



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**Posgrado en Ciencias de la Salud y de la
Producción Animal**

**“Obtención y Caracterización de
Vesículas de Membrana de *Haemophilus
paragallinarum*”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS**

P R E S E N T A :

MARCELA OLIVIA RAMON ROCHA

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL**

**COMITÉ TUTORAL
DRA. MIREYA DE LA GARZA A.
DR. SERGIO VACA PACHECO**

EDO. DE MEX. 2005



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).

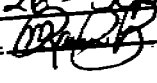
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Marcela Olivia

Ramón Rocha

FECHA: 26-Sept-2005

FIRMA: 

Proyecto financiado por:

PAPIIT/IN219203-3

DEDICADA

A mis padres: Jorge y Bertha Marcela

Gracias por el ejemplo de la honradez, del entusiasmo y la calidez, por los regaños y desacuerdos, por las verdades y descontentos.....

*Gracias por los
consejos y las caídas, por enseñarme como es la vida....*

*Gracias por estar a mi lado en el momento justo y el más anhelado,
cuando necesito sentir sus besos y sus abrazos y escuchar un te quiero
y escuchar un te amo.....*

*Gracias con todo mi corazón, gracias por ser como son, que Dios no
pudo escoger de una manera mejor, a mis padres, la pareja que ustedes
son.*

A PAULO

*Por ser esa personita especial que me ha brindado su apoyo, cariño y
confianza. Espero que esto sea, una más de todas las cosas que aún
nos falta por compartir. Gracias por todo el amor y el cuidado que he
recibido de ti.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Erasmo Negrete Abascal, por la asesoría brindada para la realización de este trabajo. De igual forma le agradezco el tiempo dedicado a mi formación personal y profesional.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco, por la confianza dada a mi persona, y principalmente, por el apoyo y los consejos recibidos.

A la Dra. Mireya de la Garza Amaya, por todas las atenciones que recibí de su parte, así como por todas las observaciones dadas para el mejoramiento de este trabajo.

Al Dr. Francisco Trigo y al Dr. Andrés Romero por su tiempo y valiosas sugerencias en el proceso de revisión del presente trabajo.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado.

Al laboratorio de microscopía electrónica del CINVESTAV por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

A la Q.F.B. Rosa María García y a la Dra. Patricia Ramírez por su amable colaboración.

A mis compañeros de Laboratorio: Lolita, Ricardo, Favy, Angel, Ely, Angie y Ale por su ayuda y los buenos momentos que pasamos juntos.

A mis amigos:

Augusto, gracias por la amistad y el cariño que me has brindado, eres una gran persona.

Gaby, te agradezco todos los momentos tan bonitos que disfrutamos juntas.

Alfredo, porque eres una persona que tiene mi cariño y sé que siempre voy a contar contigo.

Francisco, con mucho cariño te doy las gracias porque en los momentos más difíciles siempre estuviste a mi lado.

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Coriza Infecciosa.....	1
1.1.1 Transmisión de la enfermedad.....	1
1.1.2 Signos clínicos.....	1
1.1.3 Patología.....	2
1.1.4 Incidencia y distribución.....	3
1.1.5 Mortalidad y morbilidad.....	3
1.1.6 Resistencia a antibióticos.....	4
1.1.7 Inmunidad y vacunación.....	4
1.2 <i>Haemophilus paragallinarum</i>.....	6
1.2.1 Características del microorganismo.....	7
1.2.2 Propiedades bioquímicas.....	9
1.2.3 Clasificación serológica.....	10
1.2.4 Factores de virulencia.....	11
1.3 Vesículas de Membrana.....	14
1.3.1 Formación de vesículas de membrana.....	16
2. ANTECEDENTES.....	19
2.1 Ácidos nucleicos.....	19
2.2 Proteínas.....	20
3. JUSTIFICACION.....	24
4. OBJETIVOS.....	25
5. MATERIALES Y METODOS.....	26
5.1 Cepa bacteriana y medio de cultivo.....	26
5.2 Obtención de vesículas de membrana.....	26
5.3 Microscopía electrónica.....	27
5.4 Proteínas.....	27
5.4.1 Proteínas secretadas.....	27

5.4. 2 Proteína secretada de 110 kDa.....	28
5.5 Actividad proteolítica.....	28
5.6 Inmunoreconocimiento.....	28
5.7 Ácidos nucleicos.....	30
5.8 Hemaglutinación.....	30
6. ANALISIS DE RESULTADOS.....	32
6.1 Vesículas de membrana de HpgA.....	32
6.2 Perfil proteico.....	33
6.3 Actividad proteolítica.....	35
6.4 Inmunoreconocimientos.....	36
6.4.1 Inmunoreconocimiento de proteasas.....	36
6.4.2 Inmunoreconocimiento de proteínas secretadas de 110 kDa de HpgA...37	
6.4.3 Inmunoreconocimiento con suero de aves sanas (ALPES).....	39
6.4.4 Inmunoreconocimiento con suero de aves no vacunadas y desafiadas..39	
6.4.5 Inmunoreconocimiento con suero de aves vacunadas y desafiadas.....	40
6.5 Ácidos nucleicos.....	42
6.6 Hemaglutinación.....	43
7. DISCUSIÓN.....	44
7.1 Perfil proteico.....	46
7.2 Actividad proteolítica.....	49
7.3 Inmunoreconocimiento con sueros de aves.....	51
7.4 Acidos nucleicos.....	52
7.5 Hemaglutinación.....	53
8. CONCLUSIONES.....	54
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ave enferma con los signos de la CI.

Figura 2: Fenómeno de satelitismo de Hpg.

Figura 3: Morfología colonial de Hpg.

Figura 4: Vesículas de membrana de *P aeruginosa*.

Figura 5: VM de HpgA teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico al 1%.

Figura 6: Patrón de proteínas en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie.

Figura 7: Actividad proteolítica en gel de poliacrilamida copolimerizado con sustrato (gelatina 0.1%)

Figura 8: Inmunoreconocimiento de proteasas presentes en VM de HpgA empleando un suero anti-proteasas de *A. pleuropneumoniae*

Figura 9:

a) Gel de poliacrilamida al 10% mostrando el perfil proteínico de diferentes muestras de HpgA.

b) Inmunoreconocimiento de la proteína de 110 kDa en muestras de HpgA.

Figura 10:

a) Inmunoreconocimiento de muestras de HpgA empleando un suero de aves libre de patógenos específicos (ALPES).

b) Inmunoreconocimiento de muestras de HpgA con suero de aves no vacunadas y desafiadas con Hpg.

c) Muestras de HpgA que presentan reacción cruzada con un suero de aves vacunadas y desafiadas con Hpg.

Figura 11: Gel de agarosa al 0.8% donde se muestran los ácidos nucleicos obtenidos de VM de HpgA.

Figura 12: Aglutinación de eritrocitos de pollo por VM de HpgA observada en el microscopio óptico.

A Eritrocitos de pollo frescos

B Eritrocitos fijados con glutaraldehído al 1%

ABREVIATURAS

AgHem	Antígeno hemoaglutinante
ALPES	Aves libres de patógenos específicos
BHI	Infusión cerebro corazón
CI	Coriza Infecciosa
EDTA	Acido etilendiamino tetra acético
g	Gravedades
Hpg	<i>Haemophilus paragallinarum</i>
HpgA	<i>Haemophilus paragallinarum</i> serogrupo A
HL	Antígeno sensible al calor y resistente a la tripsina
HS	Antígeno estable al calor y resistente a la tripsina
IgG	Inmunoglobulina G
IH	Inhibición de la aglutinación
kDa	Kilodaltones
L	Antígeno sensible al calor y a la tripsina
LPS	Lipopolisacaridos
MPM	Marcador de peso molecular
NAD	Nicotin adenos dinucleotido
nm	Nanometros
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
OMP	Proteínas de membrana externa

RTX	Repeats in toxins
SDS	Duodecil sulfato de sodio
VM	Vesículas de Membrana

RESUMEN

Haemophilus paragallinarum (Hpg) es el agente causal de la Coriza infecciosa (CI), la cual es una enfermedad que afecta el aparato respiratorio superior de los pollos ocasionando grandes pérdidas económicas en la industria avícola.

Este trabajo se realizó con la finalidad de caracterizar las Vesículas de Membrana (VM), liberadas al medio de cultivo por Hpg en condiciones normales, e identificar su contenido para conocer si transportaban moléculas que pudieran ser posibles factores de virulencia de la bacteria y que pudieran tener alguna participación en la patogénesis de esta enfermedad o que participaran en el desarrollo de la respuesta inmunológica del hospedero. Se obtuvieron VM esféricas de 25 a 300 nm de diámetro a partir de la cepa Hpg serogrupo A (HpgA) cultivada en BHI suplementado con NAD.

El contenido proteínico de las VM de HpgA fue determinado por medio de corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) encontrando proteínas en el rango de los 160 a 28kDa. La mayoría de éstas fueron reconocidas por sueros inmunes de aves no vacunadas, aves vacunadas y desafiadas con Hpg, pero no por suero de ALPES.

Una proteína de 110 kDa previamente reportada como probable miembro de la familia de las RTX fue reconocida en muestras de VM al emplearse un suero dirigido contra ella.

Por otro lado, se detectó la presencia de dos bandas de alto peso molecular en las VM por medio de Western blotting con un anticuerpo contra la proteasa de *A. pleuropneumoniae*, aunque en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina al 0.1% no se observó actividad proteolítica.

Las VM fueron procesadas por medio de un método propuesto por nuestro equipo de trabajo obteniéndose ácidos nucleicos en su interior, los cuales se evidenciaron en un gel de agarosa al 0.8%.

La presencia de uno de los principales factores de virulencia de Hpg que es el antígeno hemoaglutinante (adhesina) en VM fue determinada al observar que las VM aglutinaban eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído al 1%.

Las VM liberadas al medio por Hpg podrían ser importantes en la patogénesis de la enfermedad.

Palabras clave: Coriza Infecciosa, Vesículas de Membrana, toxinas RTX, proteasas, adhesinas.

ABSTRACT

Haemophilus paragallinarum (Hpg) is the causative agent of Infectious Coryza, an upper respiratory tract disease of chickens and it can cause marked economic drops in the avian industry.

The aim of this work was to characterize the membrane vesicles (VM) released to the culture medium by Hpg in normal conditions, and to identify its content to know if they contain molecules that can act as virulence factors that might participate in the pathogenesis of this disease or in the host immunological response. Spherical VM with 25 to 300 nm diameters was obtained from serogroup A Hpg (HpgA) grown in BHI plus NAD.

Protein profiles of HpgA VM was determined by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Page). Proteins of 28 to 160kDa were found, most of which were recognized by immune sera from vaccinated or non vaccinated birds, but not by sera from ALPES.

A 110 kDa protein was recognized in VM with an antisera directed against a protein of the same molecular mass previously reported as a putative RTX.

By western blotting two proteins of high molecular mass were detected in VM with antibodies against the protease of *A. pleuropneumoniae*. However, no proteolytic activity was observed in polyacrylamide gels copolymerized with 0,1% porcine gelatin.

VM were processed by a method developed by our team work, obtaining nucleic acids in their interior which were demonstrated in a 0.8% agarose gel.

The hemoagglutinant (adhesin) in VM, one of the most important virulence factors of Hpg, was inferred by the observation that VM were able to agglutinate 1% glutaraldehyde-fixed chicken erythrocytes.

The VM released by Hpg could be important in the pathogenesis of the disease.

Key Words: Infectious Coryza, Membrane Vesicles, RTX toxins, proteases, adhesins.

1. INTRODUCCION

1.1 Coriza Infecciosa

Una de las enfermedades respiratorias de origen bacteriano de interés para la industria avícola es la Coriza Infecciosa (CI). Esta enfermedad es de gran importancia económica debido a que ocasiona retardo en el crecimiento y pérdida de peso del pollo de engorda, propiciando el incremento en el número de aves que deben ser descartadas o eliminadas. Esta enfermedad también causa una considerable baja en la postura de huevo que oscila entre 10 y 40% (Blackall, 1999).

1.1.1 Transmisión de la Enfermedad

El agente causal de esta enfermedad es *Haemophilus paragallinarum*. La bacteria se transmite principalmente por vía aérea y por agua; sin embargo, sólo sobrevive unas 5 h fuera del ave. Por lo anterior, el reservorio principal del microorganismo son las aves enfermas o aves portadoras crónicas. Se ha encontrado que los faisanes y las gallinas de Guinea pueden también transmitirla. A la fecha, la CI no se ha descrito como una enfermedad que se transmita por huevo (Blackall et al., 1997).

