpm a TA en una solución de PBS-T 0.05% y 10% de leche descremada. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 hora en suero humano 20% en agitación orbital a 15 rpm a TA. Después de la incubación, la membrana se lavó 4 veces en PBS-T durante 5 min cada lavado, en agitación orbital a 15 rpm a TA. Enseguida, la membrana se incubó con el anticuerpo de oveja policlonal anti Factor H, durante 1 hora, diluido 1:5,000 en PBS-T y 5% de leche descremada. Después de 4 lavados, se incubó con el anticuerpo secundario de conejo, anti-IgG de oveja conjugado con peroxidasa (diluidos 1:10,000) a 37°C por 1 h. Finalmente, después de 4 lavados, la membrana se colocó en una solución de revelado de 4 -cloro naphthol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> manteniéndose en agitación orbital a 15 rpm a TA, protegida de la luz, hasta observar la reacción de detección. La reacción se detuvo mediante un enjuague final en agua destilada, la membrana se secó en papel filtro y las imágenes de las reacciones de inmunodetección se registraron en fotografía digital.

### **Electroforesis Bidimensional**

#### **Precipitación de proteína**

Se utilizaron  $1 \times 10^8$  de una suspensión de bacterias sonicadas en 130  $\mu$ L PBS, a los cuales se les agregaron 800  $\mu$ L de acetona grado molecular (proporción 1:4), la mezcla se mantuvo a -20°C por 2 h, posteriormente se centrifugó la mezcla a 11,600 XG por 10 min a 4°C. Después se decantó la acetona y se dejó secar el precipitado mediante evaporación.

#### **Isoelectroenfoque**

A la muestra, se le adicionaron 250  $\mu$ L de buffer de rehidratación (8M Urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% [w/v] Bio-Lyte™ 3-10 anfolitos y trazas de azul de

bromofenol) y se homogenizó. Después, se tomaron 125  $\mu$ L de esta suspensión y se colocaron en un canal de un recipiente de 10 canales y los otros 125  $\mu$ L en otro canal, distribuido a lo largo. Se utilizó una tira por canal IPG de 7 cm para isoelectroenfoque con rangos de pH de 3-10 (ReadyStrip™ IPG strip-BioRad), adicionándoles al final 700  $\mu$ L de aceite mineral estéril, se incubó a temperatura ambiente durante 16 h. Transcurrido el tiempo, se colocaron dos receptáculos de sales humedecidos con 8  $\mu$ L de agua nanopura, cada uno en un extremo de los carriles utilizados, en la cámara de isoelectroenfoque.

Posteriormente, las tiras se colocaron en la cámara y se adicionaron 700  $\mu$ L de aceite mineral, el equipo fue configurado como se indica abajo:

| Tamaño de la Tira= 7 cm | Voltaje | Tiempo | Voltaje- H | Rampa  |
|-------------------------|---------|--------|------------|--------|
| Paso 1                  | 250     | 20 min | ---        | Lineal |
| Paso 2                  | 4000    | 2 h    | ---        | Lineal |
| Paso 3                  | 4000    | ---    | 10,000     | Rápido |
| Total                   |         | 5 h    | 14,000     |        |

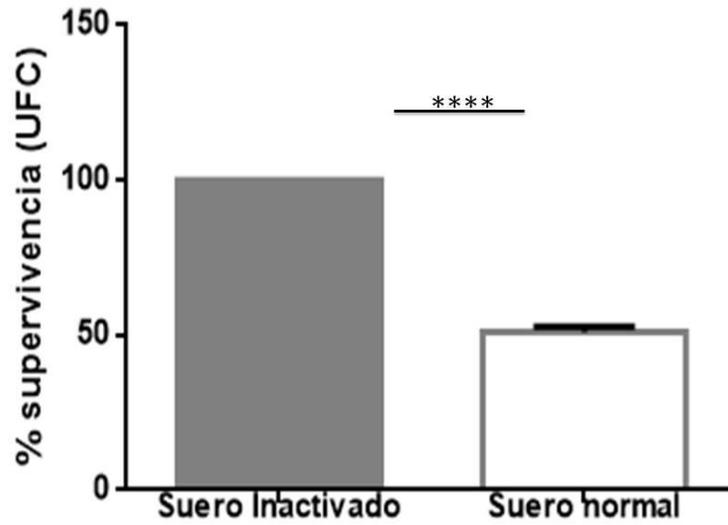
Durante el tiempo que transcurrió el isoelectroenfoque, se prepararon dos geles SDS-PAGE 12% (solo gel separador), para realizar la electroforesis. Una vez finalizado el proceso de isoelectroenfoque, las tiras fueron equilibradas durante 10 minutos en 1 mL de buffer I (6M Urea, 2% SDS, 0.375 M Tris – HCl [pH 8.8], 20% glicerol y 2%[w/v]DTT) y después en 1 mL de buffer II (6M Urea, 2% SDS, 0.375 M Tris – HCl [pH 8.8] y 20% glicerol), durante 10 minutos. Al término del proceso, las tiras fueron colocadas en el gel SDS-PAGE 12%. La electroforesis se realizó a 70V con una solución de corrida (tris-glicina-SDS). Al finalizar, uno de los geles se tiñó con una solución de azul de Coomassie (BioRad) durante 2 h y después se sumergió en solución desteñidora, realizando varios cambios hasta que las proteínas fueron visibles. Se desechó la solución y se lavó el gel varias veces con agua destilada. El otro gel fue utilizado para electrotransferencia, usando una membrana de PVDF. La transferencia se realizó durante 1 h a 100V (Zhang y Lu, 2007; Li y col., 2015).

Posteriormente, se realizó la inmunodetección tipo Western blot superpuesto, como se describió previamente. Para la identificación de proteínas que se unieron al FH, se utilizó un software para la detección de las manchas de proteínas en todas las réplicas, y la detección mejoró mediante la adición manual de las manchas omitidas y la eliminación de las manchas detectadas incorrectamente. La normalización de las imágenes de gel se realizó utilizando el método de normalización del modelo de regresión local proporcionado por el software PD-Quest®. Para comparar adecuadamente las muestras, las imágenes de gel se ajustaron a un modelo de distorsión común; esto se realizó haciendo coincidir puntos que eran comunes a todas las imágenes de gel. Las imágenes de gel de las diferentes muestras de proteínas se compararon entre sí para generar un conjunto de datos sólido que contenía todos los puntos representados en las muestras con un 98 % de confianza estadística ( $P < 0.01$ ) en una prueba t de Student. Por último, se seleccionaron los puntos de proteína en el conjunto de datos estadísticos que mostraban un cambio de abundancia de  $\pm 2$  veces y luego se sometieron a identificación por espectrometría de masas (MS), esto se realizó en Ciencias Genómicas de la UNAM. Los resultados de las pruebas fueron analizados utilizando media, rango y desviación estándar, también se compararon mediante la prueba ANOVA de una vía donde un valor  $P < 0.05$  se interpretó como significativo. Lo anterior fue realizado usando el programa GraphPad Prism versión 6.0.0 para Windows (GraphPad Prism, 2012).

## Resultados

### Supervivencia de *Pasteurella multocida* al complemento

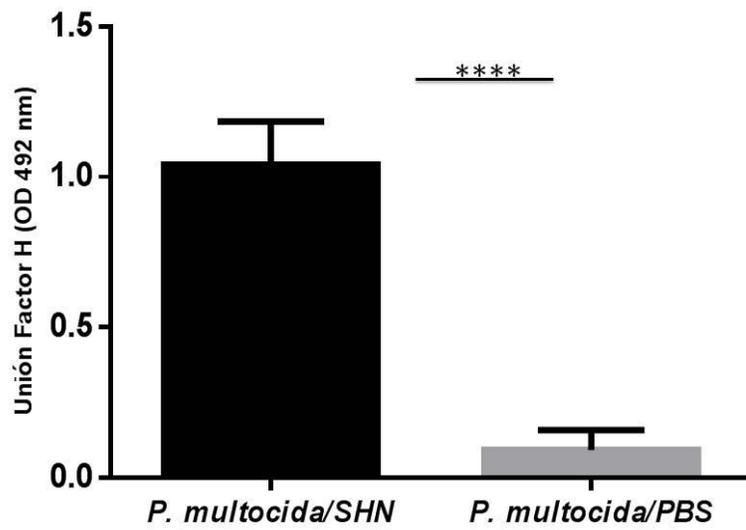
El efecto del sistema del complemento en *P. multocida* fue evaluado tras la incubación del cultivo bacteriano con SHN o con SHIC al 40 % durante 30 min. En 10 experimentos independientes las bacterias viables fueron cuantificadas, el porcentaje de células supervivientes fue calculado comparando el número de bacterias viables incubadas en los dos tratamientos. Los resultados indican que el sistema del complemento sérico tiene acción bactericida sobre *P. multocida*; el ensayo mostró que el cultivo tratado con el SHN permitió la supervivencia *in vitro* del  $51.07 \pm 1.70$  %, considerando como 100% la sobrevivencia en SHIC ( $P < 0.05$ ) (Figura 2).



