



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“AISLAMIENTO DE UNA CLONA DE *Actinobacillus
suis* CON ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.”**

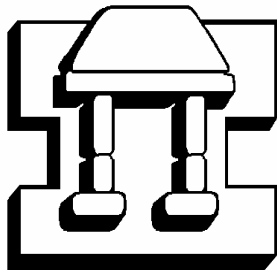
T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

JIMÉNEZ GONZÁLEZ AUGUSTO SAMUEL



IZTACALA

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. SERGIO VACA PACHECO.**

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Proyecto financiado por:

PAPIIT/IN219203-3

PAPCA-UNAM

DEDICADA A

A las personas más importantes de mi vida, mis padres, Samuel y Teresa, porque en cada momento de mi vida me han apoyado, el triunfo que ahora conquisto también les pertenece.

LOS AMO

A Noé y Wendy, porque sé que siempre que los necesite, ahí estarán para brindarme su apoyo y amor, y saben que siempre tendré abiertos los brazos para ustedes.

A mi pequeñito Alexis, ese diablillo que llegó para dar más alegrías al hogar, tú eres un motor para ser mejor cada día, espero ser tu mejor amigo.

A la pequeñita que esta por llegar, por ser una nueva ilusión, espero poder ofrecerte todo el amor que necesites.

*Sabiduría ante todo;
adquiere sabiduría;
Y sobre todas tus posesiones
adquiere inteligencia.
Engrandécela,
y ella te engrandecerá;
Ella te honrará,
cuando tú la hayas abrazado.
Adorno de gracia dará a tu cabeza;
Corona de hermosura te entregará.
Proverbios 4:7-9*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco, por la orientación y los conocimientos que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Erasmo Negrete Abascal, por sus conocimientos, la paciencia y todo el apoyo que me brindó para la realización de este trabajo.

A mis revisores:

Dr. Diego Arenas, M. en C. Gloria Paniagua y M. en C. Eric Monroy, por los comentarios que sirvieron para mejorar mi trabajo.

A mis amigos de la carrera:

Paulo, por ser tan gran amigo, brindarme tu amistad, apoyo y comprensión, agradezco el poder platicarte contigo, siempre que te he necesitado has estado ahí para escucharme, como tú nunca habrá nadie igual, y sabes que cuando necesites un amigo, ahí estaré, gracias.

Marce, Por ser tan gran amiga, sabes que me agrada mucho el poder platicar con tigo, eres una gran persona.

Chely, gracias por ser la comis en la que siempre encontré una grandiosa amiga, pase contigo momentos muy divertidos, solo espero que mis gritos no te hayan lastimado, siempre fuiste una amiga en la que pude confiar, eres súper.

Gaby, Gracias por la amistad que me has brindado durante toda la carrera, eres una gran persona.

Paulina, aunque no estudiaste la carrera conmigo siempre estuviste presente y me brindaste tu amistad, por muy lejos que estuvieras cuando te busque siempre me recibiste con los brazos abiertos enseñándome que siempre puedo contar contigo, y sabes que de igual manera siempre podrás contar conmigo.

A mis amigos del laboratorio de genética

Faby, Ricardo, Lolita, Beatriz, Ely, Ángel y Angélica, por brindarme su amistad y apoyo en todos momentos, son súper.

INDICE

RESUMEN	1
1 INTRODUCCION	2
1.1 Familia <i>Pasteurellaceae</i>	2
1.2 Genero <i>Actinobacillus</i>	2
2 <i>Actinobacillus suis</i>	3
3 FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>A. suis</i>	5
3.1 Colonización.....	6
3.2 Pili.....	6
3.3 Cápsula (CPS)	7
3.4 Lipopolisácaridos (LPS)	8
3.5 Adquisición de hierro.....	9
3.6 Toxinas.....	11
4 PROTEASAS	12
4.1 Clasificación de las proteasas.....	13
4.2 Mecanismo de acción de las serin proteasas.....	14
4.3 Mecanismo de acción de las cistein proteasas.....	14
4.4 Mecanismo de acción de las aspartato proteasas.....	15
4.5 Mecanismo de acción de las metalo proteasas.....	16
5 CLONACION BACTERIANA	17
6 ANTECEDENTES	18
7 JUSTIFICACIÓN	19
8 OBJETIVOS	19
8.1 Objetivo general.....	19
8.2 Objetivos particulares.....	19
9 MATERIAL Y METODOS	20
9.1 Cultivo de <i>A. suis</i> y <i>E. coli</i>	20

9.2 Obtención del DNA cromosómico de <i>A. suis</i>	20
9.3 Digestión enzimática.....	21
9.4 Obtención de DNA plasmídico.....	21
9.5 Linearización del plasmido puc 19.....	21
9.6 Ligación de DNA cromosómico con plasmídico.....	21
9.7 Transformación.....	22
9.8 Elección de las transformantes.....	22
9.9 Búsqueda de clonas con actividad.....	22
9.10 Caracterización de la actividad proteolítica.....	23
9.11 Obtención de DNA plasmídico de la transformante.....	24
10 RESULTADOS	25
10.1 DNA cromosómico de <i>A. suis</i>	25
10.2 Digestión de DNA cromosómico.....	26
10.3 Obtención y linearización del DNA plasmídico.	27
10.4 Clonación.....	28
10.5 Elección de transformantes con actividad proteolítica.....	29
10.6 Actividad en geles de poliacrilamida.....	30
10.7 Extracción de plásmido con inserto.....	31
11 DISCUSIÓN	33
12 CONCLUSIONES	36
13 PERSPECTIVAS	36
14 BIBLIOGRAFIA	38

RESUMEN

Actinobacillus suis es una bacteria Gram-negativa, miembro de la familia *Pasteurellaceae* que es patógena para el cerdo, la cual le puede causar neumonía, septicemia y muerte repentina, especialmente en cerdos jóvenes, provocando pérdidas económicas a los productores. Esta bacteria al igual que otros patógenos presenta diversos factores de virulencia, entre los que se encuentra la secreción de una metaloproteasa, la cual podría inactivar los mecanismos defensivos del hospedero para facilitar su invasión por este patógeno.

En el presente trabajo se realizó un banco genómico de *A. suis* del cual se seleccionó una clona que expresa actividad proteolítica. El DNA de *A. suis* se extrajo por lisis con SDS-proteinasa K, se digirió con la enzima de restricción *Sau* 3AI, y se ligó con T4 DNA ligasa al plásmido pUC19 el cual previamente se había linearizado con la enzima *Bam* HI. pUC 19 conteniendo los fragmentos fue usado para transformar a *Escherichia coli* DH5 α . Las transformantes se plaquearon en agar nutritivo con ampicilina 100 μ g/ml, IPTG 0.5 mM y XGAL. Se eligieron las colonias lactosa (-), estas fueron resembradas en medios que contuvieran caseína bovina o gelatina porcina al 1%, siendo elegidas las colonias que presentaron halos de degradación en estos medios diferenciales. De estas clonas se escogió una a la cual se le nombró pAS227. Esta clona se sembró en caldo BHI y las proteínas secretadas se precipitaron con (NH₄)₂SO₄ al 70%, y se corrieron en geles de poliacrilamida copolimerizados con caseína bovina o gelatina porcina al 1% para detectar actividades proteolíticas. El fragmento clonado de la cepa pAS227 de aprox. 2.5 Kb fue liberado del plásmido con *Bam* HI y se mandó a secuenciar a la unidad de biotecnología y prototipos (UBIPRO).

INTRODUCCION

FAMILIA PASTEURELLACEAE

Históricamente, la clasificación de los miembros de la familia *Pasteurellaceae* se ha realizado con base en un número limitado de características fenotípicas. Los organismos fueron asignados a la familia por sus requerimientos de hemina (factor X) y/o nicotinamida adenin dinucleótido (NAD o factor V) como factores de crecimiento y por su capacidad de causar enfermedad a vertebrados, principalmente a mamíferos y aves (MacInnes, J. I., y Borr, J. D., 1990., Moller, K. y Kilian, M. 1990).

La familia se encuentra integrada por cuatro géneros: *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Pasteurella* y *Mannheimia*, y recientemente se han incluido los nuevos géneros *Lonepinella*, *Gallibacterium*, *Phocoenobacter*, *Histophilus* y *Volucribacter*. Estos son patógenos importantes para animales ya que son capaces de colonizar diferentes tejidos, principalmente las mucosas de los tractos respiratorio y genital de varias especies incluida la humana (Cristensen, H. y Bisgaard, M. 2004).

Los miembros de la familia *Pasteurellacea* son bacilos o cocobacilos pleomórficos Gram-negativos, inmóviles, con excepción de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus paragallinarum*, que presentan los elementos genéticos necesarios para desarrollar un flagelo (Negrete-Abascal, et al., 2003, Andrade, T. A. 2004, Serrano, V. A. 2004).

GENERO ACTINOBACILLUS

Los taxa reportados para el género *Actinobacillus* incluyen 22 especies de las cuales 19 taxa se encuentran como parte de la flora normal de ciertos animales en quienes ocasionalmente pueden provocar enfermedades, algunos de ellos se encuentran frecuentemente asociados como patógenos importantes de bovinos, carneros, caballos y cerdos, inclusive llegan a afectar al hombre (Kuhnert, et al., 2003., Slavic, et al., 2000., Moller, K. y Kilian, M. 1990).

Algunas de las especies del género *Actinobacillus* pueden causar septicemia aguda o lesiones granulomatosas en el ganado (Kuhnert, et al., 2003).

Tres especies de este género: *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* y *A. equuli* se encuentran frecuentemente asociadas con serias enfermedades del cerdo (las dos primeras) o del caballo (la tercera), y únicamente *A. pleuropneumoniae* es considerado un patógeno primario. (Bossé, J. T. et al., 2002).

Actinobacillus suis

A. suis fue caracterizado por vez primera por Van Dorssen y Jaartsveld (1962), tradicionalmente se ha considerado como un comensal del tracto respiratorio de animales (Kim, B. H. y Phillips, J. E. 1976).

La infección que causa *A. suis*, al igual que otras bacterias, se divide en tres fases básicas: la colonización, la evasión de los mecanismos de limpieza del hospedero y el daño a sus tejidos. Aunque no se tiene todavía un esquema completo de la patología de la infección por *A. suis*, se sabe que hay varios factores de virulencia que contribuyen en cada una de estas fases (Bossé, J. T. et al., 2002).

A. suis es una bacteria patógena que se encuentra presente en el tracto respiratorio de diversos animales, principalmente en los cerdos y se ha aislado de animales domésticos como los perros y los gatos (Jeannotte, et al., 2002). La infección por este microorganismo se encuentra asociada con una multitud de signos clínicos incluyendo la muerte repentina (especialmente en animales jóvenes), disnea, tos, debilidad, fiebre, abscesos, signos neurológicos, abortos, cianosis, hiperemia difusa, hemorragias en los oídos, abdomen y piel; y lesiones cutáneas parecidas a erisipelas (MacInnes, J. I. y Desrosiers, 1998, Slavic, et al., 2000).

Las lesiones patológicas causadas por *A. suis* incluyen varios tipos de neumonía, pleuritis, pericarditis, miocarditis, endocarditis, artritis,

mastitis, metritis, fluidos en cavidades del cuerpo, pequeños focos blanquecinos de

Tres especies de este género: *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* y *A. equuli* se encuentran frecuentemente asociadas con serias enfermedades del cerdo (las dos primeras) o del caballo (la tercera), y únicamente *A. pleuropneumoniae* es considerado un patógeno primario. (Bossé, J. T. et al., 2002).

Actinobacillus suis

A. suis fue caracterizado por vez primera por Van Dorssen y Jaartsveld (1962), tradicionalmente se ha considerado como un comensal del tracto respiratorio de animales (Kim, B. H. y Phillips, J. E. 1976).

La infección que causa *A. suis*, al igual que otras bacterias, se divide en tres fases básicas: la colonización, la evasión de los mecanismos de limpieza del hospedero y el daño a sus tejidos. Aunque no se tiene todavía un esquema completo de la patología de la infección por *A. suis*, se sabe que hay varios factores de virulencia que contribuyen en cada una de estas fases (Bossé, J. T. et al., 2002).