1.1.2 Signos Clínicos

El ave se infecta por vía respiratoria y después de un período de incubación, que varía entre 1 y 3 días, se produce la enfermedad que se manifiesta por inflamación catarral de los senos paranasales (sinusitis). Los signos clínicos que se presentan más frecuentemente son: descarga nasal, hinchazón facial, lagrimeo, anorexia y diarrea, los cuales se observan por un periodo de 3 a

7 días. En la mayoría de los casos se produce su remisión. Como consecuencia de la signología, disminuye el consumo de agua y de alimento y se presenta un retardo en el crecimiento y disminución de la postura de huevo, aumentando el número de aves que deben descartarse (Blackall, 1999).

En casos donde la enfermedad se complica por la presencia de agentes virales o bacterianos tales como *Mycoplasma gallisepticum*, *Pasteurella spp.*, o *Salmonella spp.* la infección se difunde al aparato respiratorio inferior, siendo comunes las neumonías y aerosaculitis, prolongándose la enfermedad hasta por 50 días.



Fig. 1 Ave enferma con los signos de la CI.

- Lagrimeo
- Hinchazón facial
- Descarga nasal

1.1.3 Patología

Se ha reconocido que la unión de la bacteria a las mucosas y la posterior colonización de éstas son un paso muy importante en el proceso infeccioso. Además que esta adherencia puede estar relacionada con la virulencia.

La adherencia de esta bacteria a la superficie de las células del epitelio traqueal de los pollos fue reportada por Ueda et al. (1982). La adhesión permite al microorganismo colonizar el epitelio y resistir el movimiento ciliar del aparato respiratorio.

La bacteria produce inflamación catarral aguda de las membranas mucosas de la nariz y de los senos infraorbitarios. Los cambios en la mucosa de la cavidad nasal, de los senos paranasales y de la tráquea consisten en descamación, desintegración e hiperplasia del epitelio glandular y mucoso, edema e hiperemia con infiltración de mastocitos y macrófagos en la lámina propia. Los productos de las células cebadas y macrófagos probablemente son los responsables de los daños celulares severos de la CI (Blackall, et al., 1997).

1.1.4 Incidencia y Distribución

La CI es una enfermedad cosmopolita, que se distribuye principalmente en países con industria avícola intensiva como Argentina, Australia, Bulgaria, Canadá, Egipto, Gran Bretaña, Guatemala, Holanda, India, Indonesia, Irak, Estados Unidos y México, entre otros (Blackall et al., 1997). La CI se considera una enfermedad exótica en Nueva Zelanda, único país que parece estar libre de *H. paragallinarum*. Cabe resaltar que este país también está libre de salmonelosis aviar, omitobacteriosis y coriza de los pavos (Black, 1997)

1.1.5 Mortalidad y Morbilidad

La CI es usualmente una enfermedad caracterizada por una baja mortalidad y una alta morbilidad. Factores como el parasitismo y la nutrición inadecuada pueden incrementar la severidad y la duración de la enfermedad (Blackall et al., 1997).

1.1.6 Resistencia a Antibióticos

En 1988, Blackall probó un método de microdilución en caldo para conocer la sensibilidad de 75 cepas de Hpg a antibióticos como la ampicilina, eritromicina, neomicina, penicilina, estreptomina y tetraciclina, encontrando que el 73% de las cepas fueron sensibles a las seis drogas. El resto fue resistente a la estreptomina.

En un estudio similar, que incluyó 22 aislamientos de México y nueve cepas de referencia, se observó que el 96.8% de los microorganismos estudiados fue sensible a la enroflaxacina y mostró susceptibilidad variable a la oxitetraciclina, gentamicina, fosfomicina, amoxicilina y trimetoprim, entre otros antibióticos (Soriano y Terzolo, 2004).

1.1.7 Inmunidad y Vacunación

La eliminación de las aves enfermas es la medida más eficiente para controlar la enfermedad. En áreas en donde la enfermedad se presenta continuamente, la vacunación es esencial para el control de la CI.

Las aves que se han recuperado de una infección natural o experimental adquieren inmunidad contra infecciones subsecuentes, tanto causadas por el mismo serogrupo de Page que las infectó originalmente, como contra cepas de los otros serogrupos de Page (protección cruzada). Lo mismo ocurre cuando las aves son vacunadas con una cepa viva. Sin embargo, cuando se inyectan cepas muertas la protección cruzada es muy baja o queda limitada al serogrupo que se empleó (Blackall, 1995).

Actualmente para combatir a la CI se producen vacunas trivalentes (constituidas por los tres serogrupos de Page A, B y C) las cuales se encuentran disponibles en el mercado a nivel mundial. Sin embargo, las vacunas "internacionales" no proveen protección contra variantes locales de la bacteria (Blackall, 1999)

1.2 *Haemophilus paragallinarum* (Hpg)

Es una bacteria que fue aislada por primera vez en los años treinta (Blackall, et al., 1997). Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Superreino: Procaryota

Reino: Eubacteria

División: Gracilicutes

Clase: Protobacteria

Familia: *Pasteurellaceae*

Género: *Haemophilus*

Especie: *Haemophilus paragallinarum*

Nota: Recientemente Blackall et al., (2005) propusieron que esta bacteria sea clasificada como *Avibacterium paragallinarum*, pero para realizar este trabajo se empleó la nomenclatura anterior.

Originalmente se informó que esta bacteria era dependiente de dos factores de crecimiento: hemina o factor X y nicotín-adenos-dinucleótido (NAD o factor V) (Blackall, et al., 1997). Posteriormente, se describió el aislamiento de bacterias a partir de aves enfermas con signos clínicos de CI las cuales eran dependientes de NAD, pero no de la hemina (Blackall, 1999).

Aunque se sabe que Hpg es dependiente de NAD, recientemente se han descrito en diferentes países brotes de CI causados por cepas de Hpg que son NAD independientes (Bragg, 2002). Se ha demostrado que estas bacterias adquieren la capacidad de sintetizar el NAD al captar por transformación un plásmido. Este plásmido puede además difundirse por transformación entre distintas cepas de Hpg y posiblemente también entre cepas de otras especies NAD dependientes de las aves. En este mismo trabajo se sugiere que las cepas NAD independientes son más virulentas que las dependientes, aunque se han comparado cepas no

isogénicas, por lo que la mayor patogenicidad puede deberse a diferencias en factores de virulencia más que a la independencia de NAD. (Bragg, 2002).

García et al. (2003) señalaron que en México estos aislados independientes de NAD estuvieron relacionados con un brote de la enfermedad donde se presentó una baja en la postura de un 20% en un periodo de tres semanas y un aumento de la mortalidad de 0.1 al 0.2%.

1.2.1 Características del microorganismo

Hpg es una bacteria Gram-negativa, no esporulada y pleomórfica. Mide de 1 a 3 μm de longitud por 0.4 – 0.8 μm de ancho. También puede observarse como cocobacilos cortos (1.5 μm de largo) que a veces se presentan en pares o cadenas cortas. En cultivo, la morfología microscópica depende de la edad y del medio. Después de 6 a 8 horas en medio enriquecido, predominan las formas cocobacilares pequeñas (Blackall et al., 1997).

Diferentes autores han descrito a Hpg como una bacteria inmóvil (Holt et al., 1994); sin embargo, en un trabajo realizado por Serrano (2004), se ha demostrado que la motilidad de Hpg es posible cuando se varían las condiciones ambientales de crecimiento de la bacteria. Por ejemplo, se determinó que el oxígeno es un factor importante para la motilidad de Hpg, ya que cuando dispone de cantidades mínimas de oxígeno la bacteria migra hacia donde se encuentre un aporte de O_2 . Por otro lado, en las cepas que fueron inducidas a expresar motilidad, se determinó la presencia de una posible flagelina de un peso aproximado de 70 kDa la cual fue reconocida por un anticuerpo dirigido contra el flagelo de *Salmonella typhi*.

Hpg presenta el fenómeno de satelitismo, es decir, las colonias de esta bacteria crecen cerca de los bordes de cepas nodrizas que pueden ser *Staphylococcus aureus* o *S. epidermidis*, las cuales les proporcionan el NAD que requieren para su crecimiento (Soriano y Terzolo, 2004).



Fig.2 Fenómeno de satelitismo de Hpg

En cultivos en agar sangre (24-48 h) las colonias son circulares, convexas, de superficie lisa, y no pigmentadas. Las colonias son más pequeñas si están más alejadas de la cepa nodriza (Hofstad, 1964).

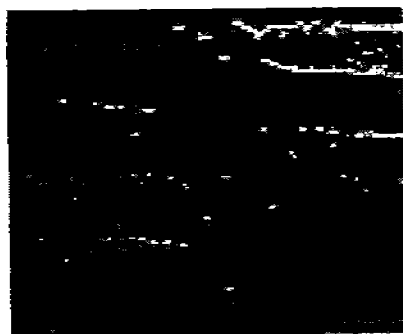


Fig. 3 Morfología colonial de Hpg

1.2.2 Propiedades bioquímicas

Este microorganismo es capaz de crecer bajo condiciones anaerobias. Su temperatura de crecimiento está en el rango de 25 a 45 °C, siendo el rango óptimo de 37 a 38 °C. En la tabla 1 se señalan las características bioquímicas más importantes de esta bacteria (Blackall, et al., 1997).

Tabla 1. Propiedades bioquímicas de *H. paragallinarum*

Prueba Bioquímica	Hpg
Reducción de Nitratos	+
Catalasa	-
Oxidasa	-
Ureasa	-
Indol	-
β -galactosidasa	+
Lisina decarboxilasa	-
Ornitina decarboxilasa	-

Mifflin et al., (1994) señalaron que las cepas independientes de NAD comparten las mismas propiedades bioquímicas de la especie. Sin embargo, Blackall et al., (1997) informaron que las cepas NAD-independientes son negativas a las pruebas de la β -galactosidasa y de fermentación de maltosa.

1.2.3 Clasificación Serológica

La primera clasificación serológica de esta bacteria fue realizada por Page en 1962 usando una prueba de aglutinación en placa, mediante la cual se identificaron tres serogrupos: A, B, y C. Dicha clasificación tiene gran aceptación a nivel mundial. El principal problema de la prueba de aglutinación en placa deriva en que se puede presentar aglutinación espontánea. Iritani et al., (1976) demostraron que el tratamiento de las células bacterianas con tripsina, inhibe la aglutinación espontánea y que estas bacterias aún con tripsina pueden ser detectadas por anticuerpos presentes en el suero del ave.

Kume et al., (1983) propusieron una clasificación serológica alterna basada en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI), y mediante esta técnica, los serogrupos de Page A, C y B fueron clasificados en serogrupos I, II y III, respectivamente, reconociéndose hasta la fecha 9 serovariedades hemoaglutinantes dentro de estos serogrupos (Blackall, et al., 1990).

La organización de los serogrupos es la siguiente:

- Serogrupo A (serogrupo I de Kume) que incluye los serovares de A-1 a A-4
- Serogrupo C (serogrupo II de Kume) formado por los serovares C-1 a C-4
- Serogrupo B (serogrupo III de Kume) en el que se encuentra el serovar B-1. (Eaves, et al., 1989).

1.2.4 Factores de Virulencia

Diferentes factores de virulencia han sido asociados a la patogenicidad de Hpg, entre ellos los antígenos L (sensible al calor y a la tripsina), HL (sensible al calor y resistente a la tripsina), y HS (estable al calor y resistente a la tripsina). Los antígenos L existen en tres formas (L1, L2 y L3). Los primeros antígenos son responsables de la especificidad de serovariedades de Page A y C. Los antígenos restantes son comunes en todas las cepas (Kume et al., 1983).

El antígeno principal de las cepas patógenas es el Hemoaglutinante (AgHem), el cual es muy importante en la serotipificación, la inmunidad y la patogenicidad de la bacteria (Kato et al., 1965).

Hobb et. al., (2002) aislaron de la bacteria una proteína de ~39 kDa reconocida por anticuerpos monoclonales anti-hemaglutinina. Al analizar la secuencia N- terminal, determinaron que la hemaglutinina de Hpg pertenece a la familia de las proteínas de membrana externa (familia OmpA), la cual funciona como adhesina.