**Figura 2. Supervivencia de *Pasteurella multocida* a la acción del sistema del complemento presente en el suero.** A la izquierda se muestra la cantidad de unidades formadoras de colonia (UFCs) de *P. multocida* que desarrollaron después de incubarlas con SHIC y a la derecha al incubarse con SHN. SHIC= suero inactivado a 56 °C durante 30 min. SHN= suero normal (n=10). \*\*\*\*estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

### **Captura del Factor H del sistema del complemento**

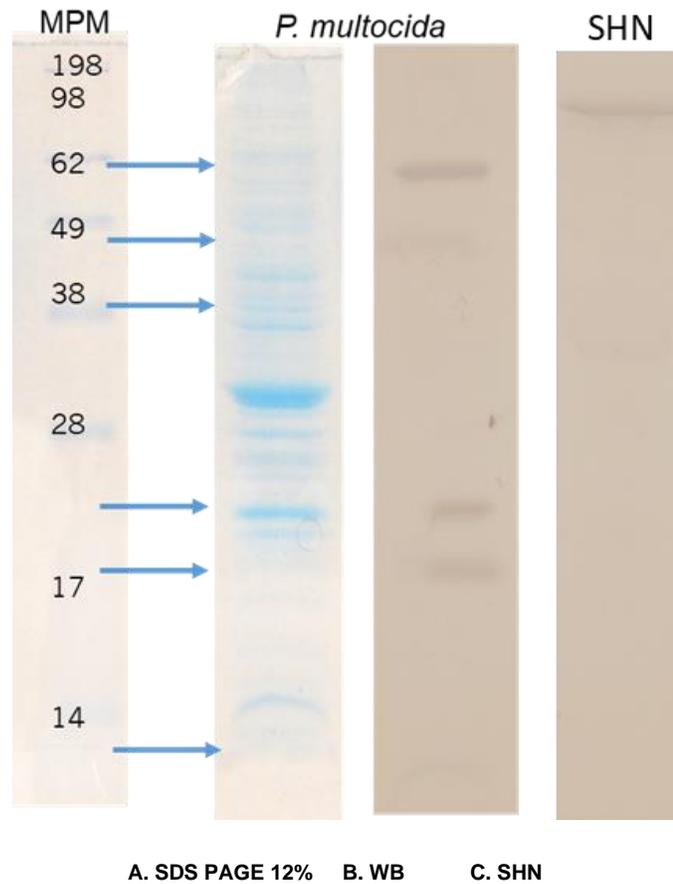
La captura del Factor H sérico del sistema del complemento por *P. multocida* fue evaluado con la prueba de ELISA, tras la incubación del cultivo con SHN 40%. Observando ambas barras, se muestra que si hay una importante interacción de la bacteria con el Factor H del sistema del complemento ( $p < 0.05$ ), comparado con el control negativo (sin suero) demostrando que la bacteria si es capaz de capturar al Factor H del sistema del complemento (Figura 3).



**Figura 3. Captura de FH de suero por *Pasteurella multocida* tipo A.** *P. multocida* lavada y fijada por duplicado a una placa de ELISA se incubó con 40% de SHN. La barra negra muestra la captura del Factor H del suero por *P. multocida*, con respecto al control negativo que es la bacteria incubada con PBS (sin suero) \*\*\*\*estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

### **Inmunodetección de la captura del Factor H por proteínas de *Pasteurella multocida* mediante *Western blot***

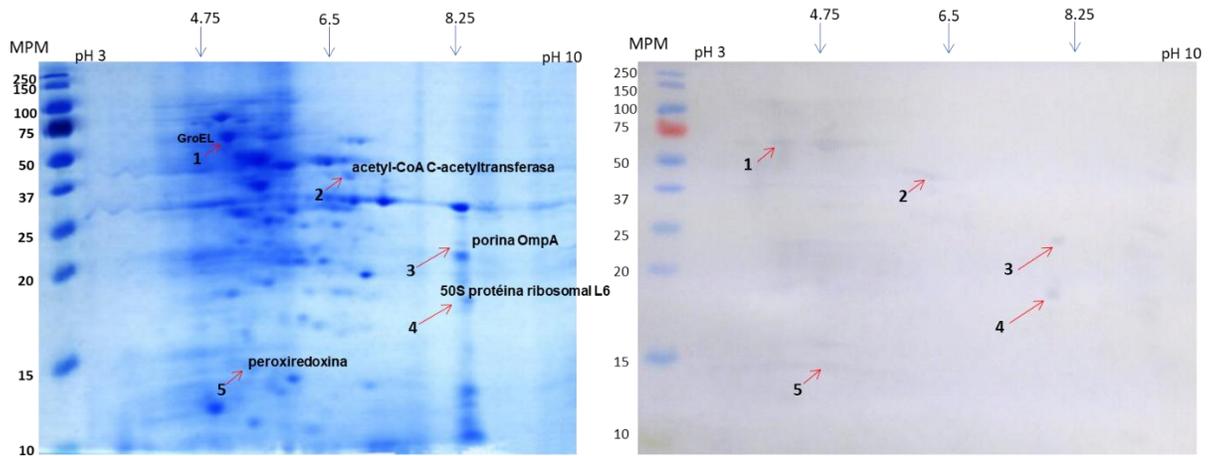
Las proteínas de la bacteria fueron resueltas mediante SDS-PAGE 12% y teñida con azul de Coomasie para obtener un perfil electroforético. Los resultados indican la presencia de bandas de diferentes tamaños que abarcan desde los 198 kDa hasta menos de 14 kDa (Figura 4A). Posteriormente, para identificar bandas que capturan al Factor H sérico del sistema del complemento, se realizó una inmunodetección tipo Western blot superpuesto (SHN como fuente de FH), utilizando un anticuerpo policlonal anti Factor H, donde se observó la presencia de 6 bandas con diferentes pesos moleculares que iban de 14 a 70 kDa (Figura 4B).



**Figura 4. Detección de proteínas de *Pasteurella multocida* que capturan Factor H.** **A.** Gel de poliacrilamida-SDS 12% teñido con Azul de Coomassie, permite ver las diferentes bandas de proteínas presentes en la fracción de la pastilla del cultivo. **B.** Bandas que capturan el Factor H sérico del sistema del complemento presentes en el suero humano normal (SHN) detectadas por inmunotransferencia tipo Western blot (WB). **C.** Control positivo suero humano normal

### **Identificación de proteínas de *Pasteurella multocida* que capturan al Factor H**

Para la identificación de las proteínas que son capaces de capturar al Factor H sérico del sistema del complemento, se utilizaron 130 µg de *P. multocida* sonicada para separar sus proteínas en geles de doble dimensión 2D-PAGE 12% con base en su punto isoeléctrico (IP) y peso molecular, para así obtener las manchas para su identificación. Posterior a la tinción del gel con azul de Coomasie se observaron múltiples puntos y para confirmar la captura del Factor H sérico, se realizó una inmunodetección tipo Western blot superpuesto (SHN como fuente de FH) utilizando un anticuerpo policlonal anti-Factor H y uno secundario marcado con peroxidasa. Se observaron 5 puntos, de diferentes pesos moleculares, 57, 41, 38, 18 y 22 kDa. (Figura 5).



**Figura 5. Electroforesis bidimensional teñido con azul de Coomasie y WB superpuesto de *Pasteurella multocida*.** Proteínas que capturan Factor H sérico, se aprecian 5 manchas correspondientes a proteínas de diferente peso molecular, 57, 41, 38, 18 y 22 kDa.

## **Identificación de las proteínas de *Pasteurella multocida* que capturan al Factor H por análisis de espectrofotometría de masas**

Una vez identificadas en la inmunotransferencia tipo Western, las manchas positivas ante la captura del Factor H sérico por *P. multocida*, se recortaron del gel de acrilamida y se enviaron para su análisis por espectrofotometría de masas. Los resultados identificaron las proteínas GroEL con un peso de 57 kDa, acetil CoA-acetiltransferasa con un peso de 41 kDa, de una porina OmpA con un peso de 38 kDa, de la proteína L6- 50S ribosomal de 18 kDa y de una peroxiredoxina de 22 kDa, con base en los péptidos identificados y encontrados en secuencias de proteínas por BLAST en bases de datos (NCBI, NLM-NIH) como se muestran en la Figura 6. Asimismo, en el Cuadro 2, se pueden apreciar las características de las diferentes proteínas, se muestran los números de identificación (ID acceso) identificada en la base de datos, el punto isoeléctrico, peso molecular, aminoácidos, familia de la proteína y su ontología.

### GroEL (WP\_014325704)

|     |                        |                    |                   |                    |                   |
|-----|------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| 1   | MKKTAI <del>ALTI</del> | AALAAASVAQ         | AAPQPNTFYV        | GAK <b>AGWASFH</b> | <b>DGLNQVKDMT</b> |
| 51  | VSNATLGFKR             | NSVTYGVFVG         | YQITDNFAVE        | LGYYDFGRAK         | LRMAEKDQKA        |
| 101 | KDAAK <b>HTNHG</b>     | <b>AHLSLKASYP</b>  | <b>VLGGLDIYAR</b> | VGAAALIRSDY        | KVYDHSDPAK        |
| 151 | LPQFKRTHST             | QVSPVFAGGL         | EYAFIPELAL        | <b>RVEYQWLNNV</b>  | <b>GKLDKAKGER</b> |
| 201 | <b>VDYRPDIGSV</b>      | <b>TAGLSYRFGQ</b>  | <b>SVYVPEVVSK</b> | <b>TFTLNSDVTF</b>  | <b>GFDKADLKPA</b> |
| 251 | AQNVLDGIYG             | EIAQLK <b>SASV</b> | <b>AVAGYDRLG</b>  | <b>SDAYNLKLSQ</b>  | <b>RRADTVANYL</b> |
| 301 | <b>VAKGVAQNAI</b>      | <b>SATGHGEANP</b>  | <b>VTGNKCDSVK</b> | <b>GRKALIACLA</b>  | <b>DDRRVEIAVK</b> |
| 351 | GNK                    |                    |                   |                    |                   |