A. suis es una bacteria patógena que se encuentra presente en el tracto respiratorio de diversos animales, principalmente en los cerdos y se ha aislado de animales domésticos como los perros y los gatos (Jeannotte, et al., 2002). La infección por este microorganismo se encuentra asociada con una multitud de signos clínicos incluyendo la muerte repentina (especialmente en animales jóvenes), disnea, tos, debilidad, fiebre, abscesos, signos neurológicos, abortos, cianosis, hiperemia difusa, hemorragias en los oídos, abdomen y piel; y lesiones cutáneas parecidas a erisipelas (MacInnes, J. I. y Desrosiers, 1998, Slavic, et al., 2000).

Las lesiones patológicas causadas por *A. suis* incluyen varios tipos de neumonía, pleuritis, pericarditis, miocarditis, endocarditis, artritis, mastitis, metritis, fluidos en cavidades del cuerpo, pequeños focos blanquecinos de

necrosis hepática y linfadenopatía en cerdos lactantes y adultos (MacInnes, J. I. y Desrosiers, 1998, Slavic, et al., 2000).

Los mecanismos de limpieza mucociliar son muy importantes en la protección de los pulmones para prevenir alguna infección. Si la velocidad de reproducción bacteriana excede la velocidad de limpieza en los animales, una importante población de bacterias gradualmente se acumulará dentro del hospedero y en un determinado tiempo causará una enfermedad (Bossé, J. T. et al., 2002). En animales sanos, la eliminación ocurre principalmente por los macrófagos (alveolares, intestinales e intravasculares); siendo los que predominantes los fagocitos que se encuentran establecidos bajo el tracto respiratorio, el número de los polimorfonucleares es generalmente bajo, pero incrementa rápidamente cuando ocurre una infección bacteriana (Bertram, T. A. 1985. Sibille, Y. y Reynolds, H. 1990).

Los macrófagos alveolares están situados estratégicamente en los espacios superficiales aéreos entre los alvéolos, y son estas las primeras células que se encuentran como mecanismo de defensa contra cualquier cuerpo extraño cuando el organismo inhala. Los macrófagos intravasculares del pulmón se adhieren a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y son rápidamente transportados a las áreas inflamadas y necrosadas en el pulmón del cerdo infectado por *A. pleuropneumoniae* (Bertram, T. A. 1985, Bertram, T. A 1986).

Los macrófagos intravasculares y los macrófagos alveolares porcinos aparecen en diferentes funciones defensivas, los primeros predominan en la función citolítica y los segundos realizan principalmente una función fagocítica. (Pabst, R. 1996). El papel principal de los macrófagos intravasculares en la pleuropneumonía, es realizar una limpieza de fragmentos celulares y acelulares que se encuentran en la sangre (Bertram, T. A. 1985, Bertram, T. A. 1986).

Una respuesta inflamatoria es iniciada cuando el organismo combate a la bacteria y sus factores de virulencia durante una infección al pulmón, en este caso por *A. suis*. El proceso inflamatorio comienza generalmente cuando los macrófagos del hospedero inician una cascada de eventos, donde se reclutan a

los leucocitos (incluyendo los neutrófilos y los monocitos) de la circulación de alrededor del endotelio y la membrana basal dentro del tejido infectado; para realizar este evento se requiere la proteólisis de la matriz (Kvietys, P. R. y Sandig, M. 2001, Opdenakker, G. et al., 1998). Una vez en el tejido, los leucocitos interactúan con la bacteria, los factores de virulencia y los mediadores inflamatorios, los cuales quedan activados (Starr, A. E. et al., 2004).

Al igual que otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*, *A. suis* presenta diferentes factores de virulencia como son la cápsula (CPS), lipopolisacáridos (LPS), y diversas proteínas que secreta al medio extracelular, como toxinas RTX, hemolisinas, y una metaloproteasa (MacInnes, J. I. y Desrosiers, 1998, Negrete-Abascal, et al., 2004).

FACTORES DE VIRULENCIA DE *A. suis*

Después de que las bacterias patógenas se han adherido a las células del hospedero, la capacidad de provocar una infección dependerá de la habilidad que tengan para adquirir los nutrientes esenciales, para que se lleve a cabo su desarrollo. En el tracto respiratorio, la variedad y cantidad de carbohidratos y otros muchos nutrientes se encuentran restringidas para los patógenos (Macfadyen, L. P. et al., 1996), los mecanismos para vencer estas limitaciones nutricionales dentro del hospedero están considerados como los mecanismos de patogenicidad (Bossé, J. T. et al., 2002) o factores de virulencia, causantes de la enfermedad.

COLONIZACION

La colonización es la habilidad que tiene un patógeno para adherirse a células o tejidos del hospedero y de poder multiplicarse dentro de éste. Este proceso de colonización es frecuentemente un prerrequisito necesario para que pueda producirse una enfermedad. Un estudio *in vivo* de la adherencia de *A. pleuroneumoníae* a epitelios del tracto respiratorio porcino, donde se realizó una inoculación intranasal, reveló que la bacteria no se une a el epitelio traqueal o de los bronquios, sino que existe una íntima adherencia a los cilios

los leucocitos (incluyendo los neutrófilos y los monocitos) de la circulación de alrededor del endotelio y la membrana basal dentro del tejido infectado; para realizar este evento se requiere la proteólisis de la matriz (Kvietys, P. R. y Sandig, M. 2001, Opdenakker, G. et al., 1998). Una vez en el tejido, los leucocitos interactúan con la bacteria, los factores de virulencia y los mediadores inflamatorios, los cuales quedan activados (Starr, A. E. et al., 2004).

Al igual que otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*, *A. suis* presenta diferentes factores de virulencia como son la cápsula (CPS), lipopolisacáridos (LPS), y diversas proteínas que secreta al medio extracelular, como toxinas RTX, hemolisinas, y una metaloproteasa (MacInnes, J. I. y Desrosiers, 1998, Negrete-Abascal, et al., 2004).

FACTORES DE VIRULENCIA DE *A. suis*

Después de que las bacterias patógenas se han adherido a las células del hospedero, la capacidad de provocar una infección dependerá de la habilidad que tengan para adquirir los nutrientes esenciales, para que se lleve a cabo su desarrollo. En el tracto respiratorio, la variedad y cantidad de carbohidratos y otros muchos nutrientes se encuentran restringidas para los patógenos (Macfadyen, L. P. et al., 1996), los mecanismos para vencer estas limitaciones nutricionales dentro del hospedero están considerados como los mecanismos de patogenicidad (Bossé, J. T. et al., 2002) o factores de virulencia, causantes de la enfermedad.

COLONIZACION

La colonización es la habilidad que tiene un patógeno para adherirse a células o tejidos del hospedero y de poder multiplicarse dentro de éste. Este proceso de colonización es frecuentemente un prerrequisito necesario para que pueda producirse una enfermedad. Un estudio *in vivo* de la adherencia de *A. pleuroneumoníae* a epitelios del tracto respiratorio porcino, donde se realizó una inoculación intranasal, reveló que la bacteria no se une a el epitelio traqueal o de los bronquios, sino que existe una íntima adherencia a los cilios

de los bronquios terminales y a las células epiteliales de los alvéolos (Dom, P. et al., 1994). En el momento en que el patógeno permanece sobre el tracto respiratorio, se vuelve una colonización estable, siendo un preludio necesario a la infección pulmonar que ocurre en casos naturales de pleuroneumonía; sin embargo ésta depende de la naturaleza del material que infecte al animal (partículas de aerosol o secreciones mucosas). Las partículas de aerosol producidas por estornudos son bastante pequeñas y deben penetrar al tracto respiratorio para poder colonizarlo (Kaltrieder, H. B. et al., 1976).

PILI

En *A. suis* no se ha reportado algún tipo de pili, sin embargo, estos se encuentran presentes en una gran variedad de patógenos y se ha definido bien su papel en la adherencia a las células del hospedero (Sauer, F. et al., 2000). Recientemente fimbrias intactas y subunidades de estas, se han purificado de los serotipos 1, 2, 7 y 12 de *A. pleuropneumoniae*; sin embargo, la expresión de fimbrias en esta bacteria al igual que en otros patógenos se encuentra regulada por las condiciones ambientales *in vivo* (Zhang, Y. et al., 2000)

CÁPSULA (CPS)

Un gran número de bacterias poseen una cápsula de polisacáridos en su superficie. En las bacterias Gram-negativas la cápsula se encuentra fuera de la membrana externa y está compuesta de polisacáridos polianuricos altamente hidratados. La cápsula tiene un papel importante al delimitar el acceso de ciertas moléculas a la membrana celular, participa en la adherencia a las superficies e incrementar la tolerancia bacteriana a la desecación (Boyce, J. D. y Adler, B. 2000). La cápsula se encuentra como uno de los máximos factores de virulencia que poseen los patógenos, se ha observado que ésta protege contra los anticuerpos, el complemento y contra la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares (Inzana, et al., 1988).

En bacterias patógenas como *A. suis* la cápsula es la responsable de provocar una respuesta inflamatoria en el pulmón. El papel de los tipos de antígeno K como potencial de virulencia de *A. suis* ha sido valorado ya que es un mediador contra el efecto bactericida del suero, dando resistencia a éste (Slavic, et al., 2000).

Gracias a la presencia de la cápsula, *A. pleuropneumoniae* puede sobrevivir por más de 90 min dentro de los macrófagos, durante este tiempo libera toxinas RTX que provocan la lisis de estos fagocitos (Crijsen, T. L. et al., 1992). Esta bacteria produce importantes factores de virulencia que contribuyen a su habilidad para sobrevivir dentro de macrófagos, los cuales incluyen además de la cápsula, los lipopolisacaridos (LPS) (Kilian, M. 1976). Esta habilidad de sobrevivir dentro de los macrófagos sugiere que *A. pleuropneumoniae* es capaz de distribuirse por el torrente sanguíneo dentro de los macrófagos (Ward, C. K y Insana, 1994).

Los polisacáridos capsulares y los LPS son los factores que contribuyen mayormente a una resistencia a el efecto bactericida del suero. La importancia de la cápsula como factor de virulencia ha sido estudiada en infecciones de cerdos con una mutante acapsulada del serotipo 5A de *A. pleuropneumoniae*. La mutante no capsulada fue susceptible al efecto bactericida del suero *in vitro*, a diferencia del un serotipo capsulado (Ward, C. K. et al., 1998).

La cápsula se encuentra implicada en la virulencia de *P. multocida* ya que se ha observado que las cepas capsuladas son más virulentas y capaces de resistir la inmunidad mediada por el complemento y la fagocitosis (Boyce, J. D. y Adler, B. 2000).

LIPOPOLISÁCARIDOS (LPS)

Los LPS inducen una infiltración masiva de neutrófilos y una activación de mediadores biológicos, este proceso es probablemente responsable de causar daño en el epitelio pulmonar y en las células endoteliales (Slavic, et al., 2000, Idris, B. G. et al., 1993), además, de que uno de los papeles de los tipos de

antígenos K como potencial de virulencia en bacterias patógenas, incluyendo *A. suis*, es el dar resistencia al efecto bactericida del suero (Slavic, et al, 2000). En experimentos de immuno reconocimiento con preparaciones crudas de LPS se observó que existen diferencias notables en los antígenos somáticos O (cadenas O) de *A. suis*; al analizar un gran numero de aislados de esta bacteria (151) en cerdos sanos y enfermos, se describieron dos tipos diferentes de antígenos LPS (O) sugiriendo que bacterias que portan el serotipo O2 se encuentra relacionadas con infecciones severas, a diferencia a las debidas al serotipo O1 (Slavic, et al., 2000).

Las cadenas laterales del antígeno O1 de *A. suis*, se encuentran formadas por un homopolímero de $[\alpha\text{-D-Glc}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Glc}(1\rightarrow6)]_n$ del antígeno O2 de la misma bacteria, es un tetrasacárido con un esqueleto de Gal-Glc-Gal-GlcNac (Monteiro, M., et al., 2000). Al igual que en *A. suis*, las bacterias Gram-negativas presentan LPS, y su papel en la patogénesis se encuentra más estudiado que en esta bacteria.

Los lipooligosacaridos (LOS) presentes en la pared (estos LOS se pueden diferenciar de los LPS ya que carecen de repetitivos antígeno O), juegan un mayor papel en la patogénesis de las infecciones severas de bacterias Gram-negativas, incluyendo la pleuroneumonía porcina, y su papel en la adherencia se encuentra bien caracterizado. Se ha estudiado como los LOS de *Haemophilus ducreyi* contribuyen a la adherencia a los queratinocitos humanos (Gibson, B. W. et al., 1997) y como en mutantes de *H. influenzae* deficientes en la biosíntesis de LOS, se reduce la adherencia a las células epiteliales bronquiales del ser humano (Swords, W. E. et al., 2000). Se ha sugerido que los LPS de *A. pleuropneumoniae* son los responsables de una inflamación pulmonar aguda en la neumonía aguda de ratones y cerdos (Idris, B. G. et al., 1993).