Un gran número de especies bacterianas posee una cápsula de polisacáridos en su superficie. La cápsula tiene un papel importante en delimitar el acceso de ciertas moléculas a la membrana celular, participa en la adherencia a las superficies e incrementa la tolerancia bacteriana a la desecación, protege contra los anticuerpos, el complemento y contra la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares (Boyce y Adler, 2000).

En el caso de Hpg, la cápsula también desempeña una función importante en la virulencia de la bacteria, ya que se ha demostrado que los microorganismos capsulados forman colonias iridiscentes y son virulentas, mientras que los no capsulados forman colonias no iridiscentes y son avirulentas. En relación con la severidad de las lesiones, se ha observado que las variantes capsuladas originan

una inflamación aguda en la cavidad nasal y los senos paranasales; en contraste, en pollos donde se inoculó una variante no capsular no se observaron los signos característicos de la CI (Sawata y Toyotsugu, 1985).

Sawata y Kume (1983) observaron que las variantes capsuladas perdían su virulencia cuando eran tratadas con hialuronidasa, sugiriendo que el ácido hialurónico jugaba un papel importante en la virulencia.

El lipopolisacárido (LPS) es uno de los factores de virulencia más importantes de las bacterias Gram-negativas ya que es el responsable de inducir el choque endotóxico. Constituye el antígeno superficial más importante y está compuesto por tres regiones principales: el lípido A, el núcleo de LPS y el antígeno "O". Las propiedades tóxicas de este componente de la membrana externa se asocian principalmente con el lípido A (endotoxina) (Brooks et al., 2005)

Con excepción de la hemaglutinina, de la cápsula y del LPS, los procesos y componentes que le permiten a Hpg colonizar y producir la enfermedad han sido poco estudiados. Trabajos realizados por Iritani et al., (1978 y 1980) demostraron la presencia de antígenos termoestables y termolábiles secretados al medio (el antígeno termoestable ha sido identificado como de naturaleza lipopolisacárida). Mena-Rojas et al., (2004) demostraron la presencia de diferentes antígenos de naturaleza proteínica secretados al medio, los cuales estaban en el rango de 20 a 120 kDa. También se determinó que dichos antígenos eran inmunogénicos, pues fueron reconocidos por sueros de aves con signos de CI pero no por los de aves libres de patógenos específicos.

Entre las proteínas secretadas por Hpg se han descrito dos cuyos pesos moleculares son de aproximadamente 110 y 120 kDa. La proteína de 110 kDa fue reconocida por una mezcla de sueros de cerdos convalecientes de pleuroneumonía (infectados por *Actinobacillus pleuropneumoniae*), así como por un suero contra la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*, sugiriendo que esta proteína de 110 kDa pertenecía a la familia de toxinas RTX (Mena-Rojas, et al., 2004).

Rivero (2005) demostró que entre las proteínas que Hpg secreta al medio exterior existen proteasas (metaloproteasas). La secreción de proteasas por esta bacteria, capaces de actuar a intervalos de pH y temperatura amplios, podría jugar un papel importante en la invasión y el establecimiento del proceso infeccioso, ya que le permitiría a la bacteria obtener nutrientes por la degradación de sustratos de diferentes fuentes, así como modificar o evadir los sistemas defensivos de su hospedero al degradar parcial o totalmente a las inmunoglobulinas.

1.3 Vesículas de Membrana (VM)

La secreción de moléculas tales como proteínas o ácidos nucleicos es un aspecto de la fisiología de los microorganismos, ya que sirve a la bacteria para llevar a cabo procesos biológicos importantes tales como: adhesión e invasión de tejidos; transferencia de información genética; comunicación intercelular bacteria-bacteria, bacteria-hospedero, así como la obtención de nutrientes esenciales. Una de las cuestiones más importantes es el conocer cómo se llevan a cabo estos mecanismos de transferencia (González y Dreyfus, 2003)

Las bacterias Gram-negativas tienen dos diferentes capas membranales: la membrana interna y la membrana externa, las cuales están separadas por el periplasma en el que se encuentran gran variedad de enzimas y componentes estructurales. Este grupo bacteriano ha desarrollado varios mecanismos de secreción de moléculas a través de la membrana externa, entre los que se encuentran: Los sistemas de secreción tipos I, II, III, IV y los autotransportadores (González y Dreyfus, 2003).

Una de las posibles rutas de secreción que se está investigando en años recientes y a la cual se le ha conferido una gran importancia es por medio de la formación de VM (Miller et al., 2003). Este es un proceso que ha sido observado sólo en el grupo de las bacterias Gram-negativas. Fue descrito inicialmente por Devoe en 1973, cuando observó que el meningococo liberaba vesículas durante su crecimiento *in vitro* (Devoe y Gilchrist, 1973).

Desde entonces hasta la fecha son numerosos los trabajos que se han publicado a este respecto, siendo en años recientes cuando mayor auge se le ha dado al estudio de estas VM, ya que estas estructuras están involucradas en muchos procesos que tienen que ver con la virulencia de este importante grupo bacteriano.

Las VM se forman durante la división celular y se liberan al medio de cultivo sólido o líquido (Zhou et al., 1998). Morfológicamente se caracterizan por ser estructuras membranosas y principalmente de forma esférica, cuyo diámetro aproximado es de 50 -250 nm (Beveridge, 1999).

Cuando la bacteria es crecida en condiciones estresantes, es común observar que la cantidad de VM que se están liberando aumenta considerablemente, y su tamaño varía con respecto a las liberadas por bacterias que son crecidas en condiciones normales (Kadurugamuwa y Beveridge, 1997). Un ejemplo de esto son las VM obtenidas de cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* expuestas al antibiótico gentamicina. Los antibióticos aminoglucósidos perturban la membrana externa de las bacterias Gram negativas, lo que ocasiona que se incremente de tres a cinco veces la cantidad de VM, y que el tamaño de estas aumente de 50 nm (que es el tamaño de las VM en cultivos bacterianos en condiciones normales) hasta 200 nm (Kadurugamuwa y Beveridge, 1997).

Hasta la fecha, todas las investigaciones realizadas sobre VM señalan que estas se generan a partir de la membrana externa, y durante la formación de esta estructura se encapsula una pequeña porción del periplasma, por lo que son consideradas como pequeñas partículas de cubierta celular. La cubierta celular, como es conocido, está constituida por la membrana externa, la capa de peptidoglucano y el periplasma (Beveridge, 1999).

Al analizar los componentes estructurales de las VM, podemos encontrar proteínas de membrana externa (OMPs), LPS, fosfolípidos y, como se mencionó con anterioridad, pueden encontrarse también constituyentes periplásmicos (Beveridge, 1999; Henry et al., 2004), todos situados en la posición exacta como los observaríamos en una bacteria, pero a menor escala.

1.3.1 Formación de Vesículas de Membrana

Un mecanismo exacto por medio del cual se explique la formación y liberación de las VM no ha sido dilucidado, por el contrario, hasta la fecha existen diferentes teorías que tratan de dar explicación a este proceso; sin embargo, no se ha dicho la última palabra a este respecto. Lo que sí puede mencionarse, es que cualquiera que sea el mecanismo que origine este fenómeno, es indiscutible la participación de uno o más componentes de la membrana externa (Beveridge, 1999).

La membrana externa está constituida por proteínas, fosfolípidos y LPS. Se ha observado que una de las características principales de la membrana externa es que existe una distribución asimétrica de lípidos entre la cara interna y la externa. La cara interna posee la mayoría de los fosfolípidos y la cara externa contiene todo el LPS (Beveridge, 1999).

Una de las bacterias en la que se han caracterizado ampliamente las VM es *P. aeruginosa*. La membrana externa de esta bacteria posee dos bandas de LPS que corresponden a diferentes serotipos: el A y el B. Sin embargo, las VM solo poseen el serotipo B, el cual es el más electronegativo. Se propone que la bacteria de alguna forma concentra las bandas del serotipo B en pequeñas regiones de la membrana externa generando regiones altamente electronegativas, las cuales al interaccionar con cationes ocasionan que la membrana forme estructuras de alta curvatura, lo que estimula la formación y liberación de VM (Kadurugamuwa y

Beveridge, 1997). Por el contrario, *P. aeruginosa* crecida en presencia de gentamicina libera VM que contienen además de LPS tipo B, LPS tipo A normalmente no presente.

En este modelo propuesto por Kadurugamuwa y Beveridge, (1997) se sugiere que la formación de la VM inicia con una protuberancia de la membrana externa, conforme se va expandiendo en tamaño, el periplasma y todo su contenido se introduce en la VM. La formación se completa cuando la vesícula se libera de la membrana hacia el medio externo.

El peptidoglicano es un componente de la pared celular al cual se le ha relacionado con la formación de VM. Zhou et al., (1998) han señalado que la formación de VM es a consecuencia de que las bacterias Gram-negativas realizan una "reorganización" de la pared celular (recambio). Esta reorganización es definida como la escisión de fragmentos de peptidoglicano de la pared celular pre-existente. Estos productos, que usualmente se encuentran en la forma de péptidos murámicos de bajo peso molecular, no pueden penetrar la membrana externa y entonces son regresados al citoplasma por permeasas. En este proceso se sugiere que estos productos ejercen una "presión de turgencia" en la membrana externa ocasionando que esta se empuje y se forme una ampolla, la cual posteriormente se liberará y constituirá una VM.

Por otro lado, se ha demostrado la liberación de una gran cantidad de VM en mutantes de *Escherichia coli* deficientes en algunas de las proteínas del sistema Tol-Pal, el cual es requerido para mantener la integridad de la membrana externa. Este sistema (Tol-Pal) esta constituido por 5 proteínas las cuales forman un complejo en la membrana interna. Se cree que las interacciones entre estas proteínas participan en la cohesión de la pared (Bernadac et al., 1998).

Para apoyar la importancia de este sistema en la generación de VM se ha demostrado que bacterias de los géneros *Porphyromonas* y *Neisseria*, las cuales naturalmente no poseen el sistema Tol-Pal, liberan grandes cantidades de VM (Henry et. al., 2004).



Fig. 4 Vesículas de membrana de *P. aeruginosa*

2. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado, durante la formación de las VM se encapsulan diferentes moléculas entre las que se encuentran ácidos nucleicos y proteínas, principalmente (Beveridge, 1999). Existen diferentes trabajos en los cuales se han caracterizado los componentes identificados en el interior de las VM. Algunos de ellos se mencionan a continuación.

2.1 Ácidos Nucleicos

En 1985, Kahn et al. informaron un mecanismo por medio del cual *Haemophilus influenzae* y *H. parainfluenzae* generan estructuras a las que describieron como "extensiones membranales" las cuales contenían en su interior DNA. A estas estructuras las denominaron como transformasomas, porque permitían la recombinación genética entre estas estructuras y células bacterianas y además protegían este material genético de la acción de enzimas degradativas (Kahn et al., 1983).

Dorwand y Garon (1989), demostraron que las VM de *N. gonorrhoeae* podían ser separadas al utilizarse gradientes de densidad de sacarosa las cuales sedimentaban en dos fases denominadas como BI y BII. Las BI contenían proteínas de membrana interna y las BII de membrana externa y LPS. Cada una de estas VM contenían además DNA cromosómico y plasmídico, pero sólo los plásmidos asociados a las VM pertenecientes a la fracción BII presentaban resistencia a la acción de nucleasas.

La participación de VM en el intercambio genético al incubar cepas de gonococo con VM de una bacteria productora de penicilinasa (*bla*⁺) o con DNA desnudo con marcadores de resistencia a estreptomicina (*Str*^r) y DNAsa fue demostrada por Dorwand et al. (1989). Las bacterias transformadas incorporaron y expresaron eficientemente los plásmidos con el marcador *bla*⁺ y no se observó la expresión de los genes *str*. Resultados similares empleando VM con ambos marcadores *bla*⁺ *Str*^r indicaron que las vesículas podían mediar la transferencia intracelular de ácidos nucleicos protegidos de la acción de las nucleasas.

La presencia de ácidos nucleicos en VM generó la siguiente pregunta: ¿es la incorporación de ácidos nucleicos un fenómeno al azar o, por el contrario, se trata de un proceso regulado? Kolling y Matthews, (1999) al trabajar con VM de *E. coli* O157: H7 concluyeron que se trataba de un proceso al azar, ya que además de la presencia de diferentes genes implicados en la virulencia de la bacteria (detectados por la utilización de iniciadores específicos para genes de virulencia), se encontró la existencia de genes con función reguladora. Con esto se demostró que no hay preferencia para el empaquetamiento y transporte de genes de virulencia.