### Acetyl CoA-acetiltransferasa (WP\_126374074.1)

|     |                   |                    |                   |                    |                    |
|-----|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 1   | <b>MREVVIVSAV</b> | RTAIGSFGGS         | <b>LKNVPAVDLG</b> | <b>ATVIEEAVKR</b>  | AGIKPEMVVEE        |
| 51  | VVMGNVIQAG        | LGQNVARQAT         | IKAGLPEEVP        | AMTINKVCGS         | GLR <b>TVALAAQ</b> |
| 101 | <b>MIKAGDADII</b> | VAGGMESMSQ         | APYLLKTARW        | GQRMGDGKMV         | DAMINDSLWD         |
| 151 | AFNNYHMGVT        | AENIAK <b>QWNL</b> | <b>TREEQDQFAL</b> | QSQLKAEKAV         | KEGR <b>FKDEIV</b> |
| 201 | <b>PVVIPQRKGE</b> | <b>PVVFDTDEFP</b>  | <b>RFGSTIEGLS</b> | <b>KLRPAFIKDG</b>  | TVTASNAGSI         |
| 251 | NDGAAAFVVM        | SAEKAESLGL         | KPMAKILSYG        | SKGLDPAIMG         | YGFPHATKKA         |
| 301 | LEGTGLTDD         | MDLIEANEAF         | AAQSLAVAKD        | LKFDMSK <b>VNV</b> | <b>NGGAIALGHP</b>  |
| 351 | <b>VGASGARILV</b> | TLLYEMQKRD         | AKKGLATLCI        | GGGMGTALIV         | ER                 |

### Porina OmpA (WP\_014391196.1)

|     |                        |                    |                   |                    |                   |
|-----|------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| 1   | MKKTAI <del>ALTI</del> | AALAAASVAQ         | AAPQPNTFYV        | GAK <b>AGWASFH</b> | <b>DGLNQVKDMT</b> |
| 51  | VSNATLGFKR             | NSVTYGVFVG         | YQITDNFAVE        | LGYYDFGRAK         | LRMAEKDQKA        |
| 101 | KDAAK <b>HTNHG</b>     | <b>AHLSLKASYP</b>  | <b>VLGGLDIYAR</b> | VGAAALIRSDY        | KVYDHSDPAK        |
| 151 | LPQFKRTHST             | QVSPVFAGGL         | EYAFIPELAL        | <b>RVEYQWLNNV</b>  | <b>GKLDKAKGER</b> |
| 201 | <b>VDYRPDIGSV</b>      | <b>TAGLSYRFGQ</b>  | <b>SVYVPEVVSK</b> | <b>TFTLNSDVTF</b>  | <b>GFDKADLKPA</b> |
| 251 | AQNVLDGIYG             | EIAQLK <b>SASV</b> | <b>AVAGYDRLG</b>  | <b>SDAYNLKLSQ</b>  | <b>RRADTVANYL</b> |
| 301 | <b>VAKGVAQNAI</b>      | <b>SATGHGEANP</b>  | <b>VTGNKCDSVK</b> | <b>GRKALIACLA</b>  | <b>DDRRVEIAVK</b> |
| 351 | GNK                    |                    |                   |                    |                   |

### Proteína L6 50S ribosomal (WP\_005724018.1)

|     |                    |                   |                   |                    |                   |
|-----|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| 1   | MSRVAK <b>APVS</b> | <b>IPAGVEVKLD</b> | <b>GQLLTVKGKN</b> | GELSR <b>TIHNA</b> | <b>VEVKQDNNEI</b> |
| 51  | <b>TFSREGIVG</b>   | <b>ADAQAGTARA</b> | <b>LVNAMVIGVT</b> | <b>EGFTKKLQLV</b>  | <b>GVGYRAQMKG</b> |
| 101 | NVVALSLGFS         | HPVEHALPAG        | ITAECPSQTE        | IVLKGADK <b>QL</b> | <b>IGQVAADIRA</b> |
| 151 | <b>YRRPEPYKGG</b>  | GVR <b>YAEVVR</b> | IKEAKKK           |                    |                   |

### Peroxisredoxina (WP\_005716614.1)

|     |                    |                   |                    |                    |                   |
|-----|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| 1   | MVLVTR <b>QAPD</b> | <b>FTAAAVLGNG</b> | <b>EIVDNFNFKQ</b>  | HIAGKAAVVF         | FYPLDFTFVC        |
| 51  | PSELIAFDHR         | <b>YEEFQKRGVE</b> | VVGISIDSEF         | SHNAWR <b>KTPV</b> | <b>ENGGIGEVKY</b> |
| 101 | <b>ALVADIKHEI</b>  | AQAFGIEHPE        | AGVALR <b>ASFL</b> | <b>IDKDGVVRHQ</b>  | <b>VVNDLPLGRN</b> |
| 151 | <b>IDEMLRMVDA</b>  | LQFHEEHGDV        | CPAQWEKGKE         | GMTGSPEGVA         | KYLKQHADQL        |

**Figura 6. Secuencias de péptidos de las proteínas de *Pasteurella multocida* que capturan el Factor H del sistema del complemento.** En rojo se muestran los péptidos obtenidos por la espectrofotometría de masas que coinciden con las secuencias de las proteínas GroEL, Acetyl CoA-acetiltransferasa, porina OmpA, Proteína L6 50S ribosomal y peroxiredoxina, los aminoácidos detectados se encuentran distribuidos en las secuencias de cada proteína.

| Número de spot | PI <sup>1</sup> / PM <sup>2</sup> /AA <sup>3</sup> | ID/Especie                             | Familia de la proteína                    | Genontología   |
|----------------|--|--|---|--|
| 1              | 4.8/57/544   | WP_014325704/<br><i>P. multocida</i>   | Chaperonina GroEL                         | Complejo de chaperonina bacteriana que consta de una subunidad de chaperonina heptamérica GroES de 10 kDa y una subunidad de chaperonina tetradecamérica (2x7) de 60 kDa GroEL. La subunidad de 60kDa posee actividad ATPasa mientras que la holoenzima es responsable del correcto plegamiento de las proteínas |
| 2              | 6.8/41/393   | WP_126374074.1/<br><i>P. multocida</i> | Acetyl-CoA C-acetyltransferasa            | Catálisis de la reacción: 2 acetil-CoA = CoA + acetoacetil-CoA.  |
| 3              | 8.2/38/353   | WP_014391196.1/<br><i>P. multocida</i> | Porina OmpA                               | Parte externa de la pared celular y/o membrana externa   |
| 4              | 8.2/18/177   | WP_005724018.1/<br><i>P. multocida</i> | Proteína L6 de la subunidad 50S ribosomal | Subunidad mayor del ribosoma ubicado en el citosol   |
| 5              | 4.9/22/200   | WP_005716614.1/<br><i>P. multocida</i> | Peroxiredoxina C                          | Descomposición del peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) de las reacciones químicas   |

**Cuadro 2. Identificación de las diferentes proteínas de *P. multocida* que capturan al Factor H sérico del sistema del complemento.** Manchas de proteínas obtenidas mediante 2D-PAGE. Se muestran los accesos identificados de la base de datos (NCBI, National Library of Medicine NIH), el punto isoeléctrico, peso molecular, aminoácidos, familia de la proteína y su ontología.

## Discusión

El sistema del complemento juega un rol importante para la defensa de los organismos contra patógenos. La acción que tiene el sistema del complemento sobre *Pasteurella multocida* es poco conocida, los estudios previos demostraron una actividad relevante sobre cepas resistentes (Boyce y Adler, 2000).

En cepas virulentas de *P. multocida*, se demostró que la resistencia al complemento se asocia a la presencia de cápsula, ya que se observó que una cepa que espontáneamente dejó de producir cápsula se volvió susceptible al complemento y avirulenta en comparación con una cepa virulenta, que sí mostró una resistencia a la acción bactericida del suero (Snipes y col., 1985). Boyce y Adler (2000), demostraron también que una cepa mutante de *P. multocida* acapsular fue fagocitada, mientras que la cepa silvestre evadió la fagocitosis. *Rodentibacter pneumotropicus* sobrevive en un 50% cuando se incuba con SHN, por lo que *R. pneumotropicus* ha desarrollado mecanismos para evadir el sistema del complemento humano que pueden aumentar la eficiencia para acceder y colonizar los tejidos internos donde puede causar infecciones graves (Sahagun-Ruiz y col., 2014). En nuestro estudio se demostró el efecto del sistema del complemento en *P. multocida* tras la incubación del cultivo bacteriano con SHN o con SHIC al 40 % durante 30 min. Los resultados indican que el sistema del complemento sérico tiene acción bactericida sobre *P. multocida*; el ensayo mostró que el cultivo tratado con el SHN permitió la supervivencia *in vitro* del  $51.07 \pm 1.70$  %, con respecto al SHIC. Además de la cápsula, otro mecanismo de evasión del complemento es a través de la captura de reguladores negativos solubles del huésped (Lambris y col., 2008; Blom y col., 2009). Dichos reguladores se encuentran involucrados en el control del sistema del complemento, vía alterna (FH), vía clásica y vía de las lectinas (C4BP), tal y como se ha estudiado en otras bacterias, tales como *Bordetella pertussis*, que tiene la capacidad de capturar tanto al FH como al C4BP (Amdahl y col., 2011), *Histophilus somni* que captura al FH (Inzana y col., 2012), *Escherichia coli* captura al FH (Tan y col., 2011), *Leptospira interrogans* captura a FH y C4BP (Barbosa y col., 2009, Moreno-Torres y col., 2019), entre otras. En el caso de bacterias de la

familia Pasteurellaceae, *R. pneumotropicus* es capaz de capturar los reguladores negativos, FH y C4BP, permitiendo la inactivación de las 3 vías del sistema del complemento, y es incapaz de sobrevivir al suero carente del Factor H; por lo que las proteínas de unión a reguladores del complemento son críticas para su supervivencia en suero (Sahagún-Ruiz y col., 2014). En nuestro estudio se demostró una supervivencia del 51% de *Pasteurella multocida* en presencia de SHN, considerando como 100% la supervivencia en SHIC. Esta supervivencia es probablemente debida a la captura del Factor H por *P. multocida* el cual fue evaluado tras la incubación del cultivo con SHN 40%, observando una importante interacción entre la bacteria con el Factor H del sistema del complemento, comparado con el control negativo sin SHN. Al confirmar que *P. multocida* es capaz de capturar al FH del sistema del complemento, el siguiente paso es saber que proteínas son responsables de la captura, por lo que se identificaron 5 probables proteínas mediante el uso de SD-PAGE 2D / Western blot superpuesto y espectrofotometría de masas.

