



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL

CARACTERÍSTICAS DE LA ADHESINA DE *Mannheimia haemolytica*
Y DE SU RECEPTOR EN NEUTRÓFILOS DE BOVINO

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARÍA LUISA SAMANIEGO BARRÓN

TUTOR
FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES

COMITÉ TUTORAL
FRANCISCO TRIGO TAVERA
EDGAR ZENTENO GALINDO

México, D.F.

2009



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 6 de inmunología del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Concepción Agundis Mata, el Dr. Mohamed Alí Pereyra Morales y el Dr. Edgar Zenteno Galindo. También de manera conjunta en el laboratorio de tuberculosis del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

El presente estudio fue financiado por CONACYT proyecto G38590-B.
Beca de Maestría CONACYT 207444

DEDICATORIAS

A mis padres, por haberme inculcado el entusiasmo por buscar la superación personal y profesional, hoy cosechamos un logro más.

A mi amado esposo, por tu comprensión, apoyo y amor que me has brindado.

A mi pequeña Aimé, porque tu llegada ha traído a mi vida una inmensa alegría, tu inocencia es mi esperanza, y tu sola presencia es una motivación que jamás había conocido.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. Francisco Suárez Güemes y a los miembros del comité los Doctores Francisco Trigo Tavera y Edgar Zenteno Galindo, por su orientación y apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

A los honorables miembros del jurado los Doctores Jorge Tórtora, Francisco Suárez, Víctor Tenorio, Carlos Julio Jaramillo y Clara Espitia, por la dedicación de su tiempo en la revisión y por sus comentarios para mejorar la presentación de ésta tesis.

A la Dra. Concepción Agundis por sus consejos y apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio. ¡Gracias Jefa!

Al Dr. Alí Pereyra, por transmitirme sus conocimientos con paciencia, por su apoyo y ayuda.

A mis amigos del laboratorio 6, Alí, Carlos, Juan, Gabi, Dani, por esos momentos tan gratos compartidos que hicieron mi estancia muy agradable.

A la Dra. Beatriz Arellano e integrantes del laboratorio, por su ayuda y amistad.

A mis hermanos Griselda, Omar y Karen, por su apoyo, motivación y cariño que me han brindado siempre.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas nuevamente y ser como un segundo hogar.

RESUMEN

El complejo respiratorio bovino provoca pérdidas en industria ganadera de hasta mil millones de dólares anualmente en Estados Unidos de América. Siendo *Mannheimia haemolytica* el principal patógeno bacteriano, que cambia su estado de comensal a patógeno por una inmunosupresión por estrés y una infección previa por virus respiratorios. *M. haemolytica* posee diversos mecanismos que le permiten adherirse y por lo tanto colonizar e infectar a las células del tracto respiratorio. El propósito del presente estudio fue caracterizar la adhesina de 68kDa y de su receptor en neutrófilos de bovino. Se empleó una cepa de *Mannheimia haemolytica* A1, se cultivó en agitación a 3 diferentes temperaturas 37, 39 y 41°C en caldo infusión cerebro corazón. La adhesina se purificó mediante columnas de afinidad acopladas con fetuina, mucina y estroma de conejo, las fracciones retenidas se eluyeron con 200 mM de GlcNac en SSI, se les midió su actividad aglutinante y se determinó su concentración de proteínas. Las proteínas presentes en los extractos, en los lisados y en las fracciones retenidas se separaron en SDS-PAGE al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie. La fracción purificada se le determinó la composición de aminoácidos mediante cromatografía de gases. La adhesina presentó en mayor porcentaje glicina (22.8%), seguido por serina (22.2%). Se purificó el receptor de la adhesina en neutrófilos con una columna de afinidad acoplada con la adhesina. Los receptores se secuenciaron por MALDI-TOF y se compararon las masas de cada péptido en la base de datos del NCBI, presentaron homología con haptoglobina, talina y fibrinógeno. Se sugiere que la adhesina podría favorecer las lesiones en el tejido pulmonar por la respuesta exacerbada de los neutrófilos por unirse a la haptoglobina e inhibir sus funciones, además de que posiblemente al unirse al fibrinógeno, podría activarlo dando lugar a la fibrina y con ello, la presentación típica de la pasteurelosis bovina, al reconocer a la talina de los neutrófilos, probablemente favorece su migración, activación y posiblemente explosión oxidativa.

Palabras clave: *Mannheimia haemolytica*, adhesina, receptor, neutrófilos.