Los LPS juegan un papel en la adherencia de *A. pleuropneumoniae* a la traquea porcina, esto fue sugerido por observaciones en aislamientos de bacterias que expresan un tipo rugoso de LPS, estas se encuentran adheridas en gran numero a la tráquea del hospedero (Paradis, et al., 1994), además, de

que se han identificado glicosfingolípidos presentes en las células epiteliales respiratorias como posibles receptores de LPS de *A. pleuropneumoniae* (Abul-Milh, M. et al., 1999).

En *Mannheimia haemolytica* se encuentran implicados los LPS y una leucotoxina (Lkt) en iniciar un proceso inflamatorio en el ganado, probablemente alrededor de esta actividad se encuentran asociados una infiltración de leucocitos (Tatum, F. M. et al., 1998)

ADQUISICIÓN DE HIERRO

Un organismo patógeno que requiere hierro para su desarrollo, debe ser capaz de adquirirlo de su hospedero a pesar de que esté, se encuentre restringido en el ambiente. Mientras que muchos patógenos utilizan los sideróforos para la adquisición del hierro, los miembros patógenos de la familia *Pasteurellaceae* (y de *Neisseriaceae*) pueden obtener el hierro directamente de las proteínas de su hospedero, por mecanismos sideróforo independientes, posiblemente mediados por receptores de transferrinas (Tfs), (Bahrami, F. et al., 2003, Ratledge y Dover, 2000, Gray-Owen y Schryvers, 1996). La adquisición de hierro mediada por receptor de Tf, implica dos proteínas superficiales del receptor, designadas Tf que unen las proteínas A y B (TbpA y TbpB, respectivamente) (Gray-Owen y Schryvers, 1996) o posiblemente, una sola proteína del receptor, también designada TbpA (Ogunnariwo y Schryvers, 2001; Ekins y Niven, 2002). En los organismos que producen ambas proteínas del receptor, los genes que codifican TbpA y TbpB forman un operón con el gen *tbpB* río arriba de *tbpA* (Legrain, et al., 1993; González, et al., 1995; Gray-Owen, et al., 1995; Ogunnariwo, et al., 1997). La expresión del operón está sujeta a una represión por hierro (Gray-Owen y Schryvers, 1996) donde las secuencias del promotor y las reguladoras se localizan río arriba de *tbpBA* (Legrain, et al., 1993; Anderson, et al., 1994; Gray-Owen, et al., 1995; Ogunnariwo, et al., 1997) y *tbpA* (Ekins y Niven, 2002).

A. suis expresa un factor de virulencia para la adquisición de hierro pudiendo utilizar la transferrina porcina pero no la transferrina de otras especies de

animales como la humana o la bovina (Bahrami, F. et al., 2003, Schryvers y González, 1990). La membrana de *A. suis* capta específicamente Tf porcina, pero solamente si los organismos han crecido bajo condiciones restringidas de hierro. La adquisición de hierro por limitación de Tf en *A. suis* no implica la utilización de sideróforos y se ha sugerido que ocurre vía receptores reprimibles por hierro, análogos a Tbps (TbpA y TbpB) de *A. pleuropneumoniae* y de otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Se han aislado dos polipéptidos de *A. suis* que unen supuestas Tf, con masas moleculares estimadas de 100 y de 63 kDa, estos polipéptidos de membrana fueron identificados tentativamente como TbpA y TbpB, respectivamente. Las proteínas TbpA tienen masas moleculares de ~100 kDa (Bahrami, F. et al., 2003, Gray-Owen y Schryvers, 1996) y por lo menos en *A. pleuropneumoniae*, TbpB tiene masas moleculares de ~56-65 kDa (González, et al., 1990; Ricard, et al., 1991; Gerlach, et al., 1992).

TOXINAS

Las bacterias patógenas producen muchas sustancias, principalmente proteínas, que son directa o indirectamente tóxicas para las células del hospedero. Las proteínas microbianas, comúnmente enzimas, que matan a las células hospederas en concentraciones muy bajas se llaman exotoxinas, y tienen un papel central en la patogénesis de las enfermedades microbianas. Sin embargo, como la mayoría de otros factores de virulencia, las exotoxinas requieren de mecanismos de regulación, maquinarias especializadas y factores de adhesión para potenciar su expresión, liberación y efectos sobre el hospedero (Finlay y Falkow, 1997)

Las toxinas RTX se caracterizan por la presencia de repeticiones ricas en glicina en el extremo C terminal, por los mecanismos comparables de secreción, su homología genética, y por sus bioactividades similares (Welch, R. A. 2001). En general estas toxinas son codificadas por operones que consisten de 4 genes continuos C, A, B y D (Welch, R. A. 1991, Fath y Kolter, 1993). Los genes C y A se requieren para la producción de la actividad tóxica de la proteína y los genes B y D se requieren para la secreción de la toxina activa (Frey, J. 1995)

Las toxinas RTX pertenecen a una familia homogénea de proteínas formadoras de poros que se encuentran presentes en diferentes bacterias Gram-negativas. Estas toxinas se encuentran ampliamente distribuidas en especies patógenas, particularmente en miembros de la familia *Pasteurellaceae*, siendo un factor determinante de virulencia en las patogénesis severas de animales, en donde también se encuentra incluido el humano (Frey y Kuhnert, 2002).

La mayoría de las consecuencias patológicas de la pleuroneumonía porcina pueden ser atribuidas a las toxinas Apx, las cuales tienen efectos citotóxicos en varios tipos celulares, afectando directamente el tejido e indirectamente cuando inician la estimulación de mediadores inflamatorios por una activación de fagocitos (Frey, J. 1995).

A. suis produce dos toxinas Apx, las cuales son fuertemente hemolíticas y citotóxicas, estas se encuentran muy relacionadas con las toxinas ApxI y ApxII, de *A. pleuropneumoniae*, la segunda de estas proteínas es idéntica a la de *A. suis*, igualando la secuencia de aminoácidos, sin embargo, presentan diferencias en los genes que las codifican, nombrándose operones *apxI/CABD* var. *suis* y *apxII/CA* var. *suis*. Las toxinas Apx producidas por *A. suis* provocan la lisis de diferentes células inmunes y no inmunes, causando diferentes grados de lesiones en el tracto respiratorio del hospedero durante la enfermedad. Además *A. suis* posee genes de ApxIV una nueva toxina RTX que se encuentra presente en todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* (MacInnes, J. I. y Desrosiers, 1998, Ostaainjen, J. V. et al., 1997, Kamp, E. M. et al., 1994)

El principal factor de virulencia que participa en la resistencia a la fagocitosis por los macrófagos y los polimorfonucleares son las toxinas RTX (ApxI, ApxII y ApxIII), las cuales son producidas en varias combinaciones por los distintos serotipos de *A. pleuropneumoniae* (Frey, J. et al., 1993), estas son expresadas *in vivo* e *in vitro*, siendo citotóxicas en varios grados para los macrófagos pulmonares, los polimorfonucleares, las células epiteliales del pulmón y las células endoteliales (Van Leengoed, et al., 1989., Serebrin, et al., 1991., Dom, et al., 1994., Van de Kerkhof, et al., 1996).

En *A. pleuropneumoniae* la toxina ApxI es fuertemente hemolítica y citolítica, la ApxII es débilmente hemolítica y moderadamente citolítica, y ApxIII no es hemolítica pero es fuertemente citolítica (Kamp, E. M., et al., 1991)

PROTEASAS

Las proteasas son necesarias fisiológicamente para los organismos vivos, son ubicuas y se encuentran en una gran diversidad de fuentes como en las plantas, animales y microorganismos (Finlay y Falkow, 1997).

Algunas bacterias secretan proteasas las cuales son enzimas que degradan parcial o totalmente las proteínas que estructuran los tejidos del hospedero y de esta manera podrían facilitar su invasión (González-Pedrajo, B y Dreyfus, G. 2003), estas proteasas causan la hidrólisis de grandes péptidos en fragmentos pequeños para facilitar su absorción por las células (Rao, M. B. et al., 1998).

CLASIFICACION DE LAS PROTEASAS

Según la nomenclatura del Comité Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas se clasifican en 4 subgrupos de 3 grupos (hidrolasas). Sin embargo, las proteasas no cumplen fácilmente con el sistema general de nomenclatura de las enzimas, debido a su inmensa diversidad de acción y estructura. Las proteasas son clasificadas con base en 3 criterios: i) tipo de reacción catalítica, ii) naturaleza química del sitio catalítico, y iii) relación evolutiva estructural (Rao, M. B. et al. 1998).

Así mismo las proteasas se subdividen dentro de dos grupos mayores: las endopeptidasas y las exopeptidasas, dependiendo de su sitio de acción. Las exopeptidasas rompen el enlace químico proximal al extremo amino o carboxilo terminal del sustrato y las endopeptidasas rompen enlaces peptídico distantes del extremo del sustrato (Rao, M. B. et al., 1998).

Según el aminoácido en su sitio activo, las proteasas se clasifican en cuatro grupos: las aspartato proteasas que dependen de un residuo de ácido aspártico

para su actividad catalítica., las cisteín proteasas dependen de un intermediario covalente que consiste en cisteína e histidina., las serin proteasas que se caracterizan por la presencia de un grupo serina dentro de su sitio activo, y las metalo proteasas, que son las más diversas por sus tipos catalíticos, las cuales se caracterizan por el requerimiento de un ión metálico divalente para su actividad siendo este, un átomo de zinc catalíticamente activo que puede ser remplazado en algunos casos, por otro metal como el cobalto o el níquel sin que pierdan su actividad (Rao, M. B. et al., 1998).

Diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*, como *P. multocida*, *M. (Pasteurella) haemolytica*, *H. paragallinarum*, y más específico en miembros del género *Actinobacillus*, como *A. pleuropneumoniae* y *A. suis* secretan metalo proteasas al medio extracelular (Negrete-Abascal, E. et al., 2004., Garcia, G. E. 2004., Rivero, G. P. 2005).

MECANISMO DE ACCION DE LAS SERIN PROTEASAS

Las serin proteasas se caracterizan por la presencia de un grupo serina en el sitio activo. Son numerosas y muy abundantes en los virus, bacterias y eucariontes, lo que sugiere que son vitales para los organismos (Rao, M. B. et al., 1998).

Esta clase de proteasas comprende dos familias distintas. La familia de la quimotripsina, que incluye las enzimas de mamíferos como quimotripsina, tripsina o elastasa y la familia de la subtilisina que incluye las enzimas bacterianas como la subtilisina de *Bacillus subtilis*. Las serin proteasas usualmente siguen una reacción de dos pasos para la hidrólisis. En el primer paso se forma un intermediario peptídico que se une a la enzima seguido por la pérdida del aminoácido o el fragmento del péptido (Fastrez, J. y Fersht, A. R. 1973). Este paso de acilación es seguido por una desacilación que ocurre por un ataque nucleofílico sobre el intermediario, este ataque es llevado a cabo por una molécula de agua, dando como resultado la hidrólisis del péptido (Rao, M. B. et al. 1998).

MECANISMO DE ACCION DE LAS CISTEIN PROTEASAS

Las cistein proteasas se encuentran en procariontes y en eucariontes. Esta familia incluye proteasas de plantas como papaína, actinidina, bromelina, varias catepsinas lisosomales de mamíferos y diversas proteasas de parásitos como *Trypanosoma*, *Schistosoma* y *Amoebas* (Rao, M. B. et al., 1998).

Como las serin proteasas, la catálisis se realiza a través de la formación de un intermediario covalente e involucra un residuo de cisteína y uno de histidina. El nucleófilo es un ion tíoato en lugar de un grupo hidroxilo. El ion tíoato se estabiliza a través de la formación de un ion apareado con un grupo imidazol de la histidina. El nucleófilo que ataca es el ion apareado tíoato-imidazol en ambos pasos, por lo cual no se requiere la molécula de agua (Rao, M. B. et al., 1998).