2.2 Proteínas

Li et. al., (1998) identificaron peptidoglicano-hidrolasas en VM liberadas por diferentes bacterias, las cuales fueron capaces de lisar otras bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Estos investigadores propusieron que las enzimas presentes en las vesículas podrían ayudarles a estas bacterias a obtener nutrientes e incrementar el espacio disponible, facilitando su colonización.

La presencia de una gran variedad de factores de virulencia que incluían proteasas, fosfolipasa C, peptidoglicano-hidrolasas y pro-elastasa fue descrita por Kadurugamuwa y Beveridge, (1995) en el interior de VM liberadas por *P. aeruginosa*, crecida sin condiciones estresantes.

A. actinomycetemcomitans (bacteria asociada con diversas enfermedades periodontales en seres humanos) libera VM que son ricas en leucotoxina, que es considerada uno de los factores de virulencia más importantes de esta bacteria (Kato et. al., 2002). Del mismo modo, Horstman y Kuehn (2000) reportaron que las VM de *E. coli* enterotoxigénica contenían la enterotoxina termolábil, uno de los principales factores de virulencia responsable de muchas muertes al año en la población infantil.

En *A. pleuropneumoniae*, se encontró que las VM contenían proteasas y exotoxinas (Apx), estas últimas consideradas como el principal factor de virulencia de esta bacteria, ya que son capaces de causar lisis de células inmunes y no inmunes y de originar las lesiones del tracto respiratorio observadas durante la enfermedad (Negrete-Abascal et al., 2000).

P. gingivalis es una bacteria causante de enfermedades periodontales, que participa en la formación de la placa dentobacteriana, un complejo multibacteriano (biofilm) que favorece el desarrollo de caries y gingivitis. Esta bacteria o sus vesículas, pueden mediar la adhesión de bacterias que originalmente no pueden adherirse, facilitando o promoviendo la formación de esta placa (Grenier y Belanger, 1991)

Burkholderia cepacia, bacteria que ha sido reconocida como una de las principales causas de enfermedad pulmonar en pacientes con fibrosis quística, libera VM las cuales contienen diferentes factores de virulencia que participan en la

patogenicidad de la bacteria, entre los que se encuentran una lipasa, fosfolipasa-N, proteasas (metaloproteasas) y peptidoglicano-hidrolasas (Allan et al., 2003).

Fiocca et al., (1999), demostraron que las VM de *Helicobacter pylori* contenían la citotoxina VacA. La toxina contenida en estas VM era internalizada por células de la mucosa gástrica de personas infectadas con *H. pylori*. Por esta razón se propuso que las VM representaban un mecanismo, adicional a las vías de secreción, para la liberación de toxinas bacterianas y antígenos en la mucosa gástrica.

Ciofu et al., (2000) obtuvieron VM que contenían β -lactamasa, la cual estaba codificada en el cromosoma de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística; demostrando también que esta enzima viajaba desde el citoplasma hacia el espacio periplásmico, donde era empacada por las vesículas. Con base en estos resultados se propuso que este proceso podría explicar en parte la generación de resistencia a antibióticos β -lactámicos en los sitios de infección.

Por otro lado, la identificación de diferentes factores de virulencia contenidos en las VM ha iniciado un novedoso e importante campo de estudio para las ciencias médicas. Por ejemplo, las VM se han empleado como vehículos de administración de agentes terapéuticos. Kadurugamuwa y Beveridge, (1998) observaron que *P. aeruginosa* cultivada en presencia de gentamicina genera un mayor número de VM las cuales pueden contener dicho antibiótico. Al mezclar estas vesículas con células de mamíferos que habían sido infectadas intracelularmente con *Shigella flexneri*, las VM se fusionaban con la célula eucarionte y se liberaba al interior el antibiótico, lo que eventualmente causaba la muerte del patógeno invasor.

Otro método que ha sido establecido con fines médicos, es el de utilizar las VM para originar una respuesta inmune ya sea celular o humoral. Drabick et al., (2000) suministraron intranasalmente una vacuna compuesta de VM de *N. meningitidis* a un grupo de 32 personas sanas. Esta vacuna indujo la producción de anticuerpos bactericidas en el 75% de los sujetos, además de una respuesta inmunológica local la cual se detectó en los fluidos nasales. Estos resultados sugieren que el uso de las VM puede inducir tanto inmunidad sistémica como local seguras y efectivas.

De igual importancia ha sido también el crear cepas multiantigénicas, las cuales proporcionen una respuesta inmunológica. La incubación de cepas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* con VM derivadas de *S. flexneri* o *P. aeruginosa*, produjo la incorporación de antígenos en la membrana de las bacterias, es decir, que cada cepa bacteriana poseía un nuevo mosaico de antígenos intermezclados con los antígenos propios de cada bacteria, sin encontrarse pérdida de viabilidad (Kadurugamuwa y Beveridge, 1999)

3. JUSTIFICACIÓN

Como se ha descrito anteriormente, las VM liberadas al medio pueden jugar un papel importante en la virulencia bacteriana, ya que éstas pueden asociarse a los tejidos del hospedero, promover la adhesión de bacterias no adherentes, liberar diferentes factores de virulencia, inducir daño celular y liberar su contenido para transmitir información genética. Adicionalmente, las VM pueden tener aplicación como vehículos terapéuticos. Es por ello que su estudio es de gran relevancia, ya que nos puede permitir un mejor entendimiento de la patogénesis de una enfermedad o de los mecanismos aplicativos que pudiesen tener estas estructuras, pues como se ha informado, las VM pueden ser constituyentes de una vacuna e inducir una inmunidad sistémica y local, segura y sin riesgos de infección.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Obtener y caracterizar las vesículas de membrana de *H. paragallinarum*.

4.2 Particulares

- Obtener las VM de *H. paragallinarum*.
- Determinar las características morfológicas de las VM de *H. paragallinarum* por medio de microscopía electrónica.
- Caracterizar el contenido de las VM.
- Determinar si las VM pueden aglutinar eritrocitos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Cepa Bacteriana y Medio de Cultivo

Se utilizó la cepa de referencia 0083 de *H. paragallinarum*, clasificada serológicamente como perteneciente a la serovariedad A de Page (HpgA), la cual fue proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología Veterinaria de Tehuacán, Puebla (BIOVETSA).

Para el mantenimiento y propagación de la bacteria, ésta se cultivó en infusión cerebro corazón (BHI), suplementado con NAD (10-20 µg/ml) y se incubó a 37°C por 24 h (Mena-Rojas et al., 2004).

5.2 Obtención de Vesículas de Membrana

Las VM de HpgA fueron aisladas de la fase estacionaria temprana, de acuerdo con el método descrito por Kadurugamuwa y Beveridge (1995).

HpgA fue inoculado en BHI e incubado en agitación 2000 x g a 37 °C durante toda la noche. Con este cultivo se inoculó (al 1%) un matraz de 500 ml que contenía 200 ml de BHI y se dejó incubando toda la noche en las mismas condiciones. Después del crecimiento de la bacteria se verificó la pureza del cultivo al sembrarlo en agar BHI junto con la cepa nodriza de *S. aureus*.

Las células bacterianas se separaron por centrifugación a 8000 x g por 20 min. a 4°C; el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de celulosa (0.22 µm) para remover los remanentes celulares.

Las VM se colectaron por centrifugación a 150 000 x g, 3 h, a 4°C, posteriormente fueron lavadas y resuspendidas en 250 µl de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 y mantenidas en congelación a -20°C, hasta su utilización (Kadurugamuwa y Beveridge, 1995).

5.3 Microscopía Electrónica

Para poder determinar la morfología y tamaño de las VM liberadas por HpgA, muestras (20 µl) de VM fueron colocadas en rejillas de cobre recubiertas con Formvar, posteriormente se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico al 1% y se observaron en microscopio electrónico de acuerdo a condiciones ya descritas (Negrete-Abascal et al., 2000).

5.4 Proteínas

Para obtener el perfil proteínico de las VM, se cargaron aproximadamente 12 µg (Bradford, 1976) de proteína por carril y se realizaron corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). Este patrón de proteínas se comparó con los de extractos totales y proteínas secretadas al medio. Las muestras fueron previamente hervidas durante 5 min en presencia de β-mercaptoetanol al 5%.

5.4.1 Proteínas Secretadas: El sobrenadante de cultivo libre de células se precipitó en frío con 1–2 volúmenes de metanol, durante 24 h. Para recuperar las proteínas precipitadas, el sobrenadante se centrifugó a 8 000 x g a 4°C y el concentrado de proteínas fue resuspendido en Tris-HCl 20 mM. (Mena- Rojas et al., 2004).

5.4.2 Proteína Secretada de 110 kDa: Para poder determinar, por inmunoreconocimiento, si esta proteína se encontraba presente en las muestras de VM, se utilizó como control positivo una muestra de la proteína de 110 kDa de HpgA, proveniente de una fracción enriquecida y gentilmente donada por Gómez-Lugo (Gómez-Lugo, 2005).

5.5 Actividad Proteolítica

Para determinar si las VM contenían proteasas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con gelatina al 0.1%. Las muestras no fueron tratadas con β -mercapto etanol ni hervidas. Después de la electroforesis, los geles fueron incubados en amortiguador con Tritón X 100 al 2.5%, durante 1 h. a temperatura ambiente y enseguida, para activar a las proteasas, se utilizó un amortiguador de Tris 50 mM – CaCl₂ pH 7.5. Como controles positivos se emplearon las muestras de proteínas secretadas por HpgA y por *A. pleuropneumoniae*. Al teñir el gel con azul de coomasie, las zonas claras indicaron donde se llevó a cabo la actividad proteolítica (Rivero, 2005).

5.6 Inmunoreconocimiento

Para identificar dentro de las VM de HpgA la presencia de proteasas, de la proteína de 110 kDa descrita en Hpg (Mena-Rojas et. al., 2004) y de proteínas con capacidad inmunogénica se realizó un gel de poliacrilamida al 10% con las muestras de extracto total, VM y proteínas secretadas, las cuales fueron tratadas con β -mercaptoetanol. Después de la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con leche al 1.5% durante 3 h, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween (cada lavado de 10 min.), se adicionó el suero primario el cual se empleó en una

dilución 1:125 (los sueros de aves) y en 1:1000 los de conejo. Los sueros primarios empleados fueron:

- Suero de conejo Anti- proteasa de *A. pleuropneumoniae* serotipo I (Negrete Abascal et al., 1998).
- Suero de conejo anti-proteína de 110 kDa secretada por Hpg (Mena-Rojas et al., 2004)
- Suero de ALPES (Aves libres de patógenos específicos) proporcionado por BIOVETSA (control negativo).
- Suero de aves no vacunadas y desafiadas con Hpg (BIOVETSA)
- Suero de aves vacunadas y desafiadas con Hpg (BIOVETSA)

Se dejó incubar la membrana con el suero primario aproximadamente 3 h. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween para remover cualquier exceso del suero primario. Se agregó el anticuerpo secundario. Los anticuerpos secundarios (Zimed) empleados fueron:

- IgG de cabra anti-conejo
- IgG de conejo anti-pollo (ambos anticuerpos marcados con peroxidasa)

Se dejó la membrana incubando por 3 h, se lavó como se menciona con anterioridad, y se realizó un último lavado con PBS.

Para evidenciar la reacción antígeno – anticuerpo se emplearon diaminobencidina y H₂O₂. La reacción fue detenida colocando la membrana en agua destilada.

5.7 Ácidos Nucleicos

Para determinar si existen ácidos nucleicos al interior de las VM se realizó el siguiente procedimiento: Una muestra de VM obtenida de un cultivo de 200 ml y que correspondía aproximadamente a 2.5 mg en peso húmedo, se resuspendió en amortiguador de acetato de sodio 0.1 M (pH 5.0), cloruro de magnesio 5mM y DNAsa. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 37 °C para permitir la degradación del DNA externo. Pasado este tiempo la mezcla se centrifugó durante 5 min a 14000 x g para recuperar las VM. Posteriormente las VM se resuspendieron en 400 µl de amortiguador de lisis (Tris-acetato 40mM pH7.8, acetato de amonio 20mM, EDTA 1 mM, SDS 1%,), la mezcla se incubó a 70°C durante 10 min. Enseguida la mezcla se incubó a temperatura ambiente en un baño de agua durante 3 minutos. Después se agregaron 150 µl de NaCl 5 M y se mezcló por inversión del tubo durante 30 ciclos. Para retirar los restos de membrana, la mezcla se centrifugó a 14000 x g por 10 min. a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregó un volumen de fenol-cloroformo- alcohol isoamilico 25:24:1, se centrifugó a 12 rpm por 3 min. La fase acuosa se pasó a un tubo nuevo y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto frío; la pastilla se lavó con etanol al 70% y se secó a 65°C por 1 min. La pastilla seca se resuspendió en agua MQ.