Dentro de las proteínas identificadas como responsables de la captura del Factor H en nuestro estudio, se encuentra GroEL, esta proteína se clasifica como una chaperona molecular, es multimérica de un peso molecular cercano a los 70 kDa con una estructura en forma de doble anillo. GroEL se encarga de mediar la conformación de las proteínas evitando su plegamiento durante la síntesis o la translocación, mediando la liberación gradual de ATP que da como resultado un plegamiento adecuado (Henderson y col., 2013; Gruber y Horovitz, 2016; Ishi, 2017). GroEL posee 3 dominios definidos: Un dominio apical, este posee una agrupación de residuos hidrófobos involucrados en el reconocimiento de los péptidos en su entorno. Un dominio ecuatorial, éste acoge al sitio de unión de ATP y por último un dominio intermedio pequeño y flexible, que establece una comunicación de señales entre ambos dominios (Cuéllar y col., 2008; Thirumalai y col., 2020); además se expresa en la superficie de *Mycoplasma pneumoniae*, teniendo la función de adhesión e invasión a la célula hospedera (Clark y Tillier, 2010; Hagemann y col., 2017). En el caso de *Bacillus anthracis*, se une débilmente

a plasminógeno (Chung y col., 2011) por lo que las funciones de adhesión y reconocimiento de esta proteína nos hace pensar que podría tener un papel importante en el reconocimiento del Factor H del sistema del complemento humano. Quan y col. (2017), identificaron que GroEL de *Streptococcus suis* también interactúa con el Factor H. GroEL contribuye a la adhesión de *Leptospira* spp sobre los tejidos del huésped y estimula la producción de citocinas durante la infección, también se secreta extracelularmente y se expone en la superficie de la bacteria (Ho y col., 2021).

Los microorganismos cuando entran al huésped, ya sea por vía oral, respiratoria o mucosas, se exponen a un entorno diferente, que incluye cambios de temperatura, presión osmótica, pH, entre otros, por lo que responden aumentando la expresión de factores de virulencia para ayudar en la adherencia bacteriana, invasión o evasión inmune. Las proteínas de respuesta al estrés, como las proteínas de choque térmico y las chaperonas, son algunas de las proteínas que sufren cambios en los niveles de expresión y/o cambios en la localización celular desde el citosol hasta la superficie celular. La proteína chaperona GroEL, se reubica en la superficie celular o se secreta durante la invasión y, por lo tanto, el sistema inmunitario del huésped puede reconocerla como antígeno (Fourie y Wilson, 2020).

Otra de las proteínas de captura del Factor H que fue identificada en nuestro estudio fue OmpA. Las proteínas de membrana OmpA son unas porinas modificables por el calor, expuestas a la superficie celular, se encuentran en bacterias Gram negativas y tiene un peso molecular de 35.159 kDa, y están expuestas en la superficie celular. Están caracterizadas por un dominio N-terminal que forma un barril  $\beta$  antiparalelo de ocho hojas plegadas, que se encuentra incrustado en la membrana externa, y en el periplasma. Las proteínas OmpA se caracterizan por un dominio globular C-terminal. Son necesarias en la biosíntesis y en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa, su dominio globular C-terminal interactúa con la capa de peptidoglicano de la pared celular, proporcionando estabilidad e integridad a la membrana externa (Krishnan y Prasadarao, 2012; E-Kobon y col., 2017; Martínez y col., 2019; Nie y col., 2020). Poseen un papel fundamental en la patogénesis de

diversas infecciones bacterianas y debido a su capacidad para interactuar en varios tejidos en el huésped se considera una molécula pleiotrópica y entre sus características importantes se ha descrito que la OmpA puede interactuar como adhesina/invasina, así como inmuno-evasina, participante en la formación de biopelículas, receptor de varios bacteriófagos, participa en la adherencia a las células huésped a través de la unión de heparina y fibronectina (E-Kobon y col., 2017). Se ha identificado como una molécula novedosa la cual coordina respuestas inmunitarias innata y adaptativa, lo que indica que puede representar un antígeno importante en el desarrollo de vacunas (Ambrosi y col., 2012; Krishnan y col., 2012). Se ha demostrado que la proteína de membrana externa OmpA de *Acinetobacter baumannii* tiene la capacidad de capturar al regulador del sistema del complemento (Factor H), confiriendo resistencia al suero humano (Woo y col., 2009). Se observó que el regulador C4BP capturado por la OmpA de *E. coli*, le daba resistencia a la bacteria para sobrevivir en el suero debido a una disminución en la deposición de C3b, evitando con esto, que se diera la activación del sistema del complemento y por ende el complejo de ataque de membrana sobre la bacteria (Wooster y col., 2006). En un estudio donde se trabajó con la proteína de membrana externa de *Haemophilus influenzae* OmpP5, proteína del complejo OmpA, se confirmó un rol directo tras la captura del Factor H sobre la resistencia a la acción del sistema del complemento (Langereis y col., 2014). Se clonaron 3 ortólogos de OmpA en *Borrelia afzelii*, BAPKO\_0422, BAPKO\_0026, BAPKO\_0423 y BAPKO\_0591, sugiriendo que pudieran ser candidatos para la captura de Factor H del sistema del complemento, para la resistencia al suero humano (Dyer, 2015). Las proteínas de membrana externa tales como OmpA, se han considerado como candidatos vacunales efectivos, tal como se demostró con un péptido de *Pseudomonas aeruginosa* con considerable homología con OmpA (Gilleland y Gilleland, 1995). En contraste, en un experimento donde se mutó por delección a OmpA en *Klebsiella pneumoniae* se demostró que no había influencia en la sobrevivencia en el suero (Hsieh y col., 2013).

Una tercera proteína de captura de Factor H de *P. multocida* determinada en nuestro estudio fue una peroxirredoxina. Las peroxirredoxinas (Prxs) son una familia de proteínas peroxidadas que se pueden dividir en seis subgrupos con distintas secuencias de aminoácidos y altamente conservadas, con un residuo de cisteína conservado, denominado Cys "peroxidático" (Parsonage y col., 2008; Nelson y col., 2011; Rhee, 2016). Se sugiere que este residuo sirve como sitio de oxidación por peróxidos y está involucrada en la virulencia y como protección en contra del estrés oxidativo de *Staphylococcus aureus* (Cosgrove y col., 2007) y *Helicobacter cinaedi* (Charoenlap y col., 2012). El genoma de la cepa PA14 de *Pseudomonas aeruginosa* es altamente virulenta, contiene al menos 8 genes que codifican Prxs, incluidos *ahpC* y *tpx*. Ohr es otra peroxidasa basada en Cys, es caracterizada estructural y enzimáticamente, pero no se requiere para la virulencia (Lesniak y col., 2002, Atichartpongkul y col., 2010). Se ha observado que *Haemophilus influenzae in vitro*, desarrolla una biopelícula con la expresión de abundante peroxirredoxina (PGdx), así como *in vivo* durante la infección del tracto respiratorio humano, donde se desarrolla una respuesta inmune humoral contra la proteína (Short y col., 2021). En un estudio se determinó que se puede dar una unión de Prx1 y Prx2 a C1q del sistema del complemento de la vía clásica, sin embargo, solo Prx2 podría inducir la activación de la vía clásica del complemento mediado por C1q (Park y col., 2021). Se determinaron tres nuevas proteínas inmunogénicas de *P. multocida* mediante el uso de 2-DE MALDI-TOF MS con suero inmune de cerdos. Dentro de esas proteínas se encuentra una peroxirredoxina (PrX), sugiriendo que podrían probarse como buenas candidatas a vacunas (Wang y col., 2021).