MECANISMO DE ACCION DE LAS ASPARTATO PROTEASAS

Las aspártico proteasas, normalmente conocidas como proteasas acidificantes, son las endopeptidasas que dependen de residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica (Rao, M. B. et al., 1998).

La mayoría de las aspártico proteasas pertenecen a la familia de la pepsina, que incluye enzimas digestivas como la quimosina, catepsinas lisosomales, enzimas como la renina y ciertas proteasas micóticas como la penicilopepsina, la rhizopuspepsina y la endotiapepsina. Una segunda familia comprende proteasas virales como la del HIV o retropepsina. Este tipo de proteasas no ha sido descrito en bacterias (Rao, M. B. et al., 1998).

En contraste con la serin y cistein proteasas, la catálisis por la aspartico proteasas no involucra un intermediario covalente. El ataque nucleofílico se realiza por dos transferencias simultáneas de protones: la primera a partir de una molécula de agua en los dos grupos carboxilos y la segunda en el oxígeno del grupo carbonilo del sustrato con la ruptura del enlace CO-NH. Esta catálisis ácido-base recibe el nombre de mecanismo “oprima-jale” y conduce a la

formación de un intermediario tetraédrico no covalente neutro (Rao, M. B. et al., 1998).

MECANISMO DE ACCION DE LAS METALO PROTEASAS

Las metaloproteasas son las más diversas de todos los tipos de proteasas, se caracterizan por el requerimiento de un ión metal divalente para su actividad. Ellas incluyen enzimas de una gran variedad de orígenes como: toxinas hemorrágicas de veneno de las serpientes, termolisina de las bacterias y colagenasas de organismos grandes (Rao, M. B. et al., 1998).

Se han reconocido aproximadamente 30 familias de metaloproteasas, de las cuales 17 sólo contienen endopeptidasas, 12 sólo contienen exopeptidasas y 1 contiene endopeptidasas y exopeptidasas (Rao, M. B. et al., 1998).

Las metaloproteasas son una de las clases de proteínas más viejas y pueden estar presentes en bacterias, hongos y otros organismos. Estas proteasas difieren ampliamente en sus secuencias y su estructura pero la gran mayoría contiene un átomo de zinc que es catalíticamente activo. En algunos casos el zinc puede ser reemplazado por otro metal, como el cobalto o el níquel sin pérdida de su actividad (Rao, M. B. et al., 1998).

El mecanismo de acción de las metaloproteasas es diferente al descrito para otras proteasas. El mecanismo catalítico conduce a la formación de un intermediario tetraédrico no covalente después de que es llevado a cabo un ataque por una molécula de agua la cual se une al zinc sobre el grupo carbonilo del enlace móvil. Posteriormente este intermediario tetraédrico es descompuesto por transferencia de un protón del ácido glutámico al grupo saliente. Estas enzimas dependen de la presencia de un catión divalente y pueden ser inactivadas por diálisis o por la adición de un agente quelante (Rao, M. B. et al., 1998).

CLONACION BACTERIANA

Una de las técnicas más útiles y poderosas en la historia de la biología molecular es la clonación del DNA, la cual permite obtener muchas copias idénticas de un fragmento de DNA previamente aislado, en colonias de otra bacteria, por lo general en *Escherichia coli*. Así cuando se tiene la colección completa de fragmentos de restricción clonados en colonias de esta bacteria, se cuenta con una biblioteca genómica (Puertas, M. J. 1996).

En la década pasada se publicaron muchos artículos sobre el aislamiento y la manipulación de genes de proteasas microbianas con el objetivo de i) sobreproducción de enzimas por efecto de la dosificación del gen ii) estudio de la estructura primaria de la proteína y el papel que estas juegan en la patología al ser secretadas por microorganismos, iii) localizar el residuo del sitio activo de la proteína y/o alterar las propiedades enzimáticas y sus posibles aplicaciones comerciales (Rao, M. B. et al., 1998).

La sobreproducción de enzimas tiene varias aplicaciones comerciales, principalmente en las industrias de alimentos, detergentes y farmacéuticos. Además de que la virulencia de un gran número de bacterias se encuentra relacionada con la secreción de varias proteasas. La clonación de genes de estos microbios se utiliza para comprender la base de su patogenicidad y para desarrollos terapéuticos contra ésta. Las proteasas juegan un papel importante en la fisiología celular, y la clonación de genes que codifican proteasas, especialmente en *E. coli*, ha permitido el estudio de los aspectos regulatorios de estas proteínas (Rao, M. B. et al., 1998).

El estudio de homologías en secuencias de DNA y de proteínas es importante para una variedad de propósitos y permite hacer análisis computacionales en biología molecular. Esto sirve como un prelude al análisis filogenético de proteínas y asiste en la predicción de la estructura secundaria del DNA y de las proteínas. Las proteasas son un complejo grupo de enzimas y muy enorme en sus propiedades fisicoquímicas y catalíticas. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de un número de proteasas ya se encuentran determinadas y

CLONACION BACTERIANA

Una de las técnicas más útiles y poderosas en la historia de la biología molecular es la clonación del DNA, la cual permite obtener muchas copias idénticas de un fragmento de DNA previamente aislado, en colonias de otra bacteria, por lo general en *Escherichia coli*. Así cuando se tiene la colección completa de fragmentos de restricción clonados en colonias de esta bacteria, se cuenta con una biblioteca genómica (Puertas, M. J. 1996).

En la década pasada se publicaron muchos artículos sobre el aislamiento y la manipulación de genes de proteasas microbianas con el objetivo de i) sobreproducción de enzimas por efecto de la dosificación del gen ii) estudio de la estructura primaria de la proteína y el papel que estas juegan en la patología al ser secretadas por microorganismos, iii) localizar el residuo del sitio activo de la proteína y/o alterar las propiedades enzimáticas y sus posibles aplicaciones comerciales (Rao, M. B. et al., 1998).

La sobreproducción de enzimas tiene varias aplicaciones comerciales, principalmente en las industrias de alimentos, detergentes y farmacéuticos. Además de que la virulencia de un gran número de bacterias se encuentra relacionada con la secreción de varias proteasas. La clonación de genes de estos microbios se utiliza para comprender la base de su patogenicidad y para desarrollos terapéuticos contra ésta. Las proteasas juegan un papel importante en la fisiología celular, y la clonación de genes que codifican proteasas, especialmente en *E. coli*, ha permitido el estudio de los aspectos regulatorios de estas proteínas (Rao, M. B. et al., 1998).

El estudio de homologías en secuencias de DNA y de proteínas es importante para una variedad de propósitos y permite hacer análisis computacionales en biología molecular. Esto sirve como un preludeo al análisis filogenético de proteínas y asiste en la predicción de la estructura secundaria del DNA y de las proteínas. Las proteasas son un complejo grupo de enzimas y muy enorme en sus propiedades fisicoquímicas y catalíticas. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de un número de proteasas ya se encuentran determinadas y

estas sirven para realizar comparaciones las cuales son usadas para elucidar las relaciones entre la estructura y su función (Argos, P. 1987).

ANTECEDENTES

Negrete-Abascal, et al., (2004) demostraron la presencia de metaloproteasas secretadas al medio de cultivo por *A. suis*, las cuales se corrieron en geles de poliacrilamida copolimerizados con caseína bovina al 1%. Estas proteínas, de aproximadamente 200 KDa y 50 KDa de masa molecular, presentaron actividad proteolítica en un intervalo de pH de 5 a 10 y fueron estables a temperaturas de 40°C, 50°C, 60°C y 70°C. Las proteínas secretadas por *A. suis* degradaron IgG de cerdo y de bovino, además, presentaron reactividad cruzada con un anticuerpo policlonal dirigido contra una proteasa purificada de *A. pleuropneumoniae*.

García-Cuellar, et al., (2000) construyeron una biblioteca genómica de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 expresada en *E. coli*, de esta aislaron una clona con actividad proteolítica cuya secuencia se encontró en el genoma de 12 serotipos de *A. pleuropneumoniae*.

A partir de una librería genómica de *A. pleuropneumoniae* en pUC 19 García, G. O. et al., (2004) obtuvieron una clona que expresó actividad proteolítica, se obtuvo la secuencia completa de nucleótidos, y a partir de esta se dedujo la secuencia de amino ácidos de una proteasa secretada por *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, que expresó actividad proteolítica. Esta proteína fue identificada como una zinc-proteasa neutra perteneciente a la familia de las aminopeptidasas, con un peso molecular de aproximadamente 101 KDa. Se observó su homología con otras secuencias de aminopeptidasas reportadas de diferentes bacterias Gram-negativas. La expresión de la proteasa fue observada en tejido de pulmón de cerdo que murió de pleuropneumonía porcina sugiriendo que juega un papel en la patogénesis

Negrete-Abascal, et al., en 1998 y 1999 estudiaron la capacidad de *P. multocida* y *A. pleuropneumoniae* para secretar proteasas al medio de cultivo.

En el caso de *A. pleuropneumoniae* esta actividad proteolítica fue purificada y caracterizada como una proteasa común a todos los serotipos. En el caso de *P. multocida*, esta actividad se puso de manifiesto en cepas aisladas de diferentes fuentes animales (bóvidos, pollo, ovejas, y dos de cerdo), Todos los aislados produjeron proteasas en una amplia gama de masa molecular.

En el caso de *A. pleuropneumoniae* esta actividad proteolítica fue purificada y caracterizada como una proteasa común a todos los serotipos. En el caso de *P. multocida*, esta actividad se puso de manifiesto en cepas aisladas de diferentes fuentes animales (bóvidos, pollo, ovejas, y dos de cerdo), Todos los aislados produjeron proteasas en una amplia gama de masa molecular.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que *A. suis* es un patógeno importante de las vías respiratorias de los cerdos, y a que diferentes patógenos de mucosas de animales o del humano son capaces de secretar proteasas, es importante realizar trabajos que contribuyan a conocer aquellas secretas por este microorganismo, las cuales podrían favorecer el éxito de la bacteria en la infección de su hospedero.

OBJETIVO GENERAL

Aislar una clona de *Actinobacillus suis* con actividad proteolítica.

OBJETIVOS PARTICULARES

Obtener un banco genómico de *A. suis*.

Identificar alguna clona que exprese actividad proteolítica

En el caso de *A. pleuropneumoniae* esta actividad proteolítica fue purificada y caracterizada como una proteasa común a todos los serotipos. En el caso de *P. multocida*, esta actividad se puso de manifiesto en cepas aisladas de diferentes fuentes animales (bóvidos, pollo, ovejas, y dos de cerdo), Todos los aislados produjeron proteasas en una amplia gama de masa molecular.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que *A. suis* es un patógeno importante de las vías respiratorias de los cerdos, y a que diferentes patógenos de mucosas de animales o del humano son capaces de secretar proteasas, es importante realizar trabajos que contribuyan a conocer aquellas secretas por este microorganismo, las cuales podrían favorecer el éxito de la bacteria en la infección de su hospedero.

OBJETIVO GENERAL

Aislar una clona de *Actinobacillus suis* con actividad proteolítica.

OBJETIVOS PARTICULARES

Obtener un banco genómico de *A. suis*.

Identificar alguna clona que exprese actividad proteolítica

MATERIAL Y METODOS

CULTIVO DE *A. suis* y *E. coli*

La cepa de *A. suis* fue proporcionada por el Dr. Francisco Suárez Guemez de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia, UNAM, esta fue cultivada en infusión de cerebro corazón (BHI), incubándolo a 37°C en un baño rotatorio (Negrete-Abascal, et al., 2004).

E. coli DH5 α fue cultivado en caldo nutritivo (CN), incubando a 37°C en un baño rotatorio. De la misma manera *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido pUC 19, fue sembrada en agar nutritivo conteniendo ampicilina (100 μ g/ml). (García, G. O. et al., 2004)

OBTENCIÓN DEL DNA CROMOSÓMICO DE *A. suis*

Se partió de 5 ml de cultivo de *A. suis* en caldo nutritivo crecido toda la noche, el cual se empastilló en un tubo eppendorf eliminando el sobrenadante. La pastilla se resuspendió por pipeteo con 200 μ l de buffer de lisis SDS 1.7% y proteinasa K (Ostaainjen, J. V. et al., 1997). Posteriormente se incubó 15 min. a 37 °C., y se agregaron 66 μ l de NaCl 5 M y se agitó por inversión. Se centrifugó a 12 Krpm durante 10 min. a 4 °C., se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo al cual se le agregó un volumen de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1). Se agitó 50 veces por inversión hasta formar una suspensión que se centrifugó a 12 Krpm por 3 min. a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto. Posteriormente se lavó 2 veces con 500 μ l de etanol al 70%, después de cada lavado se centrifugó a 12 Krpm por 5 min, se secó 1 min. a 65 °C y por último se resuspendió la muestra en 50 μ l de agua desionizada (Sambrook, J. et al., 1989).