5.8 Hemoaglutinación

H. paragallinarum posee la capacidad de aglutinar eritrocitos. Para observar si las VM contienen a la proteína hemaglutinante y si esta puede llevar a cabo esta función, se emplearon eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído al 1% (Instituto Kitazato, Japón) y eritrocitos frescos. Para llevar a cabo la aglutinación, las VM se usaron a la concentración original o se concentraron por centrifugación (14 rpm/15 min/4 °C) y se resuspendieron en un cuarto del volumen original. Se

colocaron los eritrocitos y las VM (muestras normales o concentradas) en una placa de aglutinación en relación 1:1. Posteriormente se mezclaron y se dejaron en agitación por 5 min a temperatura ambiente. La aglutinación se observó visualmente y posteriormente se empleó un microscopio óptico.

6. RESULTADOS

6.1 Vesículas de Membrana de HpgA

Las muestras de VM de HpgA obtenidas por ultracentrifugación fueron teñidas con ácido fosfotúngstico y observadas al microscopio electrónico. En la Fig. 5, se presentan las VM que HpgA liberó al medio (BHI suplementado con NAD) durante el crecimiento de la bacteria. Como puede observarse, estas VM son estructuras membranales, de forma esférica, cuyo tamaño oscila entre 25 a 300 nm.

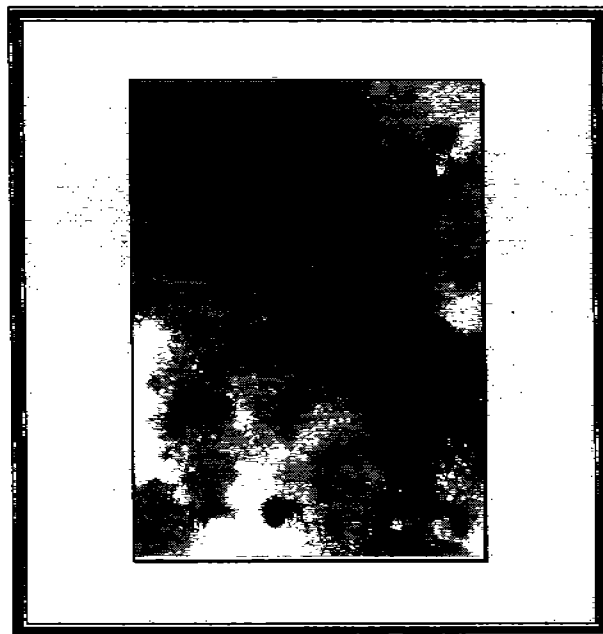


Fig. 5 VM de HpgA teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico al 1%.
Barra= 200 nm

6.2 Perfil proteínico

Con la finalidad de analizar los perfiles proteínicos de las VM, se realizó un análisis electroforético con las muestras de HpgA de extracto total, de VM y de las proteínas secretadas al medio de HpgA (Fig. 6).

El perfil proteínico del extracto total nos permitió observar proteínas en el rango de peso molecular de aproximadamente 160 a 30 kDa (fig. 6 carril 2). El número de proteínas presentes en las VM (Fig. 6, carril 3) es menor que el observado en el extracto total.

Se identificaron proteínas que fluctuaban desde los 160 a los 36 kDa. Se encontraron dos proteínas de alto peso molecular (110 y 120 kDa) en VM (Fig. 6 carril 3) y en las proteínas secretadas (Fig. 6 carril 4), que no se observaron en la muestra del extracto total (Fig. 6, carril 2).

En cuanto al patrón de proteínas secretadas (Fig. 6 carril 4) estas también se encontraron en el rango de 160 a 30 kDa, siendo ocho las bandas predominantes, sin embargo se observaron diferentes bandas de menor intensidad.

Al comparar el patrón de proteínas secretadas con las del extracto crudo (Fig. 6, carriles 4 y 2, respectivamente) se observaron proteínas de peso molecular similar en ambas muestras y que son de 91, 51, 47, 36 y 28 kDa. Las bandas que sólo están en proteínas secretadas y no se observaron en el extracto total corresponden a las proteínas de peso molecular de 120, 110 y 84 kDa.

De la comparación de los patrones de proteínas secretadas con el patrón proteínico de VM se observaron proteínas de pesos moleculares similares que correspondían a bandas de 110-120, 91, 51, 47 y 36 kDa (Fig. 6 carril 3). Hay 3

proteínas secretadas (Fig. 6, carril 4) que no se observaron en el patrón de VM y que correspondían a las bandas de 30, 84 y 100 kDa.

Las proteínas de pesos moleculares similares en las tres muestras: extracto total, VM y proteínas secretadas correspondieron a bandas de 160, 91, 51, 47, 40 y 37 kDa.

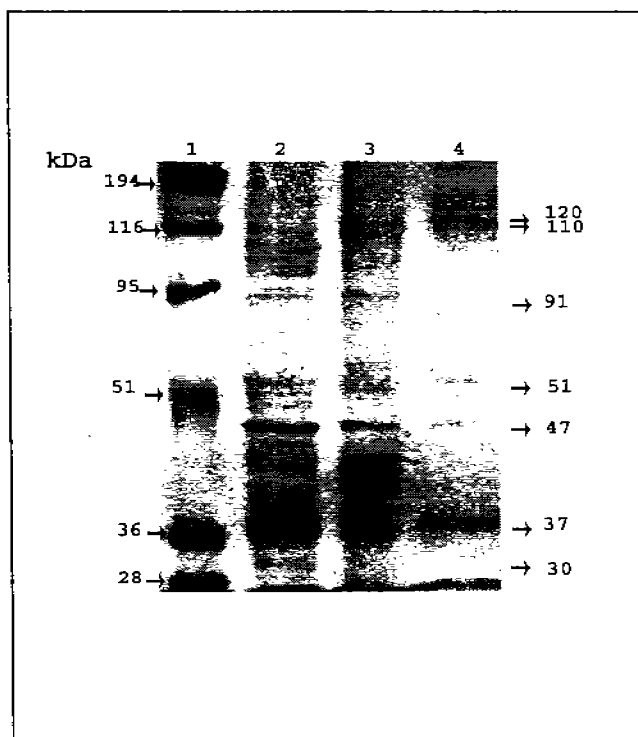


Fig. 6 Patrón de proteínas de HpgA.

- 1 MPM
- 2 Extracto total
- 3 VM
- 4 Proteínas secretadas

6.3 Actividad Proteolítica

Para determinar si las VM de HpgA contenían proteasas, se realizó una electroforesis SDS-PAGE empleando un gel de poliacrilamida al 10 % copolimerizado con gelatina al 0.1%, obteniéndose el resultado mostrado en la Fig.7.

En la muestra de VM de HpgA (Fig. 7 carril 1) no se apreció actividad proteolítica en comparación con la observada en las muestras de proteínas secretadas de HpgA (fig. 7 carril 2) y las de *A. pleuropneumoniae* (Fig. 7 carril 3) utilizadas como controles positivos.

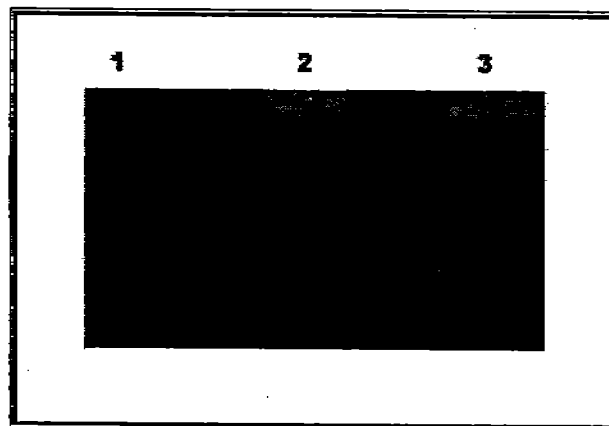


Fig. 7 Actividad proteolítica en gel de poliacrilamida copolimerizado con sustrato (gelatina 0.1%)

- 1 VM de HpgA
- 2 Proteínas secretadas de HpgA
- 3 Proteínas secretadas de *A. pleuropneumoniae*.

6.4 Inmunoreconocimientos

6.4.1 Proteasas

Debido a que en el gel copolimerizado con substrato no se detectó actividad proteolítica en las muestras de VM, se quiso comprobar que efectivamente las VM no contenían proteasas en su interior o, en caso contrario, las llevaban pero estas se encontraban en estado inactivo, para lo cual se realizó un inmunoreconocimiento empleando un suero de conejo Anti- proteasa de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 (Fig. 8). Al igual que en el gel de substrato, se usaron como controles positivos las proteínas secretadas de HpgA (Fig. 8, carril 2) y de *A. pleuropneumoniae* (Fig. 8, carril 3).

Como se muestra en la Fig. 8, carril 1, se observó un reconocimiento inmune en las proteínas de las muestras de VM. El mismo resultado y a pesos moleculares similares puede apreciarse con muestras de las proteínas secretadas por HpgA (Fig. 8, carril 2) y *A. pleuropneumoniae* (Fig. 8, carril 3). Este resultado sugiere que las VM de HpgA contienen proteasas en su interior y que estas proteasas tienen homología con las de *A. pleuropneumoniae*.

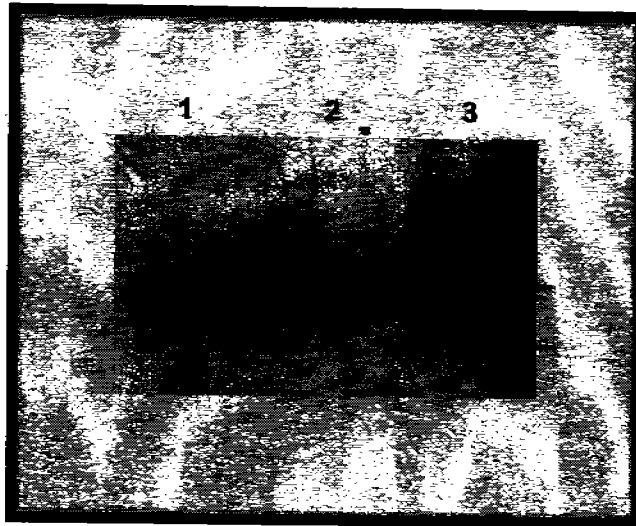


Fig. 8 Reconocimiento de proteínas presentes en VM de HpgA empleando un suero anti- proteasas de *A. pleuropneumoniae*.
 Las flechas corresponden a una banda > 100 kDa y la otra de ~ 90 kDa respectivamente.
 Carril 1 VM de HpgA
 Carril 2 Proteínas secretadas de HpgA
 Carril 3 Proteínas secretadas de *A. pleuropneumoniae*.

6.4.2 Proteína secretada de 110 kDa de HpgA

En la Fig. 9a se presenta un gel de poliacrilamida al 10% donde se observa el patrón de proteínas correspondiente a las muestras de extracto total, VM y proteínas secretadas de HpgA. En el carril 5 se observó una muestra de proteínas enriquecidas con la proteína de 110 kDa secretada de HpgA. Esta proteína fue empleada como un control positivo para realizar el inmunoreconocimiento.

El Western Blot (Fig. 9b) nos muestra el inmunoreconocimiento obtenido al usar un suero policlonal de conejo anti-proteína 110 kDa secretada por Hpg. Este reconocimiento se observó fuertemente en la muestra de VM (Fig 9b, carril 2), en

las proteínas secretadas (carril 3) y en la fracción enriquecida usada como control positivo (carril 4), pero en la muestra de extracto total este reconocimiento fue muy tenue (carril 1).