ABSTRACT

The bovine respiratory complex causes losses in cattle industry to a billion dollars annually in the United States of America. *Mannheimia haemolytica* is the main bacterial pathogen, which changes its state from a commensal to pathogen stress and immunosuppression by infection with respiratory viruses. *M. haemolytica* possesses several mechanisms that allow it to adhere and colonize and thus infect the respiratory tract cells. The aim of this study was to characterize the 68kDa adhesin and its receptor in bovine neutrophils. We used a *Mannheimia haemolytica* A1 strain, was grown in agitation at 3 different temperatures 37, 39 and 41 °C in brain heart infusion broth. The adhesin was purified by affinity columns coupled with fetuina, rabbit stromal and mucin, the material retained was eluted with 200 mM GlcNAc in SSI, the agglutinated activity and its protein concentration was determined. The proteins in the extracts, in the lysates and the material retained separated in SDS-PAGE at 10% and stained with Coomassie blue. The purified fraction was determined the amino acid composition by gas chromatography. The adhesin contain glycine in higher percentage (22.8%), followed by serine (22.2%). We purified adhesin receptor in neutrophils with an affinity column coupled with the adhesin. The receptors were sequenced by MALDI-TOF and compared the mass of each peptide in the NCBI database, the proteins showed homology with haptoglobin, talin and fibrinogen. It is suggested that the adhesin could promote lesions in the lung tissue exacerbated by the response of neutrophils to join the haptoglobin and inhibit their functions, in addition, possibly by binding to fibrinogen, could activate leading to fibrin and thereby the typical presentation of bovine pasteurellosis, recognizing the talin of neutrophils, probably favors their migration, activation, and possibly oxidative burst.

Key words: *Mannheimia haemolytica*, adhesin, neutrophils.

ÍNDICE

	Página
Dedicatorias	III
Agradecimientos	IV
Resumen	V
Abstract	VI
Capítulo I	
Introducción	1
Capítulo II	
Revisión de Literatura	3
1. Complejo Respiratorio Bovino	3
2. <i>Mannheimia haemolytica</i>	8
3. Mecanismos de Patogenicidad	11
3.1 Leucotoxina (LktA)	11
3.2 Lipopolisacárido	13
3.3 Cápsula	14
3.4 Proteínas de Membrana Externa	14
3.5 Enzimas	15
3.6 Plásmidos y genes de resistencia a antibióticos	16
3.7 Sistema de secreción tipo I	16
3.8 Adhesinas	17
Capítulo III	
Material y Métodos	21
Obtención y manejo de la cepa bacteriana	21
Obtención de la adhesina	21
Purificación de la adhesina por cromatografía de afinidad	23

Composición de aminoácidos de la adhesina	24
Adquisición de neutrófilos polimorfonucleares de sangre periférica de bovino	24
Obtención de proteínas de membrana de neutrófilos de bovino ...	25
Purificación del receptor de la adhesina de <i>Mannheimia</i>	25
Electroforesis en dos dimensiones	26
Inmunoelectrotransferencia	27
Secuenciación del receptor de la adhesina	28
Inmunohistoquímica	28
Capítulo IV	
Resultados	30
Capítulo V	
Discusión y Conclusiones	44
Literatura Citada	53

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

- Cuadro 1** Sistemas adhesina-receptor encontrados en el grupo HAP.
- Cuadro 2** Actividad aglutinante, concentración de proteínas y actividad específica del precipitado y lisado, obtenidos de cultivos de *m. Haemolytica* a diferentes temperaturas.
- Cuadro 3** Actividad aglutinante, concentración de proteínas y actividad específica de las fracciones puras obtenidas por cromatografía en una columna de fetuina.
- Cuadro 4** Actividad aglutinante, concentración de proteínas y actividad específica de las fracciones puras obtenidas por cromatografía en una columna de mucina.
- Cuadro 5** Actividad aglutinante, concentración de proteínas y actividad específica de las fracciones puras obtenidas por cromatografía en una columna de estroma de conejo.
- Cuadro 6** Comparación de la composición de aminoácidos de las adhesinas de *M. haemolytica*.
- Fig. 1** SDS-PAGE
- Fig. 2** SDS-PAGE.
- Fig. 3** Purificación del receptor en neutrófilos de bovino, de la adhesina de *Mannheimia haemolytica* mediante cromatografía de afinidad.
- Fig. 4** SDS-PAGE
- Fig. 5** Electroforesis del receptor de la Adh, en 2D en gel de poliacrilamida, con tiras IPG ph 3 a 10 y de 7 cm de longitud.
- Fig. 6** Inmunoelectrotransferencia
- Fig. 7** Inmunohistoquímica con neutrófilos de bovino activados con adhesina de *Mannheimia haemolytica* en concentraciones de 0.5 µg (I), 1 µg (II) y 1.5 µg (III) y a diferentes tiempos, 0 min (a), 30 min (b) y 60 min (c)

Fig. 8 Inmunohistoquímica con neutrófilos de bovino activados con WGA a concentraciones de 0.5 μg (I), 1 μg (II) y 1.5 μg (III) y a diferentes tiempos, 0 min (a), 30 min (b) y 60 min (c)

Fig. 9 Electroforesis en dos dimensiones de neutrófilos de bovino activados con diferentes concentraciones de adhesina de *Mannheimia haemolytica*: a (0.5 μg), b (1 μg), c (1.5 μg) y d (testigo). Los neutrófilos se lisaron posteriormente. Geles teñidos con azul de Coomasie