Una muestra del DNA obtenido se corrió en un gel de agarosa al 1% a 120 Vol, 94 mA durante 30 min. el cual posteriormente se tiñó con bromuro de etidio y se irradió con luz ultravioleta para observar el DNA.

DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

Para la digestión de DNA cromosómico de *A. suis* se realizó una cinética enzimática con la enzima de restricción *SAU 3AI* a 4 y 24 horas para generar fragmentos de aproximadamente 0.5-12 kb de tamaño (Tenorio, G. V. R. 1990).

Para poder observar los fragmentos de DNA, la muestra digerida se corrió en un gel de agarosa, en las mismas condiciones que el DNA cromosómico no digerido.

OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

La obtención del plásmido pUC 19 se realizó por medio del Rapid Plasmid Miniprep System marca Marligen Bioscience Inc., El DNA obtenido se observó en un gel de agarosa.

LINEARIZACIÓN DEL PLASMIDO pUC 19

El plásmido pUC19 fue linearizado con la enzima de restricción *Bam HI*. El DNA lineal se observó en un gel de agarosa, en las mismas condiciones que el DNA cromosómico no digerido

LIGACIÓN DE DNA CROMOSOMICO CON PLASMÍDICO

Los fragmentos del DNA cromosómico de *A. suis* fueron ligados a pUC 19 linearizado con una relación molar de 1:3 (ADN plasmidico: ADN bacteriano), con T4 DNA ligasa usando ciclos de 30s a 10°C, 30s 30°C por 12-16 horas en un termociclador Perkin-Elmer (Lund, et al., 1996).

TRANSFORMACIÓN

Se inoculó *E. coli* DH5 α en 3 ml de caldo nutritivo y se incubó en agitación durante 3 horas o hasta que el cultivo llegara a fase exponencial. Este cultivo se centrifugó en dos tubos eppendorf durante 35 s a 12 Krpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 300 μ l de CaCl₂ 100 mM + 10% glicerol frío. Se agitó en vortex durante 5 s, se centrifugó 25 s a 12 Krpm y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió con 33 μ l de CaCl₂. Al tubo problema se le adicionaron 3.3 μ l de la ligación y el otro se utilizó como control (Sambrook, J. et al., 1989).

Los tubos se dejaron 20 min. en hielo, posteriormente se pasaron a 42 °C y se volvieron a colocar 20 min. en hielo. Se les agregaron 250 μ l de caldo nutritivo y se incubaron a 37 °C durante 1 hora en agitación y por último se espatularon en el medio selectivo final ANAIX (agar nutritivo con 100 μ g/ml de ampicilina, isopropil β -D-tiogalactopiranosido a 0.5 mM (IPTG), y 1.6 μ l/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactoside (xGAL) (Sambrook, J. et al., 1989).

ELECCIÓN DE LAS TRANSFORMANTES

Se eligieron las colonias transformantes de *E.coli* DH5 α pUC19 que no presentaron una coloración azul (Lac⁻) y se sembraron en agar nutritivo con ampicilina 100 μ g/ml, isopropil β -D-tiogalactopiranosido a 0.5 mM (IPTG), y 1.6 μ l/ml de xGAL (Luna, R. 2003).

BÚSQUEDA DE CLONAS CON ACTIVIDAD

Las transformantes Lac⁻ se sembraron en agar BHI con ampicilina, XGAL e IPTG, y caseína bovina al 1% o gelatina porcina al 1%, incubándolas de 24 a 48 horas. Posteriormente las clonas fueron incubadas con buffer Tris-HCl 50mM pH 7 durante 24 horas para favorecer la actividad proteolítica, si la hubiera. La hidrólisis de la proteína (caseína o gelatina) por proteasas secretadas se detectó por ausencia de coloración con azul de Coomassie (Luna, R. 2003).

Las placas se enjuagaron con agua destilada y se eligieron las clonas que presentaron halos de degradación en agar con caseína y/o gelatina. Las clonas presuntivas se probaron nuevamente en medios iguales para confirmar la estabilidad de la construcción, con el fin de observar si no hubo una pérdida espontánea de la actividad proteolítica (Luna, R. 2003).

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Se sembró la transformante en caldo BHI que contenía ampicilina, XGAL e IPTG 0.5 mM. durante toda la noche. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm a 4°C durante 20 min., se desechó la pastilla y las proteínas del sobrenadante se precipitaron con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una saturación del 70%. Se centrifugó a 8000 rpm a 4°C durante 20 min., y por último las proteínas se resuspendieron en Tris 20 mM (Negrete-Abascal, et al., 2004)

Se realizó electroforesis de las proteínas, secretadas al medio por las clonas, en geles de poliacrilamida con 1% de gelatina porcina o caseína bovina corridos a 80 V 94 mA durante 2 horas. Los geles se dejaron en agitación durante 1 hora con tritón X100 al 0.1%. Posteriormente se dejaron en activación con buffer Tris 50 mM y CaCl_2 10 mM por toda la noche. Por ultimo los geles se tiñeron con azul de Coomassie (Negrete-Abascal, et al., 2004)

OBTENCION DE DNA PLASMÍDICO DE LA TRANSFORMANTE

La obtención del plásmido pUC19 recombinante se realizó por usando el kit Rapid Plasmid Miniprep System (Marligen Bioscience Inc). Y la liberación del inserto que confiere la actividad proteolítica se realizó con la enzima *Bam* HI. El tamaño del fragmento y su liberación del plásmido se determinó por corrimiento electroforético en gel de agarosa.

RESULTADOS

DNA CROMOSÓMICO DE *A. suis*

Con la técnica de lisis SDS 1.7% y proteinasa K se obtuvieron en promedio 50 ng/ μ l de DNA de *A. suis*. En la figura 1 se muestra el DNA cromosómico de *A. suis* por encima del marcador de 12 Kb, la muestra se encuentra libre de RNA.

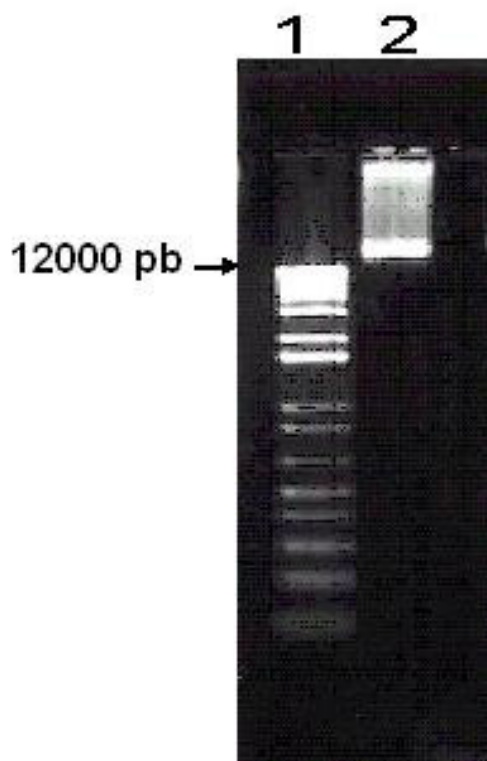


Figura. 1 DNA cromosómico de *A. suis* en gel de agarosa al 0.8 % corrido a 120 V, 94 mA 30 min. Carril 1 marcador de 1 Kb, carril 2 muestra de DNA cromosómico de *A. suis* libre de RNA.

DIGESTIÓN DE DNA CROMOSÓMICO

La figura 2 muestra los fragmentos de DNA cromosómico obtenidos por una digestión total con la enzima *Sau3A1*, la enzima digirió el DNA de *A. suis*, a las 4 horas y a las 22 horas. Los tamaños de las bandas fluctuaron entre 0.5 y 12 kb.

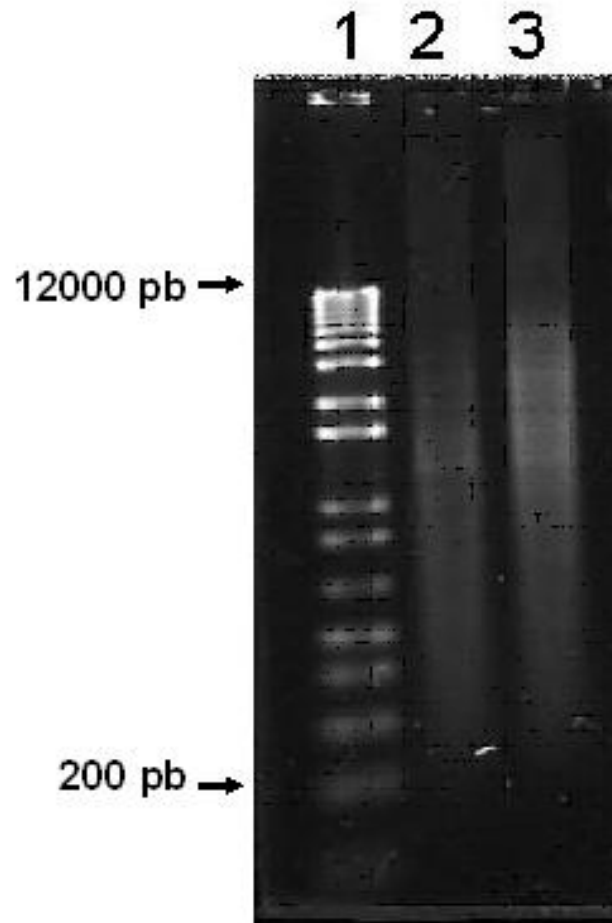


Figura 2 Digestión del DNA de *A. suis* con *Sau 3AI*. Gel de agarosa a 1 % corrido a 120 V, 94 mA y 45 min. Carril 1 marcador 1 Kb; carriles 2 y 3 digestiones totales de DNA cromosómico de *A. suis* con *Sau 3AI* a las 4 y 22 h respectivamente.

OBTENCIÓN Y LINEARIZACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.

La figura 3 muestra un mapa del plásmido pUC19, se puede observar el origen de replicación, el marcador de resistencia a ampicilina y el gen *lacZ* que produce la β -galactosidasa donde se encuentran los sitios únicos de corte para las enzimas de restricción (polilinker).

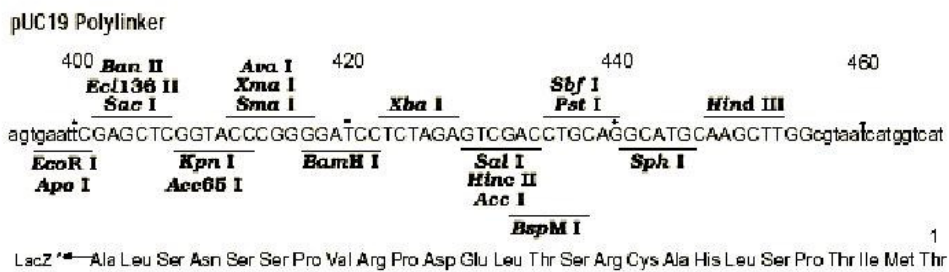
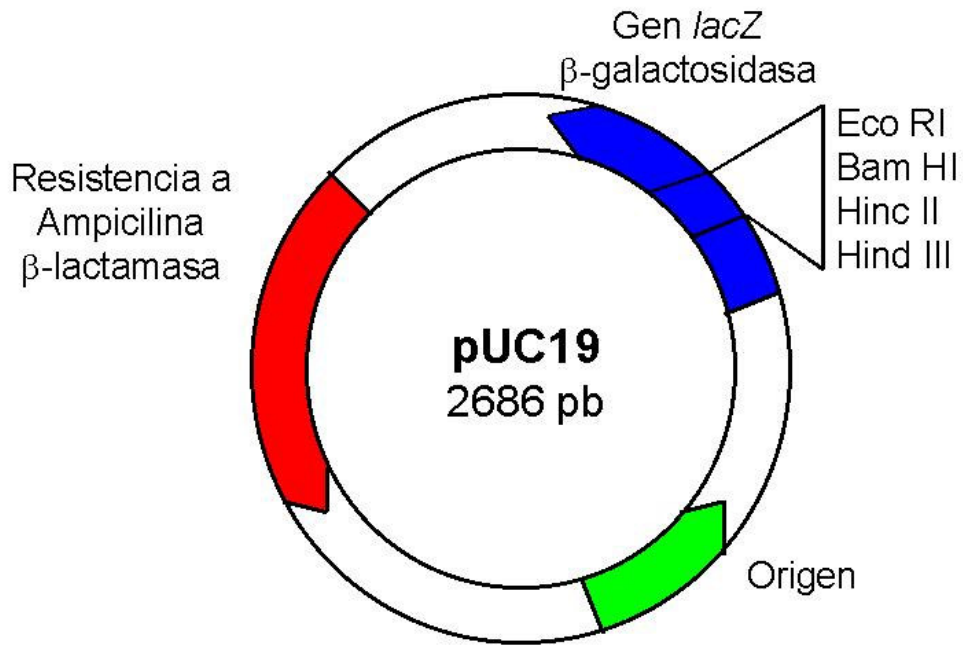


Figura 3: Mapa del plásmido pUC19, en color verde se encuentra el origen de replicación. En color rojo el gen que confiere resistencia a ampicilina (β -lactamasa), y en color azul el gen *lacZ* que codifica la β -galactosidasa y donde se encuentra el sitio de clonación múltiple (polilinker) con todas las secuencias de reconocimiento para las distintas endonucleasas de restricción, las cuales se muestran debajo de la imagen.