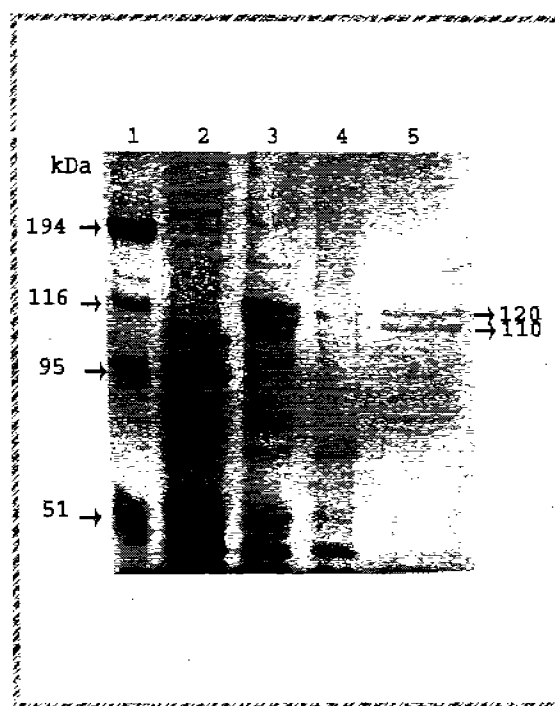


Fig. 9a Gel de poliacrilamida al 10% mostrando el perfil proteico de diferentes muestras de HpgA.

Carril 1 MPM

Carril 2 Extracto total

Carril 3 VM

Carril 4 Proteínas secretadas

Carril 5 Fracción enriquecida de las proteínas secretadas de 110-120 kDa

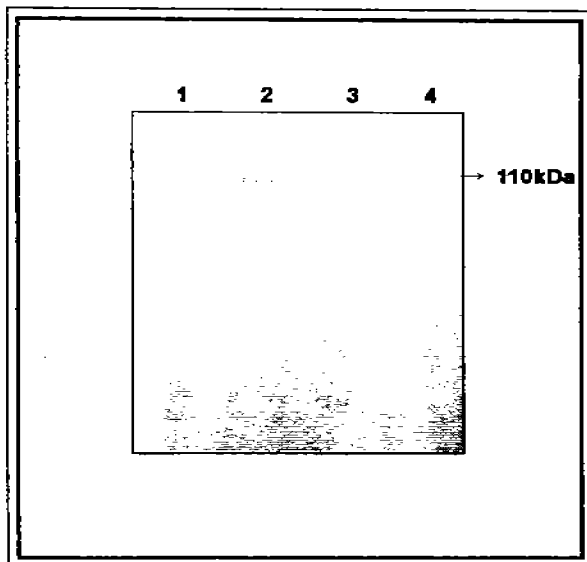


Fig. 9b. Inmunoreconocimiento de la proteína de 110 kDa en muestras de HpgA.

Carril 1 Extracto total
 Carril 2 VM de HpgA
 Carril 3 Proteínas secretadas
 Carril 4 Fracción enriquecida de las proteínas secretadas de 110-120 kDa

6.4.3 Suero de ALPES

Al usar una mezcla de sueros de ALPES se observó un reconocimiento muy tenue de bandas de alrededor de 51 kDa tanto en las muestras de extracto total como en las de VM (Fig. 10a, carriles 1 y 2 respectivamente); pero no se encontró reconocimiento en la muestra de proteínas secretadas (carril 3).

6.4.4 Suero de aves no vacunadas y desafiadas con Hpg

En la Fig. 10b se muestran las bandas de reconocimiento cuando se incubó la membrana de nitrocelulosa con este suero inmune. En la muestra correspondiente al extracto total (Fig. 10b carril 2) se observó que hubo reacción cruzada con bandas cuyos pesos moleculares están en el rango de 110 a 28 kDa; en las muestras de VM (Fig. 10b carril 3) las proteínas que se reconocieron están en el rango de los 120 a los 28 kDa y en las muestras de proteínas secretadas (Fig. 10b carril 4) se observaron proteínas de 120 a 36 kDa.

Al realizar la comparación entre la muestra de extracto total (Fig. 10b carril 2) con VM se observó que existen las mismas proteínas con capacidad inmunogénica (110, 105, 92, 80, 58, 51, 48, 42, 40, 36, 35, 30 y 28 kDa) a excepción de la proteína de 120 kDa presente en VM de HpgA (Fig. 10b carril 3).

Por otro lado, las proteínas de 120, 110, 105, 58, 51, 42 y 36 kDa que fueron reconocidas en proteínas secretadas (Fig. 10b carril 4) están presentes en VM (Fig. 10 carril 3). Al Comparar las proteínas secretadas con la muestra de extracto total (Fig. 10b carril 2), se encontró igualmente las mismas proteínas arriba señaladas salvo la proteína de 120 kDa.

6.4.5 Suero de aves vacunadas y desafiadas con Hpg

Al emplear el suero de aves vacunadas y desafiadas con Hpg, se observó inmunoreconocimiento en la muestra de extracto total (Fig. 10c, carril 2), de las VM (fig.10c, carril 3) y de las proteínas secretadas (Fig. 10c, carril 4) de HpgA, En la muestra de extracto total (Fig. 10c, carril 2) hay proteínas con capacidad inmunogénica que poseen pesos moleculares en un rango de los 105 a los 28 kDa. Con respecto a VM (Fig.10c, carril 3) se reconocieron proteínas de pesos moleculares que van de los 110 a los 28 kDa. En proteínas secretadas las bandas tienen pesos moleculares de 120 a 30 kDa.

Como puede observarse se reconocieron las mismas bandas en la muestra de extracto total (Fig. 10c, carril 2) y en VM (Fig.10c, carril 3), con excepción de la que corresponde a 110 kDa. Las bandas que sí se encontraron en ambas muestras son: 105, 95, 80, 57, 51, 49, 48, 46, 42, 40, 38, 36, 35, 34, 30, 28 kDa. En proteínas secretadas (Fig.10c, carril 4) se reconocieron bandas que corresponden a los pesos moleculares de 120, 110, 105, 95, 90, 57, 51, 49, 48, 46,

42, 38,36 y 28 kDa, siendo la banda de 120 kDa la única que no se apreció en la muestra de VM (Fig.10c, carril 3).

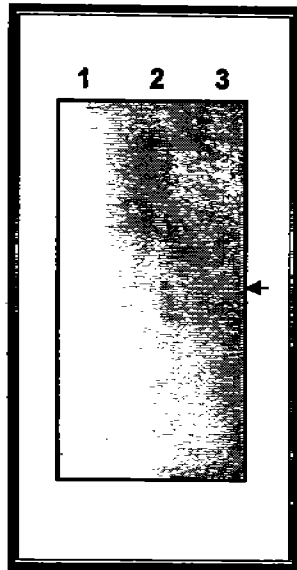


Fig 10a Inmunoreconocimiento de proteínas de HpgA empleando un suero de aves libre de patógenos específicos (ALPES). La flecha corresponde a una banda de 51 kDa.

Carril 1 Extracto total
Carril 2 VM
Carril 3 Proteínas secretadas

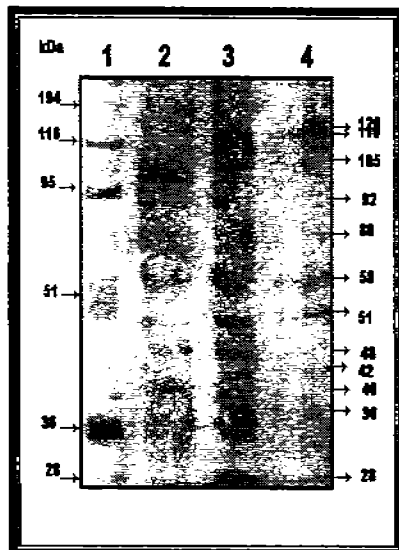


Fig. 10b. Inmunoreconocimiento de proteínas de HpgA con suero de aves no vacunadas y desafiadas con Hpg

Carril 1 MPM
Carril 2 Extracto total
Carril 3 VM
Carril 4 Proteínas secretadas

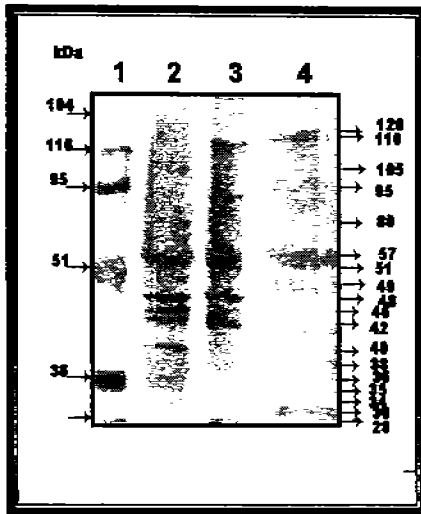


Fig. 10c. Immunoreconocimiento de proteínas de HpgA con un suero de aves vacunadas y desafiadas con Hpg.

Carril 1 MPM
 Carril 2 Extracto total
 Carril 3 VM
 Carril 4 Proteínas secretadas

6.5 Ácidos Nucleicos

Con el fin de conocer si las VM de HpgA contenían ácidos nucleicos, se realizó una técnica propuesta en este laboratorio (manuscrito en preparación). Como se muestra en la Fig. 11 se comprobó la presencia de ácidos nucleicos en VM de HpgA.

En el gel de agarosa mostrado en la Fig. 11 se observa una banda que corresponde a los ácidos nucleicos (carril 2) presentes en las VM de HpgA. Esta banda posee un peso aproximado de 12 kb.

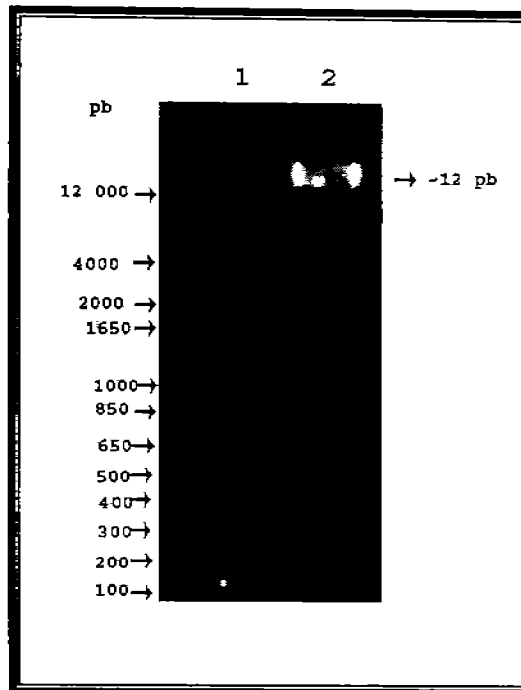


Fig. 11. Ácidos nucleicos obtenidos de VM de HpgA en gel de agarosa al 0.8%.

Carril 1 Marcador 1 kb Ladder
 Carril 2 Ácidos nucleicos de VM de HpgA

6.6 Hemaglutinación

Dado que uno de los factores de virulencia más importantes de Hpg es la hemaglutinina, se realizaron pruebas para poder determinar si esta adhesina se encontraba presente en VM de HpgA. Estas pruebas consistieron en observar si existía o no aglutinación de eritrocitos de pollo, frescos o fijados con glutaraldehído, al emplear a las VM de HpgA (Fig. 12).

Como se observa en la Fig. 12B la aglutinación sólo pudo ser observada empleando los eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído al 1 %. Esta aglutinación sólo se observó cuando se emplearon las muestras de VM concentradas, y fue escasa o nula cuando se emplearon muestras de VM sin concentrar o cuando se usaron los eritrocitos de pollo frescos (Fig. 12A).



A

B

Fig. 12. Aglutinación de eritrocitos de pollo por VM de HpgA observada al microscopio óptico.

A Eritrocitos de pollo frescos

B Eritrocitos fijados con glutaraldehído al 1%

7. DISCUSION

Un proceso que parece ser exclusivo del grupo de las bacterias Gram negativas es la formación y liberación de estructuras membranales conocidas como vesículas de membrana (VM). Hasta el momento se ha descrito que estas VM tienen su origen en la membrana externa característica de este grupo bacteriano. El proceso por medio del cual se lleva a cabo la formación de las VM no ha sido explicado aún; sin embargo, las teorías postuladas hasta el momento involucran la participación de al menos un componente de la pared celular de las bacterias, ya sea el LPS (Kadurugamuwa y Beveridge, 1999), el péptidoglicano (Zhou et al., 1998) o componentes que son responsables de la estabilidad de la membrana externa como es el caso del sistema Tol-Pal (Bernadac et al., 1998).