La cuarta proteína de captura de Factor H de *P. multocida* que fue determinada en nuestro estudio es la proteína L6 50S ribosomal. El ribosoma traduce la información genética del ARN mensajero en proteína. Los ribosomas bacterianos tienen un coeficiente de sedimentación de 70S y están compuestos por subunidades 50S y 30S. En *E. coli* la subunidad 50S contiene 33 proteínas ribosomales, L1-L6, L9-L25 y L27-L36 y dos RNAr 23S y 5S, mientras que la subunidad 30S contiene 21 proteínas ribosomales, S1-S21 y una RNAr 16S (Nierhaus, 2006; Shajani y col.,

2011; Nikolay y col., 2015). La función de dichas proteínas aún está en estudio, en el caso de la proteína L6 participa en la estabilidad modular y en el ensamblaje de la estructura de la subunidad 50S, por lo que tiene interacciones con factores de traducción y GTPasa (Julian y col., 2011; Pulk y Cate, 2013; Fischer y col., 2015). Shigeno y col. (2016), demostraron que la proteína L6 actúa directamente como un factor clave en la última etapa del ensamblaje de la subunidad 50S de *E. coli* y que el agotamiento de L6 resulta en la detención de la proliferación celular y una disminución en la actividad GTPasa dependiente de ribosomas, debido a la acumulación de precursores de la subunidad 50S que sedimentan en 45S. En otros estudios se observó que la proteína L6 se expresa en el citoplasma y ha sido identificada en vesículas de membrana externa obtenidas con detergente en *Neisseria meningitidis*, pero su función todavía no queda clara (Tani y col., 2014). En otro estudio se trabajó con *Rickettsia conorii*, el agente etiológico de la fiebre maculosa mediterránea (FEM), demostrando su interacción con el Factor H del sistema del complemento, observando una supervivencia parcial en el suero humano, demostrando que especies de rickettsias han desarrollado múltiples mecanismos para evadir la deposición del complemento y que la evasión de la muerte en el suero es un atributo de virulencia conservado evolutivamente para este género de patógenos intracelulares obligados. En dicho estudio, observaron con lisados de la bacteria y con fracciones de membrana externa, reactividad en ambas, utilizando como anticuerpo un anti-RlpF (proteína ribosómica L6 de 50S), como control para los contenidos citoplásmicos (Riley y col., 2014). Ahora bien, en otro estudio con *Staphylococcus aureus* se detectaron proteínas intracelulares en la superficie celular, involucradas en la patogénesis, en la evasión inmune donde las moléculas de la bacteria unidas a la pared sólo se unirían a las inmunoglobulinas y las moléculas secretadas se unirían tanto a las inmunoglobulinas como a los componentes del sistema del complemento (Dreisbach y col., 2010).

Por último, fue determinada una quinta proteína de captura del Factor H en *P. multocida*, la acetil coenzima A acetiltransferasa, la cual es una molécula impermeable a la membrana constituida por un acetilo unido a la coenzima A (CoA),

es un intermediario metabólico y sirve como precursor de acetilación para la biosíntesis de varios acetil-químicos. Acetil-CoA se puede producir a partir de glucosa, acetato o ácidos grasos a través de vías metabólicas en *Escherichia coli* (Pietrocola y col., 2015; Zhang y col., 2019). Es central para el metabolismo intermedio, como reacciones anabólicas, como regulador de actividades enzimáticas y para la acetilación de proteínas, pero estrictamente mantiene la homeostasis de la carga energética (Pietrocola y col., 2015). La acetilación de proteínas bacterianas juega un papel destacado en el metabolismo central y secundario, la virulencia, la transcripción y la traducción (VanDrisse y Escalante, 2019). Es relevante determinar si la captura de Factor H por estas proteínas contribuye a la evasión inmune.

### **Conclusiones**

En este estudio se demostró que *Pasteurella multocida* tipo A muestra una sobrevivencia del 51% al complemento activo en SHN. Esta sobrevivencia es probablemente debida a la captura del Factor H por la bacteria, lo cual fue demostrado tras la incubación del cultivo bacteriano con SHN 40% por ELISA y Western blot superpuesto. La captura del regulador factor H por *Pasteurella multocida* se lleva a cabo mediante las 5 proteínas: GroEI, OmpA, peroxirredoxina, L6 50S, Acetil Co-A Acetiltransferasa, que fueron identificadas en geles de doble dimensión y Western blot superpuesto.

Se requieren más estudios para determinar con exactitud si la captura de Factor H por estas proteínas contribuye a la evasión del sistema del complemento.

## Referencias

- 1.- Abreu F, Rodríguez-Lucas C, Rodicio MR, Vela AI, Fernández-Garayzábal JF, Leiva, PS, Fernández J. Human *Pasteurella multocida* infection with likely zoonotic transmission from a pet dog, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2018; 24(6):1145.
- 2.- Adler B, Bulach D, Cheng J, Doughty S, Hunt M, Rajakumar K et al. Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. *J Biotechnol.* 1999; 73: 83-90.
- 3.- Aguilar RF. Complejo respiratorio infeccioso de los bovinos productores de carne. 1er. Simposium de Salud y Producción de Bovinos de Carne en la Zona Norte-Centro de México. Aguascalientes, Ags. Mayo 2010. En el Marco de La Feria de San Marcos 2010.
- 4.- Aktories K, Orth JH, Adler B. *Pasteurella multocida*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012; 361:1.
- 5.- Al-Hasani K, Boyce J, McCarl VP, Bottomley S, Wilkie I, Adler B. Identification of novel immunogens in *Pasteurella multocida*. *Microbiol Cell Fact.* 2007; 6(1): 1-5.
- 6.- Ambrosi C, Pompili M, Scribano D, Zagaglia C, Ripa S, Nicoletti M. Outer membrane protein A (OmpA): a new player in *Shigella flexneri* protrusion formation and inter-cellular spreading. *PloS One.* 2012; 7(11): e49625.
- 7.- Amdahl H, Jarva H, Haanperä M, Mertsola J, He Q, Jokiranta TS, Meri S. Interactions between *Bordetella pertussis* and the complement inhibitor factor H. *Mol Immunol.* 2011; 48(4): 697-705.
- 8.- Atichartpongkul S, Fuangthong M, Vattanaviboon P, Mongkolsuk S. Analysis of the regulatory mechanism and physiological roles of *Pseudomonas aeruginosa* OhrR, a transcriptional regulator and sensor of organic hydroperoxides. *J Bacteriol.* 2010; 192(8): 2093–2101.
- 9.- Bajic G, Degn SE, Thiel S, Andersen GR. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *J EMBO.* 2015; 34: 2735-2757.
- 10.- Barbosa AS, Abreu PAE, Vasconcellos SA, Morais ZM, Gonzales AP, Silva AS, Daha MR, Isaac L. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun.* 2009; 77(3): 1137-1143.

- 11.- Berggard K, Lindahl G, Dahlback B, Blom AM. *Bordetella pertussis* binds to human C4b-binding protein (C4BP) at a site similar to that used by the natural ligand C4b. *Eur J Immunol.* 2001; 31(9): 2771-2780.
- 12.- Blom AM, Hallström T, Riesbeck K. Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond. *Mol Immunol.* 2009; 46: 2808–2817.
- 13.- Borrathybay E, Sawada T, Kataoka Y, Ohtsu N, Takagi M, Nakamura S, et al. A 39 kDa protein mediates adhesion of avian *Pasteurella multocida* to chicken embryo fibroblast cells. *Vet Microbiol* 2003; 97(3-4): 229-243.
- 14.- Boyce JD, Adler B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect Immun.* 2000; 68: 3463– 3468.
- 15.- Boyce JD, Cullen PA, Nguyen V, Wilkie I, Adler B. Analysis of the *Pasteurella multocida* outer membrane subproteome and its response to the *in vivo* environment of the natural host. *Proteomics.* 2006; 6(3): 870–880.
- 16.- Boyce JD, Harper M, Wilkie IW, Adler B. *Pasteurella*. In Gyles GL, Prescott JF, Glenn SJ, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Ed. Iowa, USA. 2004.
- 17.- Castillo G, Koga Y, Alvarado A, Tinoco R, Fernández D. Aislamiento e identificación bioquímica de cepas de *Pasteurella multocida* y *Gallibacterium anatis* en aves de producción con signos respiratorios. *Rev Inv Vet Perú*, 2014; 25(4): 516-522.
- 18.- Charoenlap N, Shen Z, McBee ME, Muthupalani S, Wogan GN, Fox JG, Schauer DB. Alkyl hydroperoxide reductase is required for *Helicobacter cinaedi* intestinal colonization and survival under oxidative stress in BALB/c and BALB/c interleukin-10-/- mice. *Infect Immun.* 2012; 80(3): 921–928.
- 19.- Chevalier G, Le Henaff M, Wroblewski H. Purification, amino acid composition and N-terminal sequence of the major protein (protein H) of the outer membrane of *Pasteurella multocida*. *C R Acad Sci.* 1992; 314 (6): 253–258.
- 20.- Chung MC, Tnry JH, Narayanan A, Manes NP, Mackie RS, Gutting B, Mukherjee DV, Popoya TG, Kashanchi F, Bailey CL, Popov SG. *Bacillus anthracis*

interacts with plasmin(ogen) to evade C3b-dependent innate immunity. *Plos One*. 2011; 6(3): e18119.

21.- Clark GW, Tillier ERM. Loss and gain of GroEL in the Mollicutes. *Biochem Cell Biol*. 2010; 88(2): 185-194.

22.- Cosgrove K, Coutts G, Jonsson IM, Tarkowski A, Kokai-Kun JF, Mond JJ, Foster SJ. Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in resistance to peroxide stress and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2007; 189(3): 1025–1035.

23.- Cuéllar J, Martín-Benito J, Scheres SHW, Sousa R, Moro F, López-Viñas E, Gómez-Puertas P, Muga A, Carrascosa JL, Valpuesta JM. The structure of CCT-Hsc70 NBD suggests a mechanism for Hsp70 delivery of substrates to the chaperonin. *Nat Struct Mol Biol*. 2008; 15(8): 858-864.

24.- D'Amico F, Casalino G, Bozzo G, Camarda A, Lombardi R, Dimuccio MM, Circella E. Spreading of *Pasteurella multocida* Infection in a Pet Rabbit Breeding and Possible Implications on Healed Bunnies. *Vet Sci*. 2022; 9(6): 301.

25.- Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev*. 2007; 8: 129–150.