La figura 4 muestra la extracción de DNA plasmídico en dos formas alternas la circular y la lineal, la segunda se obtuvo por una digestión con la enzima *Bam* HI.

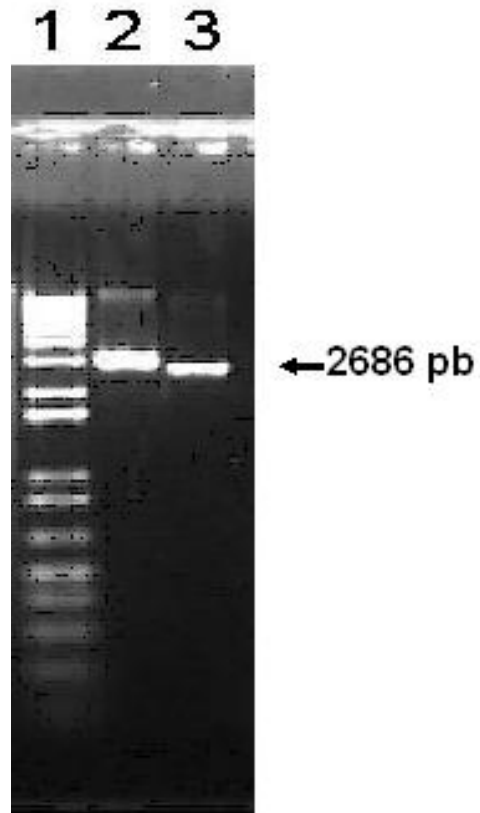


Figura. 4 DNA lineal de pUC19. Gel de agarosa al 1 % corrido a 120 V 94 mA y 30 min. Carril 1 marcador 1 Kb carril 2 puC19 en su forma circular. Carril 3 puC19 linearizado con *Bam HI*

CLONACIÓN

Los fragmentos de DNA cromosómico se ligaron a pUC19 linearizado, un plásmido que ha sido utilizado para clonar proteasas bacterianas con éxito.

Los plásmidos recombinantes se introdujeron por transformación en *E. coli* DH5 α seleccionando colonias resistentes a ampicilina en ANAIX. *E. coli* DH5 α fue incapaz de crecer en este medio y *E. coli* DH5 α portadora de pUC19 sin inserto creció formando colonias azules Lac $^{+}$. La frecuencia de transformantes Lac $^{-}$ fue de 49.7% (334/719), La figura 5 muestra las transformantes Lac $^{+}$ y Lac $^{-}$ resistentes a ampicilina.

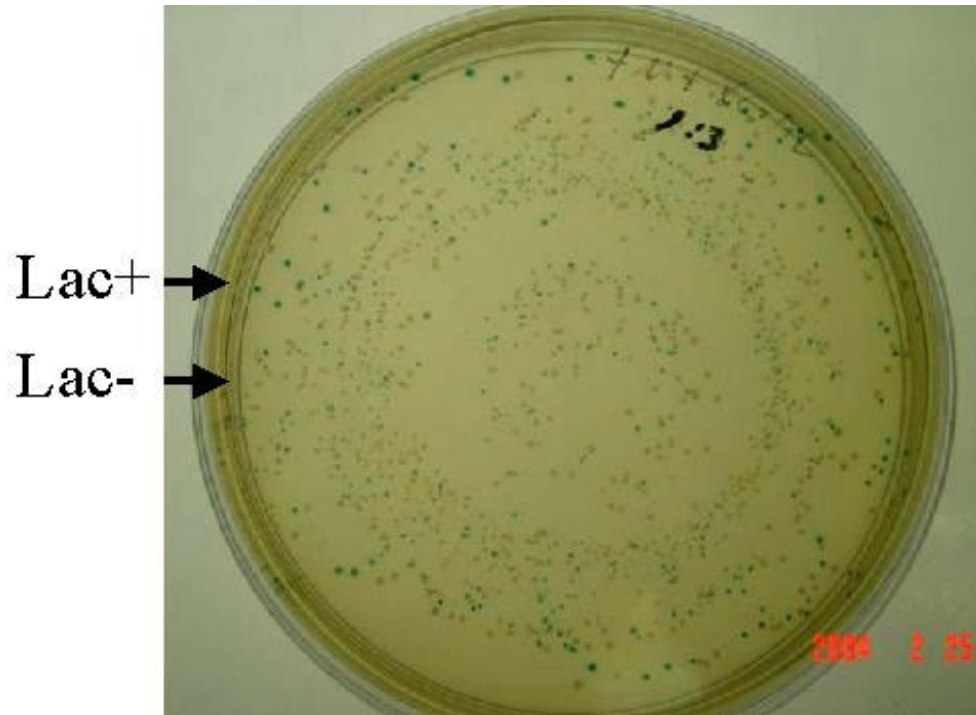


Figura 5: Transformantes Amp^R DH5 α . Las colonias azules son Lac⁺ (portan pUC19 sin inserto) y las blancas Lac⁻ (portan pUC19 con inserto).

ELECCIÓN DE TRANSFORMANTES CON ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Del evento transformante se obtuvieron 334 clonas Amp^R Lac⁻ que se probaron para detectar aquellas que presentaran actividad proteolítica, por su capacidad de degradar gelatina porcina al 0.1% o caseína bovina al 1% en medios de cultivo. Veintisiete clonas presentaron halos de degradación (figura 6) y se eligió una de ellas, a la cual se le nombró AS227. A esta se le determinó la actividad proteolítica secretada en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina o caseína.

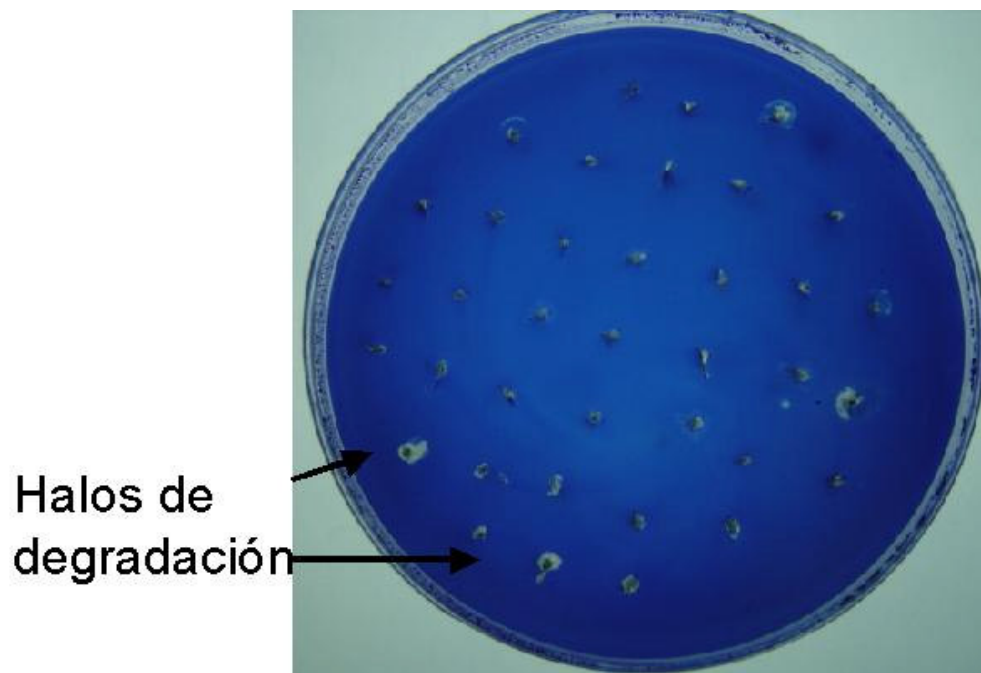


Figura 6: Clonas que presentaron actividad proteolítica, la cual se evidenció por los halos sin teñir debido a la degradación de caseína bovina.

ACTIVIDAD EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las proteínas secretadas por la clona AS227 se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizado con gelatina porcina o caseína bovina al 1% a 80 V, 94 mA por 2.5 horas, se utilizaron como controles negativos proteínas secretadas por *E. coli* DH5 α , con y sin plásmido pUC19 y como control positivo proteínas secretadas por *A. suis* (figura 7).

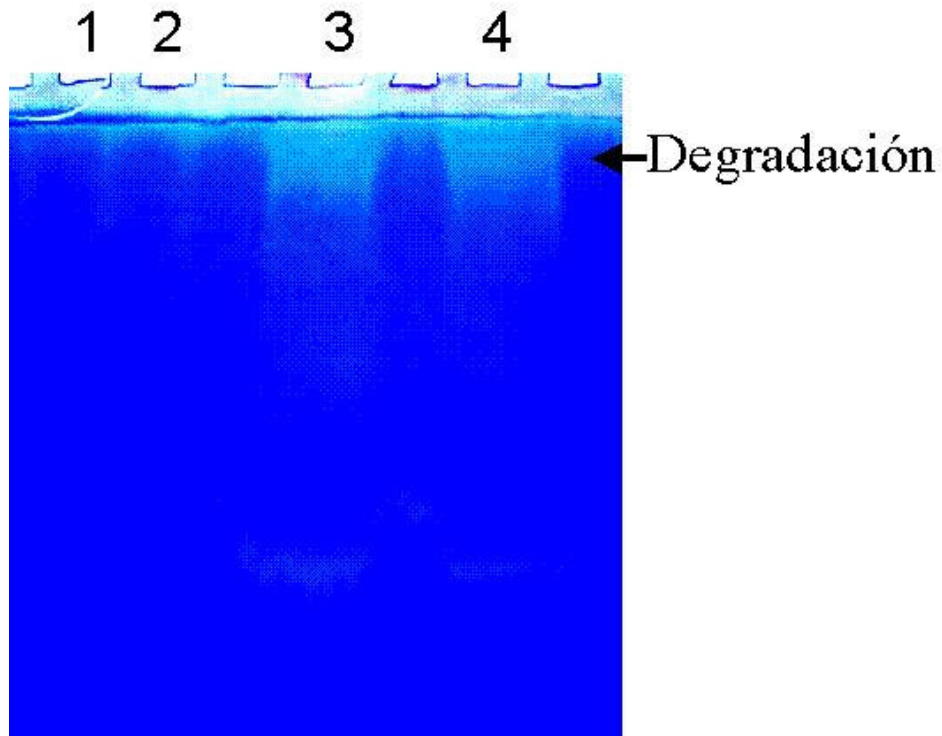


Figura 7: Actividad proteolítica en gel de poliacrilamida al 10% copolimerizado con caseína bovina al 1%. Carril 1 Proteínas secretadas por DH5α, carril 2 proteínas secretadas por *E. coli* DH5α (pUC19), carril 3 proteínas secretadas por la clona AS227, carril 4 proteínas secretadas por *A. suis*. La flecha indica la banda de degradación aproximadamente a 200 KDa.

EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO CON INSERTO

Se purificó el plásmido pAS227 de la clona AS227 y el inserto se liberó con *Bam*HI, presentando un tamaño de aproximadamente 2.5 Kb, (figura 8).