Las VM son constantemente liberadas al medio desde la superficie de la bacteria, cuando ésta se encuentra en crecimiento. Se ha descrito que las VM contienen en su interior diferentes componentes: proteícos, lipídicos y nucleicos, los cuales participan en diversos procesos relacionados con la virulencia, entre los que destacan la adhesión a tejidos, la comunicación bacteria-bacteria o bacteria-hospedero y la transmisión de información genética (Beveridge, 1999).

En este trabajo se comprobó que HpgA también libera VM con forma esférica y de un tamaño que oscila entre los 25 a 300 nm (Fig. 5); este resultado concuerda con lo descrito por otros autores al estudiar diferentes géneros bacterianos y de los cuales obtuvieron VM sin modificar las condiciones de crecimiento bacteriano. Por ejemplo, Negrete-Abascal et al., (2000) determinaron que *A. pleuropneumoniae* liberaba al medio de cultivo VM de 20 a 200 nm de diámetro.

El tamaño y las características morfológicas de las VM de HpgA también son similares a otras VM de bacterias que durante su crecimiento fueron sometidas a alguna forma de estrés. Se ha demostrado que la cantidad o el tamaño de las VM se modifican bajo estas condiciones. Por ejemplo: Kadurugamuwa y Beveridge (1995) obtuvieron VM de 100-200 nm al cultivar a *P. aeruginosa* en presencia de gentamicina. El tamaño de las VM de esta bacteria en cultivos sin antibiótico, es de unos 50 nm de diámetro. Por otro lado, Sabra et. al., (2003) señalaron que *P. aeruginosa* crecida bajo estrés de oxígeno (pO_2 ~350%) liberaba VM cuyo tamaño, 24-50 nm, era mucho menor que el de las liberadas cuando la bacteria crece en condiciones normales.

Dado que en este trabajo sólo se planteó el demostrar la presencia de VM liberadas por HpgA, sería interesante observar en trabajos posteriores si la presencia de agentes estresantes como los reportados en la bibliografía afecta de igual forma la producción y el tamaño de las VM de HpgA.

7.1 Perfil proteínico

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el patrón de proteínas de las VM de HpgA es muy similar al del extracto total (Fig. 6, carriles 2 y 3). Dado que la VM se origina de la membrana externa, es posible imaginar que las bandas que encontramos en ambos patrones corresponden principalmente a las proteínas de membrana externa y en menor grado a algunas proteínas periplásmicas.

En VM (Fig. 6, carril 3) podemos observar dos proteínas de alto peso molecular (110 y 120 kDa) (Fig. 6), que no se observaron en el patrón del extracto total, pero sí entre las proteínas secretadas. (Fig.6, carril 4). La presencia de estas proteínas de alto peso molecular en el extracto total se corroboró por medio del

Western blott, ya que, como puede observarse en las figuras 9b y 10b carril 2, en la muestra de extracto total hay reacción cruzada con el suero anti-proteína de 110 de Hpg y con los sueros de aves no vacunadas y desafiadas, respectivamente, lo que confirma la presencia de la proteína de 110 kDa en la célula bacteriana.

Al comparar el patrón de VM con el de proteínas secretadas, se aprecia que las diferencias entre los patrones son más marcadas; sin embargo, muchas de las proteínas secretadas se encuentran presentes en VM (Fig. 6, carril 4). La liberación de proteínas en las bacterias Gram-negativas constituye uno de los procesos biológicos más importantes. La vía por la cual estas proteínas salen al medio exterior inicia en el citoplasma e implica el paso por la membrana interna, el periplasma y la membrana externa (Lory, 1992). Como se ha mencionado, durante la formación de las VM quedan atrapados componentes que se encuentren en el periplasma; si estos componentes son proteínas que se encuentran en tránsito de secreción se explicaría la presencia de algunas de las proteínas secretadas de HpgA en VM (Fig. 6 carril 3 y 4).

Uno de los datos que aporta este trabajo que es de gran interés para nuestro equipo de trabajo es la presencia de la proteína de 110 kDa en VM de HpgA (Fig. 6 carril 3). Esta proteína de 110 kDa podría ser la proteína RTX-like descrita previamente por Mena-Rojas et. al., (2004), la cual constituye una de las proteínas con capacidad inmunogénica que Hpg libera al medio.

Dentro del grupo de las bacterias Gram-negativas, las toxinas RTX pertenecen a una familia de proteínas cuyas características principales son las siguientes: son proteínas con un peso molecular 100 -120 kDa y que contienen repetidos de glicina en la región C-terminal, los cuales son responsables de la unión del calcio, el cual es requerido para la actividad tóxica (Kachlany, et al., 2000). Las toxinas RTX se subdividen en dos categorías basadas en la especificidad a su célula blanco. Las hemolisinas RTX como la α -hemolisina de *E.*

coli (HlyA) y la ApxI de *A. pleuropneumoniae* son tóxicas para muchos tipos celulares de diferentes especies, como por ejemplo, eritrocitos, fibroblastos de embrión de pollo, granulocitos de conejo y ratón, etc. La otra categoría de proteínas RTX, incluye a la leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* (LtxA) y la de *Manhemia haemolytica* (LktA), las cuales son tóxicas para un grupo restringido de células. Así pues, la LtxA mata linfocitos y granulocitos de humanos y simios, mientras que la LktA es específica contra células linfoides bovinas (Lally, et al., 1999).

La presencia de proteínas pertenecientes a la familia de toxinas RTX en VM ha sido descrita por diferentes investigadores. Negrete-Abascal et al., (2000) encontraron en VM de *A. pleuropneumoniae* la presencia de toxinas Apx. Por medio de inmunoreconocimiento se determinó que estas toxinas están en el extracto crudo, en VM y en proteínas secretadas. El resultado obtenido con las VM de HpgA (Fig. 10b y 10c) concuerda con lo reportado por Negrete Abascal et al., (2000).

Por otro lado, en trabajos realizados con anterioridad por Kato et al., (2002) se determinó que las VM de *A. actinomycetemcomitans* transportan en su interior a la leucotoxina (LtxA). Los autores propusieron que esta toxina se encontraba “concentrada” en grandes cantidades en las VM de *A. actinomycetemcomitans*, ya que estas eran sumamente tóxicas para leucocitos humanos. Dado que hasta el momento no se ha señalado cual es la célula blanco para la proteína de 110 kDa de HpgA, no se puede concluir que ocurra el mismo fenómeno reportado por Kato et al., (2002)

La presencia de la leucotoxina en VM de *A. actinomycetemcomitans* se debe a que esta toxina se asocia a la envoltura celular (Berthold et al., 1992), por lo que existe la posibilidad de que la proteína de 110 kDa de HpgA también se encuentre asociada a la membrana externa, y durante la formación de la VM, esta proteína quede incluida.

Para comprobar que efectivamente la proteína de 110 kDa que se encuentra también en VM de HpgA, es la misma que describió Mena-Rojas et. al., (2004), se realizó un inmunoreconocimiento donde se empleó un suero de conejo contra la proteína secretada de 110 kDa (Mena-Rojas et. al., 2004) (Fig. 9b carril 2). Se observa que la proteína sólo está presente en VM y en proteínas secretadas (Fig. 9 carril 2 y 3). El inmuno reconocimiento por estos anticuerpos en las muestras correspondientes al extracto total (Fig. 9 carril 2) fue muy tenue.

Aunque no se ha confirmado, diferentes autores han propuesto que la incorporación de proteínas a las VM puede implicar un mecanismo de liberación de toxinas. Li et al., (1998) sugirieron que posiblemente las VM sean estructuras que la bacteria utiliza para concentrar en ellas componentes periplásmicos por lo que pueden enviarlas al medio exterior para que realicen funciones específicas.

7.2 Actividad Proteolítica

Las proteasas son enzimas degradativas que hidrolizan parcial o totalmente a las proteínas rompiendo enlaces peptídicos. Constituyen para las bacterias un mecanismo por medio del cual pueden hacerse de nutrientes, además de ser consideradas como un factor de virulencia (Rao, 1998)

En trabajos anteriores realizados por Rivero, (2005) se determinó la existencia de proteasas secretadas por Hpg las cuales pertenecen al grupo de las metaloproteasas. En los resultados obtenidos en este trabajo, se determinó que las proteínas contenidas en las VM de HpgA no tienen la capacidad de degradar sustrato, lo que inicialmente nos indicaría la ausencia de proteasas en el interior de las VM (Fig. 7 carril 1); sin embargo, se observó inmunoreconocimiento de dos proteínas contenidas en VM con el anticuerpo contra la proteasa de *A. pleuropneumoniae* lo que sugiere la presencia de proteínas similares a las de *A. pleuropneumoniae* (Fig. 8 carril 1). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Negrete-Abascal et al., (2000), quienes tampoco observaron la acción de las proteasas en VM de *A. pleuropneumoniae* por los mismos métodos que se emplearon en este trabajo; sin embargo, la presencia de proteasas se puso en evidencia por métodos inmunológicos (Fig. 8) al emplear un anticuerpo dirigido contra las proteasas de *A. pleuropneumoniae* indicando que las proteasas estaban presentes, pero no se encontraban activas.

Kadurugamuwa y Beveridge, (1997) observaron también que enzimas como la elastasa están presentes en VM, pero carecen de actividad. Los autores señalan que la enzima una vez que transloca la membrana plasmática y llega al periplasma, se encuentra en un estado de pro-enzima (pro-elastasa), por lo que carece de actividad. Por lo que podemos suponer que en el caso de las proteasas presentes en VM de HpgA está ocurriendo un proceso similar.

7.3 Inmunoreconocimiento empleando suero de ALPES; suero de aves no vacunadas-desafiadas y suero de aves vacunadas- desafiadas con Hpg.

Como se muestra en las figuras 10b y 10c, las VM poseen casi las mismas proteínas con capacidad inmunogénica que posee el extracto total y las proteínas que son secretadas al exterior. Dado que la gran mayoría de las proteínas presentes en VM reaccionaron con los sueros empleados, es posible pensar que las VM de HpgA pueden servir como inmunoestimuladores. El inocular las VM al hospedero semejaría a una colonización natural del microorganismo por lo que se produciría una respuesta inmune similar eliminando los riesgos de un proceso infeccioso (Drabick et al., 2000).

Por otro lado, como se mencionó con anterioridad uno de los problemas de la industria avícola es que no hay una vacuna eficaz para combatir a la CI (Soriano y Terzolo, 2004), por lo que las VM de Hpg pueden ser constituyentes de una vacuna. Beveridge (1999), señala que esto es posible dado que las VM poseen características estructurales propias de la bacteria además de transportar en su interior diferentes factores de virulencia. Existen varios trabajos en donde se han empleado a las VM como constituyentes de una vacuna con buenos resultados (Drabick et al., 2000; Fukasawa et al., 1999).

Se ha determinado que cuando se emplean vacunas contra la CI constituidas por cepas muertas la protección cruzada es muy baja o queda limitada al serogrupo que se empleó (Soriano y Terzolo, 2004). Una solución para este problema puede ser la formación de vacunas bi o trivalentes. Se ha comprobado que es posible emplear las VM de un serogrupo determinado y combinarlas con moléculas que pertenezcan a otro diferente. Esto fue determinado por Fukasawa et al., (1999) quienes crearon una vacuna bivalente contra el meningococo al combinar las VM de *Neisseria meningitidis* serogrupo B con polisacáridos del serogrupo C. Se demostró que había una respuesta

inmunológica muy fuerte en los ratones empleados en este estudio, la cual se manifestaba con altos títulos de IgG y de anticuerpos bactericidas.

7.4 Ácidos Nucleicos

La presencia de ácidos nucleicos en el interior de VM de HpgA (Fig. 11) concuerda con lo reportado por Dorwand et al., (1989), quienes encontraron que las VM de *N. gonorrhoeae* contenían RNA, DNA lineal y plásmidos. Las VM fueron capaces de mediar la transferencia de estos plásmidos a células de *N. gonorrhoeae* que no los poseían y las bacterias transformadas expresaban los genes plasmídicos. Dorwan y Garon, (1989) encontraron un número limitado de proteínas que unen DNA en VM de *N. gonorrhoeae*, demostrando con ello que este es uno de los mecanismos que permite la incorporación de ácidos nucleicos.