26.- De Angelis PL, Gunay NS, Toshihiko T, Mao WJ, Linhardt RJ. Identification of the capsular polysaccharides of Type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin, respectively. *Carbohydr Res*. 2002; 337(17): 1547–1552.

27.- De Paula PF, Barbosa JE, Junior PR, Ferrani VPL, Latorre MRDO, Nudelman V, Issac L. Ontogeny of Complement Regulatory Proteins – Concentrations of Factor H, Factor I, C4b-Binding Protein, Properdin and Vitronectin in Healthy children of different ages and in adults. *Scand J Immunol*. 2003; 58(5): 572–577.

28.- Deeb BJ, DiGiacomo RF, Bernard BL, Silbernagel SM, Chengappa MM. Field trial of a live streptomycin dependent *Pasteurella multocida* serotype A:12 vaccine in rabbits. *Lab Anim Sci*. 1989; 39(3): 229-233.

29.- Dyer A, Brown G, Stejskal L, Laity PR, Bringham RJ. The *Borrelia afzelii* outer membrane protein BAPKO\_0422 binds human factor-H and is predicted to form a membrane-spanning  $\beta$ -barrel. *Biosci Rep*. 2015; 35(4): e00240.

- 30.- Doughty SW, Ruffolo CG, Adler B. The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. *Vet.Microbiol.* 2000; 72 (1-2): 79-90.
- 31.- Dreisbach A, Hempel K, Buist G, Hecker M, Becher D, van Dijk JM. Profiling the surface of *Staphylococcus aureus*. *Proteomics.* 2010; 10(17): 3082-3096.
- 32.- E-Kobon T, Leeanan R, Pannoi S, Anuntasomboon P, Thongkamkoon P, Thamchaipenet A. OmpA protein sequence-based typing and virulence-associated gene profiles of *Pasteurella multocida* isolates associated with bovine haemorrhagic septicaemia and porcine pneumonic pasteurellosis in Thailand. *BMC Vet Res.* 2017; 13(1): 243.
- 33.- Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Almasy L, Blangero J, Fontcuberta J, Rodríguez de Córdoba S. Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics.* 2004; 56(2): 57-82.
- 34.- Esquinas CP, Iregui CC. Mecanismos de patogénesis bacteriana en procesos respiratorios: pasteurellosis. *UDCA.* 2007; 10(1): 21-32.
- 35.- Ferreira VP, Pangburn MK, Cortes C. Complement control protein factor H: the good, the bad and the inadequate. *Mol Immunol.* 2010; 47(13): 2187-2197.
- 36.- Ferreira TSP, Moreno LZ, Felizardo MR, de Gobbi DDS, Filsner PHdLN, de Moura Gomes VT, Moreno AM. Pheno-and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolated from cats, dogs and rabbits from Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2016; 45: 48-52.
- 37.- Fischer N, Neumann P, Konevega AL. Structure of the *E. coli* ribosome-EF-Tu complex at <3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature.* 2015; 520(7548): 567-570.
- 38.- Fleury C, Su YC, Hallström T, Sandblad L, Zipfel PF, Riesbeck K. Identification of a *Haemophilus influenzae* factor H-binding lipoprotein involved in serum resistance. *J Immunol.* 2014; 192(12): 5913-5923.
- 39.- Fourie KR, Wilson HL. Understanding GroEL and DnaK stress response proteins as antigens for bacterial diseases. *Vaccines.* 2020; 8(4): 773.
- 40.- Fraga RT, dos Santos CD, Castiblanco-Valencia MM, Yoshico HI, Arruda VS, Juliano L, Silva BA, Isaac L. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the

secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *J Infect Dis.* 2014; 209 (6): 876-886.

41.- Gilleland LB, Gilleland HE. Synthetic peptides representing two protective, linear B-cell epitopes of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* elicit whole-cell-reactive antibodies that are functionally pseudomonad specific. *Infect Immun.* 1995; 63(6): 2347-2351.

42.- Glorioso JC, Jones GW, Rush HG, Pentler LJ, Darif CA, Coward JE. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. *Infect Immun.* 1982; 35(3): 1103-1109.

43.- Gruber R y Horovitz A. Allosteric mechanisms in chaperonin machines. *Chem Rev.* 2016; 116(11): 6588–6606.

44.- Guan L, Xu, Y, Ding W, Zhao Z. Biosynthesis and regulation mechanisms of the *Pasteurella multocida* capsule. *Res Vet Sci.* 2019; 127: 82-90.

45.- Hagemann L, Gründel A, Jacobs E, Dumke R. The Surface-displayed chaperones GroEL and DnaK of *Mycoplasma pneumoniae* interact with human plasminogen and components of the extracellular matrix. *Pathog Dis.* 2017; 75(3): 1-12.

46.- Harper M, Boyce JD, Wilkie IW, Adler B. Signature-Tagged Mutagenesis of *Pasteurella multocida* Identifies Mutants Displaying Differential Virulence Characteristics in Mice and Chickens. *Infect Immun.* 2003; 71 (9): 5440-5446.

47.- Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. Minireview. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 265 (1): 1–10.

48.- Harper M, Boyce JD. The myriad properties of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide. *Toxins.* 2017; 9(8): 254.

49.- Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A periodontopathogen?. *Periodontol.* 2010; 54(1): 78-105.

50.- Henderson B, Fares MA, Lund PA. Chaperonin 60: a paradoxical, evolutionarily conserved protein family with multiple moonlighting functions. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2013; 88(4): 955-987.

- 51.- Hey P, Gow P, Torresi J, Testro A. Cirrhosis, cellulitis and cats: a 'purrfect' combination for life-threatening spontaneous bacterial peritonitis from *Pasteurella multocida*. Case Reports. *Br Med J*. 2012; 007397.
- 52.- Ho DK, Tissari J, Järnyen HM, Blom AM, Meri S, Jarva H. Functional recruitment of human complement inhibitor C4B-binding protein to outer membrane protein Rck of *Salmonella*. *Plos One*. 2011; 6 (11): e27546.
- 53.- Ho DK, Skurnik M, Blom AM, Meri S. *Yersinia pestis* Ail recruitment of C4b-binding protein leads to factor I-mediated inactivation of covalently and noncovalently bound C4b. *Eur J Immunol*. 2014; 44 (3): 742-751.
- 54.- Ho JD, Massao TLEM, Monaris D, Gonçalves AP, Souza-Filho AF, de Souza GO, Heinemann MB, Lee HP, Estima APA. GroEL protein of the *Leptospira* spp. interacts with host proteins and induces cytokines secretion on macrophages. *BMC Microbiol*. 2021; 21(1): 1-19.
- 55.- Hsieh PF, Liu JY, Pan YJ, Wu MC, Lin TL, Huang YT, Wang JT. *Klebsiella pneumoniae* peptidoglycan-associated lipoprotein and murein lipoprotein contribute to serum resistance, antiphagocytosis, and proinflammatory cytokine stimulation. *J Infect Dis*. 2013; 208(10): 1580-1589.
- 56.- Huberman YD, Terzolo HR. *Pasteurella multocida* y cólera aviar. *Med Vet*. 2015; 96(1): 4-15.
- 57.- Hunt ML, Ruffolo CG, Rajakumar K, Adler B. Physical and genetic map of the *Pasteurella multocida* A:I chromosome. *J Bacteriol*. 1998; 180: 6054-6058.
- 58.- Inzana TJ, Balyan R, Howard MD. Decoration of *Histophilus somni* lipooligosaccharide with N-acetyl-5-neuraminic acid enhances bacterial binding of complement factor H and resistance to killing by serum and polymorphonuclear leukocytes. *Vet Microbiol*. 2012; 161(1-2): 113-121.
- 59.- Iovane G, Pagnini P, Galdiero M, Cipollaro de l'Ero G, Vitiello M, D'Isanto M & Marcatili A. Role of *Pasteurella multocida* porin on cytokine expression and release by murine splenocytes. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998; 66(3-4): 391-404
- 60.- Isenberg HD. Pathogenicity and virulence:another view. *Clin Microbiol Rev*. 1988; 1(1): 40-53.

- 61.- Ishii N. GroEL and the GroEL-GroES complex. *Subcell Biochem.* 2017; 83: 483–504.
- 62.- Jongerius I, Khol J, Pandey KM, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp JAG, Rooijackers SHM. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J Exp Med.* 2007; 204(10): 2461-2471.
- 63.- Julian P, Milon P, Agirrezabala X, Lasso G, Gil D, Rodnina MV, Valle M. The Cryo-EM structure of a complete 30S translation initiation complex from *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* 2011; 9(7): e1001095.
- 64.- Kehrenberg C, Tham NTT, Schwarz S. New Plasmid-Borne Antibiotic Resistance Gene Cluster in *Pasteurella multocida*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(9): 2978-2980.
- 65.- Kimura A, Mountzouros KT, Relman DA, Falkow S, Cowell JL. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect. Immun.* 1990; 58(1): 7-16.
- 66.- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Sistema del complemento. *Inmunología de Kuby.* McGraw-Hill. 2007; 168-188.
- 67.- Kisova-Vargová L, Cernanska D, Bhide M. Comparative study of binding of ovine complement factor H with different *Borrelia* genospecies. *Folia Microbiol.* 2012; 57(2): 123-128.
- 68.- Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol.* 2002; 37(2): 239-253.
- 69.- Koenigs A, Stahl J, Averhoff B, Göttig S, Wichelhaus TA, Wallich R, Zipfel PF, Kraiczky P. CipA of *Acinetobacter baumannii* is a novel plasminogen binding and complement inhibitory protein. *J Infect Dis.* 2016; 213(9): 1388-1399.
- 70.- Koneman EW y Allen S. Koneman. *Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas en Color.* Ed. médica panamericana. 2008.
- 71.- Krishnan S y Prasadarao NV. Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *FEBS.* 2012; 279(6): 919–931.