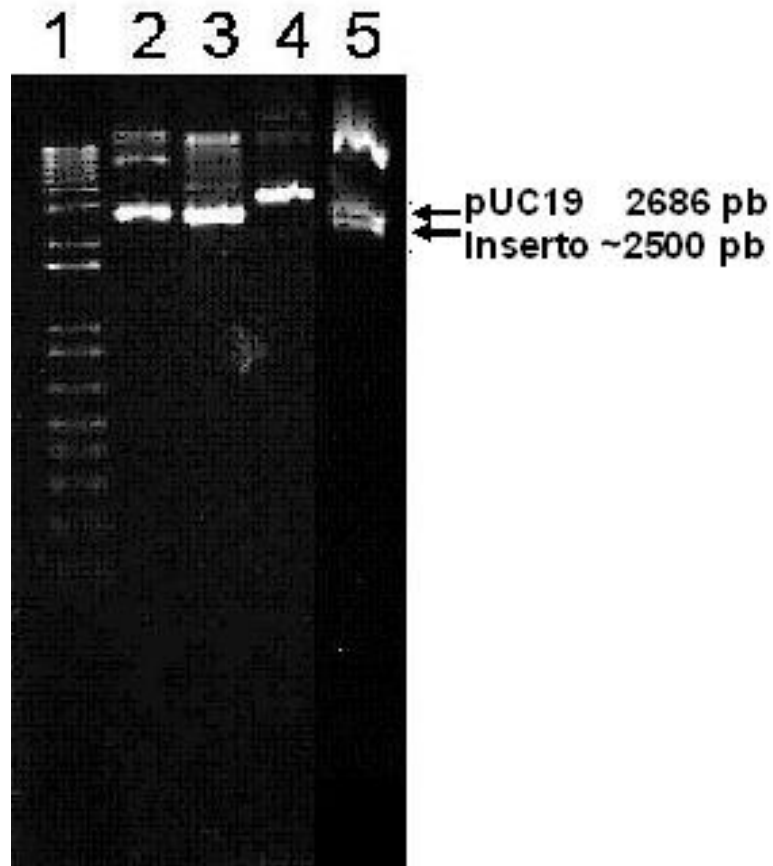


Figura 8: Liberación del inserto clonado que confiere actividad proteolítica a la clona AS277. Carril 1: marcador 1 Kb, carril 2: pUC19 sin linearizar, carril 3: pUC19 linearizado con *Bam HI*, carril 4: pAS227, carril 5: pUC19 y el inserto liberado. Se observa la liberación de un inserto de aprox. 2.5 Kb

DISCUSIÓN

Cuando se quiere clonar un DNA, es indispensable que éste se encuentre libre de contaminantes que interfieran en su digestión con la restrictasa y/o en la ligazón al vector. Por este motivo, al DNA cromosómico de *A. suis* se le dieron 2 lavados con fenol-cloroformo-álcool isoamílico para eliminar las proteínas y lípidos contaminantes. Los residuos de fenol fueron eliminados mediante un lavado con cloroformo, para evitar la desnaturalización de las enzimas de restricción. El RNA contaminante se eliminó por tratamiento con RNAsa y, por último, la muestra fue dializada para retirar el exceso de sales que pudieran inhibir la actividad enzimática durante las digestiones que se realizaron.

Para realizar la digestión del DNA cromosómico de *A. suis* se utilizó la enzima de restricción *Sau* 3AI la cual reconoce 4 nucleótidos (GATC) para su corte originando extremos cohesivos, de esta manera hay más probabilidad de que la enzima reconociera un mayor número de sitios de corte en el DNA cromosómico, a diferencia de una enzima que reconozca seis u ocho nucleótidos.

Como vector se utilizó el plásmido pUC19, el cual fue linearizado con *Bam* HI. Esta enzima reconoce y corta el hexanucleótido **GGATCC**, secuencia que se encuentra en el polilinker de pUC19, y origina extremos cohesivos que son compatibles con los generados por *Sau* 3AI (cuya secuencia de reconocimiento está marcada en negritas). pUC19 posee 16 sitios de corte para *Sau* 3AI, por lo que esta enzima no puede utilizarse para su linearización. La bacteria que se transformó fue *E. coli* DH5 α , la cual no secreta proteasas que interfieran con la detección de la actividad proteolítica codificada por alguno de los fragmentos de DNA de *A. suis* clonados en pUC19 (García, G. O. et al., 2004, Tenorio, G. V R. 1990).

Se eligieron las transformantes Amp^R Lac⁻, ya que este fenotipo evidenció que portaban un plásmido con un inserto, proveniente del DNA cromosómico de *A. suis*, que interrumpió el marco de lectura del gen *lacZ* presente en el sitio de clonación de pUC19. Las colonias se sembraron para verificar el fenotipo

Amp^R Lac⁻. Estas transformantes se sembraron en medio de cultivo sólido adicionado con gelatina o caseína para detectar aquellas capaces de producir halos de degradación de la proteína debido a la secreción de proteasa. Se obtuvieron 27 clonas con actividad proteolítica y se eligió a la que denominamos AS227 para determinar el tamaño del fragmento y la masa molecular de la proteasa.

Las proteínas secretadas al medio por la clona AS227 fueron corridas en geles de poliacrilamida copolimerizados con caseína bovina (o gelatina porcina, dato no mostrado). Se observó una proteína con actividad proteolítica cuya masa molecular (aproximadamente 200 kDa) es similar a la masa de la metaloproteasa secretada por *A. suis* (figura 7) (Negrete-Abascal, et al., 2004).

Para conocer el tamaño del inserto que codifica para la proteasa se obtuvo pAS227 y se digirió con *Bam* HI. El inserto mostró una movilidad electroforética correspondiente a un fragmento de aproximadamente 2.5 kb, suficiente para codificar para una proteína de aproximadamente 83 kDa. El tamaño de este fragmento no permite explicar la existencia de una proteasa monomérica de 200 kDa como la mostrada en la figura 7. Estos resultados sugieren que la actividad proteolítica es efectuada por una proteína multimérica, probablemente un dímero. En este punto es útil mencionar que en *A. pleuropneumoniae* se ha reportado un gen que codifica para una metaloproteasa. La secuencia de dicho gen muestra que codifica para una proteína de 101 kDa (García et al., 2004); sin embargo, la proteasa forma oligómeros de masa molecular mayor a 200 kDa y sufre procesamientos que originan proteínas de menor masa molecular con actividad proteolítica (81.5, 68.1, 60.4 y 46.9 kDa, García, G. O. et al., 2004).

Negrete-Abascal, et al., (2004) reportaron que las proteasas secretadas por *A. suis* y *A. pleuropneumoniae* son muy similares por sus características bioquímicas, la habilidad de degradar diferentes inmunoglobulinas, la estabilidad al calor y por su reacción cruzada con el mismo antisuero. Parece probable que la proteasa clonada en pAS227 sea capaz de degradar inmunoglobulinas; de ser así, jugaría un papel importante en la virulencia de

esta bacteria, puesto que las inmunoglobulinas tienen un papel muy importante en la defensa del hospedero contra los microorganismos patógenos ya que pueden neutralizar toxinas, bloquear la invasión de virus y facilitan la fagocitosis. La degradación de las inmunoglobulinas por proteasas de varios patógenos, incluyendo *A. suis*, permite que estos microbios evadan al sistema inmune e, incluso, que algunos utilicen los productos de degradación como nutrimentos para su desarrollo.

Luna en el 2003 obtuvo una clona que presenta actividad proteolítica de *P. multocida*, esta proteasa fue caracterizada parcialmente clasificándose dentro de las metaloproteasas al igual que la proteína de *A. suis*. Ostaaijen, J. V et al en 1996 obtuvo toxinas Apxl y ApxII de *A. suis* similares a las de *A. pleuropneumoniae* demostrando que las secuencias de amino ácidos es idéntica, sin embargo, encontró diferencia en los genes que codifican la producción de estas proteínas, es por ello que debe ser muy probable que haya cierta similitud en proteasas secretadas por miembros de la misma familia ya sea en las secuencias de amino ácidos o de nucleótidos, no solo con *A. pleuropneumoniae* sino con mas miembros de la misma familia *Pasteurellaceae*, esto se puede comprobar obteniendo ambas secuencias de la proteína clonada de *A. suis*, para poder estudiar su homología con otras proteínas.

Varios miembros de la familia *Pasteurellaceae* como *H. paragallinarum*, *P. multocida*, *M. haemolitica*, *A. pleuropneumoniae*, al igual que *A. suis*, secretan metaloproteasas. Estas pueden degradar parcial o totalmente las proteínas que estructuran los tejidos del huésped y facilitar su invasión. Estas proteasas asisten la hidrólisis de grandes péptidos en pequeños péptidos facilitando su absorción por las células. Siendo patógenos que pueden colonizar las mucosas es muy importante, para ellos, que puedan destruir proteínas del sistema inmune (IgA e IgG), que se encargan de la defensa del organismo ya sea neutralizando toxinas o facilitando la fagocitosis, al degradar estas proteínas el patógeno además de evadir la respuesta defensiva del hospedero puede obtener nutrientes para su desarrollo, (Rivero, G. P. C, 2005., Gómez, G. E.

2004., Negrete-Abascal, et al., 2004., Luna, 2003., Negrete-Abascal, E. et al.,
1998., Rao, M. B. et al., 1998).

CONCLUSIONES

- Se obtuvo un banco genómico de *A. suis* que cuenta con 324 clonas DH5 α Amp^RLac⁻ que poseen pUC19+inserto.
- 27 de las clonas secretan una actividad proteolítica.
- La clona AS227 posee un inserto de 2.5 kb del genoma de *A. suis* que le confiere la capacidad de secretar una proteasa.
- Es probable que la proteasa codificada por el inserto sea multimérica.

PERSPECTIVAS

- Caracterizar bioquímicamente la proteasa secretada: requerimiento de iones, estabilidad al calor, al pH, tipo de proteasa.
- Secuenciar el fragmento de DNA y determinar el ORF.
- Comparar la secuencia de la proteasa secretada por *A. suis* con otras proteasas secretadas descritas para miembros de la misma familia y para otras bacterias patógenas.
- Mutagenizar el gen clonado e introducirlo por recombinación a la cepa de *A. suis* para comparar la virulencia de la cepa silvestre con la de la mutante y estimar la participación de la proteasa en la infección.

BIBLIOGRAFIA

- Abul-Milh, M., Paradis, S. E., Dubreuil, J. D., Jacques, M. 1999. Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography. *Infect. Immun.* 67:4983-4987
- Anderson, J. E., Sparling, P. F., Cornelissen, C. N., 1994. Gonococcal transferrin binding protein 2 facilitates but is not essential for transferrin utilization. *J. Bacteriol.* 176:3162–3170.
- Andrade Torres Angel. 2004. Movilidad in vitro de *Pasteurella multocida* y clonacion del gen *fliC*. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. Tlalnepantla, Estado de México
- Argos. P, 1987. A sensitive procedure to compare amino acid sequences. *J. Mol. Biol.* 193:385-396.
- Bahrami, F., Ekins, A., Niven, D. F. 2003. Iron acquisition by *Actinobacillus suis*: identification and characterization of transferrin receptor proteins and encoding genes. *Vet. Microbiol.* 94: 79-92
- Bertram, T. A. 1986. Intravascular macrophages in lung of pigs infected with *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.* 23:681-691
- Bertram, T. A. 1985. Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.* 22:598-609
- Bossé, J. T., Janson, H., Sheehan, B. J., Beddek, A. J., Rycroft, N., Kroll, J. S., Langford, P. R. 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes infect.* 4:225-235
- Boyce, J. D., Adler, B. 2000. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect. Immun.* 68:3463-3468
- Cristensen, H., Bisgaard, M. 2004. Revised definition of *Actinobacillus sensu stricto* isolated from animals A review with special emphasis on diagnosis. *Vet. Microbiol.* 99:13-30
- Crijnsen, T. L., Van Leengoed, L. A., Dekker-Nooren, T. C., Schoevers, E. J., Verheijden, J. H. 1992. Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infect. Immunol.* 60:4867-4871
- Dom, P., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Charlier, G. 1994. In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs, *Infect. Immun.* 62: 1262–1267.