Por otro lado, Kolling y Matthews (1999) encontraron que las VM de *E. coli* O157:H7 llevan en su interior DNA que corresponde a distintos genes de virulencia los cuales pudieron ser transferidos a otras *E. coli*. Los autores concluyeron que la incorporación de ácidos nucleicos a las VM es un fenómeno al azar, ya que no sólo encontraron en ellas diferentes genes implicados en la virulencia de la bacteria (tanto cromosómicos como de un profago), sino también genes que participan en procesos de regulación bacteriana.

Una de las propiedades más importantes que poseen las VM que posiblemente ayude al proceso de transferencia de material genético, es la resistencia a la acción de nucleasas (Dorwand y Garon, 1989).

Actualmente se está caracterizando la naturaleza de los ácidos nucleicos contenidos en las VM de HpgA y se determinará si éstas son capaces de mediar la transferencia de información genética entre bacterias.

7.5 Hemoaglutinación

Las hemoaglutininas pertenecen a un grupo de proteínas llamadas adhesinas. La hemaglutinina de *H. paragallinarum* es una adhesina filamentosa que tiene un peso aproximado de 39kDa, la cual interactúa con receptores presentes en la superficie de las células epiteliales del aparato respiratorio superior de las aves (Hobb et. al., 2002)

Los resultados presentados en la fig. 12B muestran que la hemoaglutinación con VM de HpgA ocurre sólo cuando los eritrocitos de pollo se encuentran fijados con glutaraldehído al 1%. Esto se debe a que se ha demostrado que cuando los eritrocitos son tratados con tripsina y formalina ó se fijan con glutaraldehído se incrementa la actividad del antígeno hemoaglutinante (Blackall, et al., 1997).

El antígeno hemoaglutinante es una proteína de gran importancia tanto en la patogenicidad como la inmunogenicidad de las cepas de Hpg, ya que se ha demostrado que las cepas empleadas para la elaboración de vacunas deben hemoaglutinar para ser protectoras (Blackall y Yamamoto, 1989).

8. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron VM de HpgA de 25-250 nm de diámetro.
- Las proteínas comunes presentes en la muestra de extracto total, VM y proteínas de membrana son las de 91, 47, 51, 40 y 36 kDa.
- Existen proteínas de 110-120 kDa en proteínas secretadas y VM, pero que se observan en escasa cantidad en extractos celulares.
- La proteína de 110 kDa de VM de HpgA fue reconocida por un suero contra la proteína secretada de 110 kDa de Hpg.
- Existen probables proteasas en VM aunque en estado inactivo.
- Las proteínas presentes en VM de Hpg son inmunogénicas
- Las VM contienen ácidos nucleicos en su interior.
- Las VM contienen a la hemaglutinina.

9. BIBLIOGRAFÍA

Allan, N.; Kooi, C.; Sokol, P.; Beveridge, T. 2003. Putative virulence factors are released in association with membrane vesicles from *Burkholderia cepacia*. *Can. J. Microbiol.* 49: 613 – 624.

Bernadac, A.; Gavioli, M.; Lazarroni, J.; Raina, S.; Lloubes, R. 1998. *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 180: 4872-4878.

Berthold, P.; Forti, I.; Kieba, R.; Rosebloom, J.; Taichman, N.; Lally, E. 1992. Electron immunocytochemical localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin. *Oral Microbiol. Immunol.* 7:24-27.

Beveridge, T. 1999. Structure of Gramnegative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 181: 4725- 4733.

Black, A. 1997. Bacterial and parasitic diseases of New Zealand poultry. *Surveillance* 24: 3-5.

Blackall, P. 1999. Infectious Coryza: Overview of the disease and new diagnostic options. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 627-632.

Blackall, P.; Christensen, H.; Beckenham, T.; Blackall, L.; Bisgaard, M. 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 353–362

Blackall, P.; Matsumoto, M.; Yamamoto R. 1997. Infectious Coryza. In: Diseases of Poultry. Poultry Diseases. 10th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa. 179-190 pp.

Blackall, P. 1995. Vaccines against infectious coryza. *Worlds Poult. Sci. J.* 51: 17-26.

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

Blackall, P.; Yamamoto, R. 1989. *Haemophilus paragallinarum* a re-examination. *J.Gen. Microbiol.* 135: 469-474.

Blackall, P. 1988. Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 32: 742-747.

Boyce, J. D. and Adler, B. 2000. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect. Immun.* 68:3463-3468.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microGram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.

Bragg, R. 2002. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part. 1: NAD-dependent field isolates. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 69: 163-169.

Bragg, R. 2002. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part. 2: Naturally occurring NAD-independent field isolates. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 69: 171-175.

Brooks, G.; Butel, J.; Morse, S. 2005. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Editorial Manual Moderno. 18ª edición. pp 15-29.

Ciofu, O.; Beveridge, T.; Kadurugamuwa, J.; Rasmussen, J.; Hoiby, N. 2000. Cromosomal β -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 45:9-13.

Devoe, I.; Gilchrist, J. 1973. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. J. Exp. Med. 138: 1156 -1167.

Dorwand, D.; Garon, C.; Judd, R. 1989. Export and intracellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Bacteriol. 171: 2499-2505.

Dorwand, D; Garon, C. 1989. DNA – Binding proteins in cells and membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Bacteriol. 171: 4196-4201.

Drabick, J.; Brandt, B.; Moran, E.; Saunders, N.; Shoemaker, D.; Zollinger, W. 2000. Safety and immunogenicity testing of an intranasal group B meningococcal native outer membrane vesicle vaccine in healthy volunteers. Vaccine 18:160-172.

Eaves, I.; Rogers, G.; Blackall, P. 1989. Comparison of hemagglutinating and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinating serovar. J. Clin. Microbiol. 27: 1510-1513.

Fiocca, R.; Necchi, V.; Sommi, P; Ricci, V.; Telford, J.; Cover, T.; Solcia, E. 1999. Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. J. Pathol. 188: 220-226.

Fukasawa, L.; Gorla, M.; Schenkman, R.; García, L.; Carneiro, S.; Raw, I.; tanizaki, M. 1999. *Neisseria meningitidis* serogroup C polysaccharide and serogroup B outer membrane vesicles conjugate as a bivalent meningococcus vaccine candidate. *Vaccine* 17: 2951-2958.

García, J.; Angulo, E.; Blackall, P.; Ortiz, A. 2003. The presence of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Haemophilus paragallinarum* in México. *Avian Dis.* 48: 425-429.

Gómez-Lugo, G. 2005. Determinación de los factores que favorecen la expresión de una proteína de 110 kDa en *Haemophilus paragallinarum*. Tesis de Licenciatura. FES- Iztacala. UNAM. (manuscrito en preparación).

González, B.; Dreyfus, G. 2003. Sistema de secreción de proteínas en las bacterias Gramnegativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico* 27: 45- 63.

Grenier, D.; Belanger, M. 1991. Protective effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles against bactericidal activity of human serum. *Infec. Immun.* 59: 3004-3008.

Henry, T.; Pommier, S.; Journet, L.; Bernadac, A.; Grovel, J.; Lloubes, R. 2004. Improved methods for producing outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Res. Microbiol.* 155: 437-446

Hobb, R.; Tseng, H.; Downes, J.; Terry, T.; Blackall, P.; Takagi, M.; Jennings, M. 2002. Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology* 148: 2171-2179.

- Hofstad, M. 1964. Coriza infecciosa y enfermedad respiratoria crónica. In: Enfermedad de las aves. Edit. Hispano Americana. 1ra. Ed. pp 320 – 324.
- Holt, J.; Kreing, N.; Sneat, A.; William, S. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed Williams and Wilkins. 9a edición. pp. 215-217.
- Horstman, A.; Kuehn, M. 2000. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. J. Biol. Chem. 275:12489-12496.
- Iritani, Y.; Hidaka, S. 1976. Enhancement of hemagglutinating activity of *Haemophilus paragallinarum* by trypsin. Avian Dis. 20: 614- 616.
- Iritani, Y.; Iwaki,S.; Katagiri, K. 1978. Production of extracellular antigen in culture supernate by *Haemophilus paragallinarum*. J. Comp. Path. 88: 395- 399.
- Iritani, Y.; Iwaki,S.; Yamaguchi, T. 1980. Properties of heat-stable antigen in the culture supernate of *Haemophilus paragallinarum*. Jpn. J. Vet. Sci. 42: 635-641.
- Kachlany, S.; Fine, D.; Figurski, D. 2000. Secretion of RTX leukotoxin by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect. Immun. 68: 6094-6100.
- Kadurugamuwa, J.; Beveridge, T. 1999. Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other Gram-negative bacteria. Microbiology. 145: 2051-2060.
- Kadurugamuwa, J.; Beveridge, T. 1998. Delivery of the non-membrane-permeative antibiotic gentamicin into mammalian cells by using *Shigella flexneri* membrane vesicles. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1476-1483.

Kadurugamuwa, J.; Beveridge, T. 1997. Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 615-621.

Kadurugamuwa, J.; Beveridge, T. 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* 177: 3998-4008.

Kahn, M.; Barany, F.; Smith, H. 1983. Transformasomes: specialized membranous structures that protect DNA during *Haemophilus* transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 6927-6931.

Kato, S.; Tsubahara, H.; Okuma, S. 1965. Infectious coryza of chickens. VI. Hemagglutinating properties of *Haemophilus paragallinarum*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 27: 457.

Kato, S.; Kowashi, Y.; Demuth, D. 2002. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb. Pathog.* 32: 1-13.

Kolling, G.; Matthews, K. 1999. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1843-1848.

Kume, K.; Sawata, T.; Nakai, T.; Matsumoto, M. 1983. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J. Clin. Microbiol.* 17: 958-964.

Lally, E.; Hill, R.; Kieba, R.; Korostoff, I. 1999. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.* 7: 356-361.

Li, Z.; Clarke, A. and Beveridge, T. 1998. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J. Bacteriol.* 180: 478-5483.

Lory, S. 1992. Determinants of extracellular protein secretion in Gram-Negative bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 3423-3428.

Mena-Rojas, E.; Vázquez, C.; Vaca, S.; García, O., Pérez-Márquez, V.; Pérez-Méndez, A.; Ibarra, J.; de la Garza, M.; Zenteno E.; Negrete-Abascal, E. 2004. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110 kDa putative RTX-protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 232: 83-87.

Mifflin, J.; Horner, R.; Blackall, P.; Chen, X.; Bishop, G.; Morrow, C.; Yamaguchi, T.; Iritani, Y. 1994. Phenotypic and molecular characterization of V-factor (NAD)-independent *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 39: 304-308.

Miller, S.; Bader, M.; Guina, T. 2003. Bacterial vesicle formation as a mechanism of protein transfer to animals. *Cell* 115: 2-3.

Negrete-Abascal, E.; García, R.; Reyes, M.; Godínez, D.; De la Garza, M. 2000. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 191: 109-113.

Negrete Abascal, E.; Tenorio, V.; Guerrero, A.; García, R.; Reyes, M.; De la Garza, M. 1998. Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype I, an antigen common to all the serotypes. *Can. J. Vet. Res.* 63: 183-190.

Page, L. 1962. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. Am. J. Vet. Res. 23:85-95.

Rao, B.; Tanksale, M.; Ghatge, M.; Deshpande, V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 597-635

Rivero, P. 2005. Identificación de proteasas secretadas por *Haemophilus paragallinarum*. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala. UNAM.

Sabra, W.; Lünsdorf, H.; Zeng, A. 2003. Alterations in the formation of lipopolysaccharide and membrane vesicles on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under oxygen stress conditions. Microbiology 149: 2789-2795.

Sawata, A.; Kume, K. 1983. Relationship between virulence and morphological or serological properties of variants dissociated from serotype *Haemophilus paragallinarum* strains. J. Clin. Microbiol. 18:49-55

Sawata, A.; Toyotsugu, N. 1985. Lesion induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. Am. J. Vet. Res. 46:1185-1191.

Serrano, A. 2004. Condiciones de motilidad *in vitro* de *Haemophilus paragallinarum*. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala. UNAM.

Soriano, V.; Terzolo, H. 2004. *Haemophilus paragallinarum*: Etiología de la coriza infecciosa. Vet. Mex. 35: 245-259.

Ueda, S.; Nagasawa, Y.; Suzuki, T.; Tajima, M. 1982. Adhesion of *Haemophilus paragallinarum* to cultured chicken cells. *Microbiol. Immunol.* 26:1007-1016

Zhou, L.; Srisatjaluk, R.; Justus, D.; Doyle, R. 1998. On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 163:223-228.