- 72.- Kunert A, Losse J, Gruszin C, Hühn M, Kaendler K, Mikkat S, Volke D, Hoffmann R, Sakari JT, Seeberger H, Moellmann U, Hellwage J, Zipfel PF. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J Immunol*. 2007; 179(5): 2979-2988.
- 73.- Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 2008; 6: 132–142.
- 74.- Langereis JD, de Jonge MI, Weiser JN. Binding of human factor H to outer membrane protein P5 of non-typeable *Haemophilus influenzae* contributes to complement resistance. *Mol Microbiol*. 2014; 94(1): 89-106.
- 75.- Lesniak J, Barton WA, Nikolov DB. Structural and functional characterization of the *Pseudomonas* hydroperoxide resistance protein Ohr. *EMBO J*. 2002; 21(24): 6649–6659.
- 76.- Li Q, Liu H, Du D, Yu Y, Ma C, Jiao F, Zhang W. Identification of novel laminin- and fibronectin-binding proteins by far-western blot: capturing the adhesins of *Streptococcus suis* type 2. *Front cell Infect Microbiol*. 2015; 5(82): 1-11.
- 77.- Lin PH, Bush RL, Zhou W, Peden EK, Lumsden AB. Endovascular treatment of traumatic thoracic aortic injury—should this be the new standard of treatment? *J Vasc Surg*. 2006; 43(2): 22-29.
- 78.- Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP. Control of the complement system. 1996; 61: 201-283.
- 79.- Luo Y, Zeng Q, Glisson JR, Jackwood MW, Cheng IH, Wang C. Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. *Vaccine*. 1999; 17(7-8): 821-831.
- 80.- Martínez-Miranda HA, Balam-Romero JB, Dzúl-Rosado KR. Importance of OmpA and OmpB proteins in the development of vaccines against rickettsiosis. *Biomedica*. 2019; 30(2): 73-81.
- 81.- Maruvada R, Blom AM, Prasadarao NV. Effects of complement regulators bound to *Escherichia coli* K1 and Group B *Streptococcus* on the interaction with host cells. *Immunology*. 2008; 124(2): 265-276.

- 82.- Mastellos D, Lambris JD. Complement: more than a 'guard' against invading pathogens? Trends Immunol. 2002; 23(10): 485-491.
- 83.- May BJ, Zhang Q, Ling LL, Paustian ML, Whittam TS, Kapur V. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98(6): 3460-3465.
- 84.- McDowell JV, Lankford J, Stamm L, Sadlon T, Gordon DL, Marconi RT. Demonstration of factor H-like protein 1 binding to *Treponema denticola*, a pathogen associated with periodontal disease in humans. Infect Immun. 2005; 73 (11): 7126-7132.
- 85.- McMullen ME, Hart ML, Walsh MC, Buras J, Takahashi K, Stahl GL. Mannose-binding lectin binds IgM to activate the lectin complement pathway *in vitro* and *in vivo*. Immunology. 2006; 211(10): 759-766.
- 86.- Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospirae. Microb. Pathog. 2005; 39(4): 139-47.
- 87.- Mooi FR, Jansen WH, Brunings H, Gielen H, van der Heide HG, Walvoort HC, Guinee PA. Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. Microb. Pathog. 1992; 12(2): 127-135.
- 88.- Moreno-Torres A, Malvido-Jiménez IR, de la Peña-Moctezuma A, Castillo-Sánchez LO, Fraga TR, Barbosa AS, Sahagún-Ruiz A. Culture-attenuated pathogenic *Leptospira* lose the ability to survive to complement-mediated-killing due to lower expression of factor H binding proteins. Microbes Infect. 2019; 21(8-9): 377-385.
- 89.- Muttters R, Christensen H, Bisgaard M. Genus *Pasteurella*, in Bergey's manual of systematic bacteriology. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag New York, NY. 2003.
- 90.- Nelson KJ, Knutson ST, Soito L, Klomsiri C, Poole LB, Fetrow JS. Analysis of the Peroxiredoxin Family: Using Active Site Structure and Sequence Information for Global Classification and Residue Analysis. Proteins. 2011; 79(3): 947-964.

- 91.- Nie D, Hu Y, Chen Z, Li M, Hou Z, Luo X, Mao X, Xue X. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. *J Biomed Sci.* 2020; 27(1): 1-8.
- 92.- Nierhaus KH. Bacterial ribosomes: assembly. *ELS*, 2006; 1-10.
- 93.- Nikolay R, Van den Bruck D, Achenbach J, Nierhaus KH. Ribosomal proteins: role in ribosomal functions. *ELS*. 2015; 1-12.
- 94.- Nordström T, Blom AM, Forsgren A, Riesbeck K. The Emerging Pathogen *Moraxella catarrhalis* interacts with complement inhibitor C4b binding protein through ubiquitous surface proteins A1 and A2. *J Immunol.* 2004; 173(7): 4598-4606.
- 95.- Nozal P, López-Trascasa. Anticuerpos frente a proteínas de la vía alterna del complemento en enfermedad renal. *Nefrología.* 2016; 36(5): 489-495.
- 96.- Okerman L, Spanoghe L, De Bruycker RM. Experimental infections of mice with *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits. *J Comp Path.* 1979; 89(1): 51-55.
- 97.- Pangburn MK, Rawal N, Cortes C, Nurul A, Ferreira VP, Atkinson MAL. Polyanion-Induced Self-Association of Complement Factor H. *J Immunol.* 2009; 182(2): 1061-1068.
- 98.- Park CH, Lee HS, Kwak MS, Shin JS. Inflammasome-dependent peroxiredoxin 2 secretion induces the classical complement pathway activation. *Immune Netw.* 2021; 21(5): e36.
- 99.- Parsonage D, Karplus PA, Poole LB. Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(24): 8209-8214.
- 100.- Per H, Kumandaş S, Gümüş H, Öztürk MK, Çoşkun A. Meningitis and subgaleal, subdural, epidural empyema due to *Pasteurella multocida*. *J Emerg Med.* 2010; 39(1): 35-38.
- 101.- Pietrocola F, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Madeo F, Kroemer G. Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab.* 2015; 21(6): 805-821.

- 102.- Potempa M, Potempa J, Okroj M, Popadiak K, Eick S, Nguyen KA, Riesbeck K, Blom AM. Binding of complement inhibitor C4b-binding protein contributes to serum resistance of *Porphyromonas gingivalis* J Immunol. 2008; 181(8): 5537-5544.
- 103.- Pulk A, Cate JHD. Control of ribosomal subunit rotation by elongation factor G. Science. 2013; 340(6140): 1235970.
- 104.- Quan L, Caifeng M, Yang F, Yanan H, Yanfei Y, Dechao D, Huochun Y, Chengping L, Wei Z. Factor H specifically capture novel factor H-binding proteins of *Streptococcus suis* and contribute to the virulence of the bacteria. Microbiol Res. 2017; 196: 17-25.
- 105.- Ram S, Sharma AK, Simpson SD, Gulati S, McQuillen DP, Pangburn MK, Rice PA. A Novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. J. Exp. Med. 1998; 187(5): 743-752.
- 106.- Rautemaa R, Rautelin H, Puolakkainen P, Kokkola A, Karkkainen, Meri S. Survival of *Helicobacter pylori* from complement lysis by binding of GPI-anchored protectin (CD59). Gastroenterology. 2001; 120(2): 470-479.
- 107.- Rhee SG. Overview on peroxiredoxin. Mol Cell. 2016; 39(1): 1-5.
- 108.- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. Nat Immunol. 2010; 11: 785-797.
- 109.- Rideaud P, Coudert P, Mercier P, Hervouet P. A comparative study of the virulence of *Pasteurella multocida* from rabbits. Fifth Congress of the World Rabbit Association, Corvallis, 1992.
- 110.- Riley SP, Patterson JL, Nava S, Martinez JJ. Pathogenic Rickettsia species acquire vitronectin from human serum to promote resistance to complement-mediated killing. Cell Microbiol. 2014; 16(6): 849-861.
- 111.- Rosner H, Grimmecke HD, Knirel YA, Shashkov AS. Hyaluronic acid and a D - xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. Carbohydr Res. 1992; 223: 329 – 333.
- 112.- Sahagún-Ruiz A, Granados MAP, Dantas BLC, Rodrigues FT, Castiblanco VMM, Silva BA. *Pasteurella pneumotropica* evades the human complement system

- by acquisition of the complement regulators factor H and C4BP. Plos One. 2014, 9 (10): 1-8.
- 113.- Sakaue T, Takeuchi K, Maeda T, Yamamoto Y, Nishi K, Ohkubo I. Factor H in porcine seminal plasma protects sperm against complement attack in genital tracts. J Biol Chem. 2010; 285(3): 2184-2192.
- 114.- Scott PC, Markham JF, Whithear KG. Safety and efficacy of two live *Pasteurella multocida* aro-A mutant vaccines in chickens. Avian Dis. 1999; 43(1): 83-88.
- 115.- Shajani Z, Sykes MT, Williamson JR. Assembly of bacterial ribosomes, Annu Rev. Biochem. 2011; 80: 501-526.
- 116.- Shigeno Y, Uchiumi T, Nomura T. Involvement of ribosomal protein L6 in assembly of functional 50S ribosomal subunit in *Escherichia coli* cells. Biochem Biophys Res Commun. 2016; 473(1): 237-242.
- 117.- Short B, Carson S, Devlin AC, Reihill JA, Crilly A, MacKay W, Ramage G, Williams C, Lundy FT, McGarvey LP, Thornbury KD, Martin SL. Non-typeable *Haemophilus influenzae* chronic colonization in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Crit Rev Microbiol. 2021; 47(2): 192-205.
- 118.- Snipes KP, Hirsh DC, Kasten RW, Carpenter TE, Hird DW, McCapes RH. Homogeneity of characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife in California, 1985-88. Avian Dis. 1990; 34(2): 315-320.
- 119.- Souza MJ. Bacterial and Parasitic Zoonoses of Exotic Pets. Vet Clin North Am Exot Anim Pract. 2009; 12(3): 401-415.
- 120.- St Michael F, Li J, Vinogradov E, Larocque S, Harper M, Cox AD. Structural analysis of the lipopolysaccharide of *Pasteurella multocida* strain VP161: identification of both Kdo - P and Kdo - Kdo species in the lipopolysaccharide. Carbohydr Res. 2005; 340 (1): 59 – 68.
- 121.- Tabatabai LB. Identification of *Pasteurella multocida* CHAPS soluble outer membrane proteins. Avian Dis. 2008; 52(1): 147-149.