- Ekins, A., Niven, D. F., 2002. Identification of *fur* and *fldA* homologs and a *Pasteurella multocida* *tbpA* homolog in *Histophilus ovis* and effects of iron availability on their transcription. *J. Bacteriol.* 184:2539–2542.
- Fastrez, J, Fersht, A. R. 1973. Mechanism of chymotrypsin. Structure, reactivity, and nonproductive binding relationships. *Biochemistry.* 6:1067-74
- Fath, M. J., Kolter, R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev.* 57:995-1017
- Finlay, B. B., Falkow, S. 1997. Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:136-169
- Frey, J. 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* 3:257-261
- Frey, J., Bosse, J. T., Chang, Y. S., Cullen, J. M., Fenwick, B., Gerlach, G. B., Gygi, D., Haesebrouck, F., Inzana T. J., Jansen, R. 1993. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysin, pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Microbiol.* 139:1723-1728
- Frey, J. Kuhnert, P. 2002. RTX toxins in *Pasteurellaceae*. *Int. J. Med. Microbiol.* 292:149–158.
- García-Cuellar, C., Montañez, C., Tenorio, V., Reyes-Esparza, J., Durán, M. J., Negrete, E., Guerrero, A., de la Garza, M. A. 2000. 24-kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleaves actin in vitro. *Can. J. Vet. Res.* 64: 88-95.
- García, G. O., García, R. M., Garza, de la, M., Vaca, P. S., Paniagua, G. L., Mejía, R., Tenorio, V. R., Negrete-Abascal, E. 2004. *Actinobacillus pleuropneumoniae* metalloprotease: cloning and in vivo expresión. *FEMS Microbiol Letters.* 234, 81-86
- García Gómez Elizabeth. 2004, Identificación y caracterización de proteasas secretadas por *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* aislada de pollo. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. Tlalnepantla, Estado de México
- Gerlach, G. F., Klashinsky, S., Anderson, C., Potter, A. A., Willson, P. J., 1992. Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Infect. Immun.* 60:3253–3261.
- Gibson, B. W., Campagnari, A. A., Melaugh, W., Phillips, N. J., Apicella, M. A., Grass, S., Wang, J., Palmer, K. L., Munson, R. S. 1997. Characterization of a transposon Tn916-generated mutant of *Haemophilus ducreyi* 35000 defective in lipooligosaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* 179:5062–5071

González, G. C., Caamano, D. L., Schryvers, A. B., 1990. Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Mol. Microbiol. 4:1173–1179.

González, G. C., Yu, R. H., Rostek, P. R., Schryvers, A. B., 1995. Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes. Microbiology 141:2405–2416.

González-Pedrajo, B., Dreyfus, G. 2003, Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. Mensaje Bioquímico. Depto Bioquímica, Fac Medicina, UNAM, México, DF, MÉXICO. 27: 45-63.

Gray-Owen, S. D., Schryvers, A. B., 1996. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. Trends Microbiol. 4, 185–192.

Gray-Owen, S. D., Loosmore, S., Schryvers, A. B., 1995. Identification and characterization of genes encoding the human transferrin-binding proteins from *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun. 63, 1201–1210.

Idris, B. G., Harmon, F. A., Udeze, and Kadis, S. 1993. Pulmonary Lesions in Mice Inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* Hemolysin and Lipopolysaccharide. Vet. Pathol. 30: 234-241

Inzana, T. J., Ma, J., Workman, T., Gogolewski R. P., Anderson , P. 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. Infect. Immun. 56:1880–1889

Jeannotte, M. E., Slavic, D., Frey, J., Kuhnert, P., MacInnes, J. I. 2002. Analysis of non-porcine isolates of *Actinobacillus suis*. Vet. Microbiol. 85:83-93

Kaltrieder, H. B. Initiation of immune responses in the lower respiratory tract with red cell antigens, in : Kirkpatrick, C. H., Reynolds H. Y., (Eds) Immunologic and Infectious Reactions in the lung. Msrceel Dekker, Inc., New York. 73-97

Kamp, E. M., Vermeulen, T. M., Smits, M. A., Haagsma, J. 1994. Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. Infect Immun. 9:4063-4065

Kamp, E. M., Popma, J. K., Anakotta, J., Smits, M. A. 1991. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. Infect. Immun. 59: 3079-3085

Kilian, M. 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. J. Gen. Microbiol. 93:9-62

- Kim, B. H., Phillips, J. E. 1976. *Actinobacillus suis* in the horse. Vet. Rec. 98: 239
- Kuhnert, P., Berthoud, H., Straub, R., Frey, J. 2003. Host cell specific activity of RTX toxins from haemolytic *Actinobacillus equuli* and *Actinobacillus suis*. Vet Microbiol. 92:161-7
- Kvietys, P. R., Sandig, M. 2001. Neutrophil diapedesis : paracellular or transcellular? News Phys. Sci. 16 :15-19
- Legrain, M., Mazarin, V., Irwin, S. W., Bouchon, B., Quentin-Millet, M. J., Jacobs, E., Schryvers, A. B., 1993. Cloning and characterization of *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferrin-binding proteins Tbp1 and Tbp2. Gene 130, 73–80.
- Luna, R. M. J. N. 2003. Clonación del gen y caracterización parcial de una proteasa de *Pasteurella multocida*. Tesis de maestría. Instituto de ciencias, Centro de investigaciones en las ciencias microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Lund, A. H., Duch, M., Pederson, F. S. 1996. Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. Nucleic Acids Res. 24: 800-801
- Macfadyen, L. P., Dorocicz, I. R., Reizer, J., Saier, M. H. Jr., Redfield, R. J. 1996. Regulation of competence development and sugar utilization in *Haemophilus influenzae* Rd by a phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase system. Mol Microbiol. 21:941-52
- MacInnes, J. I. Desrosiers, R. 1998. Agents of the “Suis-ide Diseases” of Swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. Can. J. Vet. Res. 63: 83-89
- MacInnes J. I., Borr, J. D. 1990. The family Pasteurellaceae: modern approaches to taxonomy. Can. J. Vet. Res. 54:6-11
- Moller, K., Kilian, M. 1990. V Factor-Dependent Members of the Family *Pasteurellaceae* in the Porcine Upper Respiratory Track. J. Clin. Microbiol. 28:2711-2716
- Monteiro, M. A., Slavic., Michael, F. St., Brisson, J. R., MacInnes, J. I., Perry, M. B. 2000. The first description of a (1→6)-β-D-glucan in prokariotes: (1→6)-β-D-glucan is a common component of *Actinobacillus suis* and is the basis for a serotyping system. Carbohidr. Res. 329:121-130
- Negrete-Abascal, E., Vaca, P. S., Paniagua, G. L., Pérez, M, A., Ibarra, C. J., Pérez, M. V. M., Tenorio, V. R. 2004. Metalloproteases secreted by *Actinobacillus suis*. Curr. Microbiol. 49: 55-58.

Negrete-Abascal E., Reyes, M. E., García, R. M., Vaca, S., Giron, J. A., García, O., Zenteno, E., De La Garza, M. 2003, Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Bacterial. 185: 664-668

Negrete-Abascal, E., Tenorio, V. R., Guerrero, A. L., García, R. M., Reyes, M. E., Garza, de la, M. 1998. Purification and Characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1, An Antigen Common to All the Serotypes. Can. J. Vet. Res. 63: 183-190.

Negrete-Abascal E., Tenorio, V. R., de la Garza, M. 1999. Secretion of Proteases from *Pasteurella multocida* Isolates. Curr. Microbiol. 38: 64-67

Ogunnariwo, J. A., Schryvers, A. B., 2001. Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. J. Bacteriol. 183:890–896.

Ogunnariwo, J. A., Woo, T. K. W., Lo, R. C. Y., González, G. C., Schryvers, A. B., 1997. Characterization of the *Pasteurella haemolytica* transferrin receptor genes and the recombinant receptor proteins. Microbial. Pathogenesis 23:273–284.

Opdenakker, G., Fibbe, W. E., Van Damme. 1998. The molecular basis of leukocytosis. Immunolgy Today. 19:182-189

Ostaaingen, J. V., Frey, J., Rosendal, S., MacInnes. J. I. 1997. *Actinobacillus suis* strains isolated from Healthy and Diseased Swine Are Clonal and Carry *apxI/CABD* var, suis and *apxII/CA* var, suis Toxin genes. J. Clin. Microbiol. 35: 1131-1136

Pabst, R. 1996. The respiratory immune system of pig. Vet. Immunol. Immunopathol. 54:151-195

Paradis, S. E., Dubreuil, D., Rioux, S., Gottschalk, M., Jacques, M. 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. Infect. Immun. 62:3311–3319.

Puertas, M. J. 1996. Genética. Fundamentos y perspectivas. Ed. Interamericana MacGraw-HILL. Madrid, España. pp 338-342,713-714.

Rao, M. B., Aparna, M., Tanksale, Mohín S., Ghatge, Vasanti V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological Aspects of Microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 597-635

Ratledge, C., Dover, L. G., 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 54:881–941.

Ricard, M. A., Archibald, F. S., Niven, D. F., 1991. Isolation and identification of a putative porcine transferrin receptor from *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1. J. Gen. Microbiol. 137:2733–2740.

- Rivero García Paulo Cesar. 2005. Identificación de proteasas secretadas por *Haemophilus paragallinarum*. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala . UNAM. Tlalnepantla, Estado de México
- Sambrook, J., Fritsh, E. F. Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sauer, F., Mulvey, M., Schilling, J., Martinez, J., Hultgren, S. 2000. Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis, *Curr. Opin. Microbiol.* 3:65–72.
- Schryvers, A. B., Gonzalez, G. C., 1990. Receptors for transferrin in pathogenic bacteria are specific for the host's protein. *Can. J. Microbiol.* 36:145–147.
- Serebrin, S., Rosendal, S., Valdivieso-García A., Little, P. B. 1991. Endothelial cytotoxicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Res. Vet. Sci.* 50:18–22
- Serrano Vázquez Angélica. 2004. Condiciones de motilidad *in vitro* de *Haemophilus paragallinarum*. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. Tlalnepantla, Estado de México
- Sibille, Y. Reynolds, H. B. 1990. Macrophages and polimorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Resp. Dis.* 141: 471-501
- Slavic D., J DeLay, J., Hayes, M. A. MacInnes, J.I. 2000. Comparative pathogenicity of different *Actinobacillus suis* O/K serotypes. *Can. J. Vet. Res.* 64: 81-87
- Star, A. E., Dan, T., Minhas, K., Shewen, P. E., Coomber, B. L. 2004. Potential Involvement of Gelatinases and Their Inhibitors in *Mannheimia haemolytica* Pneumonia in Cattle. *Infect immun.* 72: 4393-4400
- Swords, W. E., Buscher, B. A., Ver Steeg li, K., Preston, A., Nichols, W. A., Weiser, J. N., Gibson, B. W., Apicella, M. A. 2000. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol. Microbiol.* 37:13-27
- Tatum, F. M., Briggs, R. E., Sreevatsan, S. S., Zehr, E. S., Ling, H. L., Whiteley, L. O., Ames, T. R., Maheswaran, S. K. 1998. Construction of an isogenic leukotoxin deletion mutant of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: characterization and virulence. *Microbial. Pathog.* 24:37-46
- Tenorio, G. V R. 1990. *Construcción de un banco genómico de Haemophilus pleuropneumoniae* serotipo 1. Tesis de Maestría en Ciencias. FES-Cuautitlán. UNAM. Cuautitlan Izcalli, Estado de México.

- Van de Kerkhof, A., Haesebrouck, F., Chiers, K., Ducatelle, R., Kamp, E. M., Smits, M. A. 1996. Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites on porcine alveolar epithelial cells Infect Immun. 64:3905-3907
- Van Leengoed, L. A., Kamp, E. M., Pol, J. M. 1989. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* to porcine lung macrophages. Vet. Microbiol. 4:337-49
- Ward, C. K., Lawrence, M. L., Inzana, T. J. 1998. Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: recombinant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotipo 1. Infect Immun. 66:3326-3336
- Ward, C. K., Inzana, T. J. 1994. Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. J. Immunol. 153: 2110-2121
- Welch, R. L. 2001. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and analogies in toxin biology. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 257. 85-111
- Welch, R. A. 1994. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacterial. Mol. Microbiol. 5:521-528
- Zhang, Y., Tennent, J. M., Ingham, A., Beddome, G., Prideaux, C., and Michalski, W. P. 2000. Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett. 189:15–18