- 122.- Tan LA, Yang AC, Kishore U, Sim RB. Interactions of complement proteins C1q and factor H with lipid A and *Escherichia coli*: further evidence that factor H regulates the classical complement pathway. *Protein Cell*. 2011; 2: 320-332.
- 123.- Tani C, Stella M, Donnarumma D, Biagini M, Parente P, Vadi A, Magagnoli C, Costantino P, Rigat F, Norais N. Quantification by LC-MS(E) of outer membrane vesicle proteins of the Bexsero® vaccine. *Vaccine*. 2014; 32(11): 1273-1279.
- 124.- Tatum FM, Briggs RE. Construction of in-frame *aroA* deletion mutants of *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Haemophilus somnus* by using a new temperature-sensitive plasmid. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(11): 7196-7202.
- 125.- Tatum FM, Tabatabai LB, Briggs RE. Cross-protection against fowl cholera disease with the use of recombinant *Pasteurella multocida* FHAB2 peptides vaccine. *Avian Dis*. 2012; 56(3): 589-591.
- 126.- Thirumalai D, Lorimer GH, Hyeon C. Iterative annealing mechanism explains the functions of the GroEL and RNA chaperones. *Protein Sci*. 2020, 29(2): 360–377.
- 127.- Townsend KT, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* *cap* loci and the development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(3): 924-929.
- 128.- VanDrisse CM y Escalante-Semerena JC. Protein acetylation in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2019; 73: 111-132.
- 129.- Vasfi MM y Mittal KR. Role of outer membrane protein H (OmpH)- and OmpA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. *Infect Immun*. 1997; 65(11): 4502–4508.
- 130.- Virji M, Alexandrescu C, Ferguson DJ, Saunders JR, Moxon ER. Variations in the expression of pili: the effect on adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol*. 1992; 6(10): 1271-1279.
- 131.- Virji M, Saunders JR, Sims G, Makepeace K, Maskell D, Ferguson DJ. Pilus-facilitated adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells: modulation of adherence phenotype occurs concurrently with changes in

primary amino acid sequence and the glycosylation status of pilin. *Mol Microbiol.* 1993; 10(5): 1013-1028.

132.- Wang F, Wang X, Ai W, Zeng D, Liang W, Hua L, Liu H, Tian Y, Chen H, He Q, Peng Z, Wu B. Three novel immunogenic proteins determined through 2-Dimensional electrophoresis and mass spectrometry with immune serum confer protection against challenge with *porcine Pasteurella multocida* in mouse models. *Res Vet Sci.* 2021; 136: 303-309.

133.- Wilkie IW, Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida*: disease and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012; 361: 1-22.

134.- Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(3): 631-655.

135.- Woo KS, Hee CC, Chan MD, Sook JJ, Hwa LJ, Ji-Huyn S, Min KJ, Chul LY, Yong SS, Taek CD, Chul LJ. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol.* 2009; 301(2): 224-231.

136.- Wooster DG, Maruvada R, Blom AM, Prasadarao. Logarithmic phase *Escherichia coli* K1 efficiently avoids serum killing by promoting C4bp-mediated C3b and C4b degradation. *Immunology.* 2006; 117(4): 482-493.

137.- Zhang DF, Huang XQ, Wang D, Li YY, Yao YG. Genetic variants of complement genes ficolin-2, mannose-binding lectin and complement factor H are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Hum Genet.* 2013; 132(6): 629-640.

138.- Zhang W, Lu CP. Immunoproteomics of extracellular proteins of Chinese virulent strains of *Streptococcus suis* type 2. *Proteomics.* 2007; 7(24): 4468-4476.

139.- Zhang S, Yang W, Chen H, Liu B, Lin B, Tao Y. Metabolic engineering for efficient supply of acetyl-CoA from different carbon sources in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2019; 18(1): 130.

140.- Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(10): 729-740.

141.- Zipfel PF, Hallstroem T, Riesbeck K. Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes–tipping the balance. *Mol Immunol.* 2013; 56(3): 152-160.

## Apéndice: Preparación de reactivos y soluciones

### PBS 10 X, PH 7.4 (SOLUCIÓN BUFFER DE FOSFATOS)

Cloruro de sodio (NaCl) 87.7 g

Fosfato de sodio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1.5 g

Fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 13 g

Se disuelven las sales en 900 mL de agua destilada c.b.p. 1 L. El pH se ajusta a 7.4.

### PBS 1 X, PH 7.4

PBS 10X 100 mL

Agua destilada 900 mL

### PBS-TWEEN 20 (0.5%)

Tween 20 5 mL

PBS 1 X, pH 7.4 c.b.p. 1L

### TRIS-HCL, PH 6.8 0.5 M

Tris-HCl 7.88 g

Agua destilada c.b.p. 100 mL

### TRIS HCL, PH 8.8 1.5 M

Tris-HCl 54.45 g

Agua destilada c.b.p. 150 mL

### SDS AL 10%

Disolver 10 g de SDS en 50 mL de agua destilada, agitar y aforar a 100 mL

## PERSULFATO DE AMONIO (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

Disolver 0.05 g de persulfato de amonio en 0.5 mL de agua destilada estéril.

## AMORTIGUADOR DE MUESTRA

|                        |        |
|------------------------|--------|
| 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 | 1.0 mL |
| Glicerol               | 0.8 mL |
| SDS 10%                | 1.6 mL |
| 2-mercaptoethanol      | 0.4 mL |
| Azul de bromofenol     | 0.02 g |
| Agua destilada         | 3.8 mL |

Diluir la muestra en proporción 1:1 con el amortiguador de muestra. Calentar a 100°C durante 5 min antes de colocar en el pozo del gel.

## AMORTIGUADOR PARA ELECTROFORESIS 5 X

|                |         |
|----------------|---------|
| Tris-HCl       | 15 g    |
| Glicina        | 72 g    |
| SDS            | 5.0 g   |
| Agua destilada | 1000 mL |

Almacenar a 4°C.

Solución de trabajo: Diluir 200 mL en 1 L de agua destilada.

## PREPARACIÓN DEL GEL SEPARADOR

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Agua destilada           | 3.35 mL |
| Acrilamida 30%           | 4.0 mL  |
| 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8   | 2.5 mL  |
| SDS 10%                  | 100 µL  |
| Persulfato de amonio 10% | 50 µL   |

TEMED 5  $\mu$ L

Se homogenizan los reactivos, y se vierte al interior de los cristales.

#### GEL CONCENTRADOR 4%

Agua destilada 3.05 mL

Acrilamida 30% 0.67 mL

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 1.25 mL

SDS 10% 50  $\mu$ L

Persulfato de amonio 10% 25  $\mu$ L

TEMED 5  $\mu$ L

Se homogenizan los reactivos y se agrega ya polimerizado el gel separador.

#### SOLUCIÓN TEÑIDORA DE AZUL DE COOMASIE

Etanol absoluto 500 mL

Ácido acético 100 mL

Agua destilada 500 mL

Azul de Coomasie 0.55 g

#### SOLUCIÓN DESTEÑIDORA PARA LA TINCIÓN DE AZUL DE COOMASIE

Etanol absoluto 640 mL

Ácido acético 160 mL

Agua destilada 960 mL

Se mezclan los reactivos y se almacena en un frasco ambar.

#### AMORTIGUADOR DE TOWBIN

Tris-HCl 3.023 g

Glicina 14.4 g

|                |         |
|----------------|---------|
| SDS            | 0.037 g |
| Metanol        | 200 mL  |
| Agua destilada | 800 mL  |

Se mezclan los reactivos en el agua destilada y al final se agregan los 200 mL del etanol.

#### AMORTIGUADOR SALINO DE TRIS-TWEEN 20 (TBS-T)

|                     |             |
|---------------------|-------------|
| Tris-HCl 1 M pH 7.5 | 20 mL       |
| NaCl                | 1.8 g       |
| Tween 20            | 100 $\mu$ l |

Se mezclan los componentes en 180 mL de agua estilada y se utiliza en el momento.

#### SOLUCIÓN DE REVELADO PARA INMUNODETECCIÓN TIPO WESTERN

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| TBS pH 8.0                      | 100 mL     |
| Metanol helado (-20 ° C)        | 20 mL      |
| 4-cloro-1naftol                 | 60 mg      |
| Peróxido de hidrógeno al 30.0 % | 60 $\mu$ L |

Para el revelado se utilizaron 100 mL TBS pH 8.0.

Se mezclan los reactivos y se sumergen las membranas a revelar.