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

AMh	Adhesina de <i>Mannheimia haemolytica</i>
FR	Fracción retenida
FNR	Fracción no retenida
GlcNac	N-acetil D-Glucosamina
IROMPs	Proteínas de membrana externa reguladas por hierro
LPS	Lipopolisacárido
LktA	Leucotoxina
Mh	<i>Mannheimia haemolytica</i>
OMP	Proteínas de membrana externa
PBS	Solución de buffer fosfatos
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SSI	Solución salina isotónica
SDS-PAGE	Análisis electroforético en geles de poliacrilamida
V	Volts
WGA	Proteína del germen de trigo

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La industria bovina se ve afectada por enfermedades infecciosas, principalmente de tipo respiratorio que constituyen la principal causa de pérdidas a nivel mundial. En Estados Unidos representan hasta el 75% de los casos clínicos, con una mortalidad del 45 al 55% (Speer *et al.*, 2001a; Zecchinon *et al.*, 2005) y pérdidas económicas estimadas en 640 millones y de hasta mil millones de pesos anualmente (Bowland and Shewen, 2000; Whiteley *et al.*, 1992).

En México la producción de bovinos tiene un papel importante, según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en el periodo del 2000 al 2005, la producción de carne de bovino en canal ocupó el 2° lugar con un 31% del total de carne producida, mientras que la producción de leche de bovino representa un 98% del total de leche cruda que se produce a nivel nacional (SAGARPA, 2006).

Mannheimia haemolytica (Mh) es el principal patógeno bacteriano del complejo respiratorio bovino. La bacteria coloniza la cavidad nasal y las tonsilas de los animales sanos, sin embargo, posterior a una infección viral o estrés, Mh incrementa su número, lo que provoca su descenso hacia los pulmones causando neumonía. Poco se conoce acerca de cuáles son los mecanismos que permiten a Mh pasar de comensal a patógeno y que le ayudan a evadir la respuesta del tracto respiratorio.

La adhesión de los patógenos al epitelio de la mucosa es un paso indispensable en la colonización e infección del hospedador. En algunos casos las

adhesinas pueden ser liberadas al medio en ciertas etapas de su metabolismo, ya que participan activamente en la evasión de la respuesta inmune del huésped.

Estudios previos han demostrado la habilidad de Mh para adherirse a células epiteliales *in vitro*, y a la superficie de la mucosa respiratoria (Kisiela y Czuprynski, 2009, De la Mora *et al.*, 2006). Mh produce una proteína de membrana externa OmpA que probablemente juega un papel importante en la colonización, también expresa una proteína de alto peso molecular similar a una adhesina de *Haemophilus influenzae*, pero su función e interacción con sus células blanco no han sido estudiados aún (Kisiela y Czuprynski, 2009).

Jaramillo *et al.*,(2000) purificaron una adhesina (AMh) de 68 kDA que aglutina eritrocitos de conejo, la cual es inhibida por N-acetil-D-glucosamina (GlcNac), ácido neuramínico (NeuAc) y por previo tratamiento de los eritrocitos con sialidasa y proteasa, indicando que su receptor es una glicoproteína, además lograron inhibir la adhesión *in vitro* de Mh a epitelio traqueal mediante una incubación previa con el azúcar GlcNac y la adhesina pura.

Por otro lado, De la Mora *et al.*, (2006) encontraron que la AMh reconoce específicamente neutrófilos polimorfonucleares y en menor frecuencia monocitos, y fue capaz de activar el estallido respiratorio en neutrófilos.

Los objetivos de esta investigación fueron la caracterización de la adhesina de 68 kDa de Mh y de su receptor en neutrófilos de bovino, a fin de determinar el papel que juega la adhesina como mecanismo de patogenicidad, estudiar su interacción con los neutrófilos, así como su participación en el desarrollo de una infección aguda.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Complejo Respiratorio Bovino

Antecedentes

El complejo respiratorio bovino o fiebre de embarque se caracteriza por provocar una pleuroneumonía fibrinosa grave, afecta principalmente a animales menores de un año, recién transportados, con una mayor incidencia en animales nacidos en otoño e invierno (Aguilar Romero *et al.*, 1997; Lo, 2001; Pijoan Aguadé *et al.*, 1999; Trigo, 1987) De acuerdo a Zecchinon *et al.*, (2005) aproximadamente el 25% de los becerros padece un episodio de enfermedad respiratoria durante el primer año de vida, con incidencias del 14 al 38%. Por su parte Pijoan Aguadé *et al.*, (1999) menciona que esta enfermedad es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en becerras lecheras en Estados Unidos y Canadá, con brotes que llegan a afectar del 80 al 90% de los animales y con tasas de letalidad menores al 5%.

En México existe escasa investigación acerca del impacto económico que generan las neumonías en general. En un estudio realizado en becerras lecheras de dos establos de Tijuana, Baja California, en el que se evaluaron dos sistemas diferentes de alojamientos de sus crías, se determinó la incidencia y costo de las neumonías que afectaron a las mismas durante un año. Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad se calcularon con base en los costos directos e indirectos. El establo 1 mantuvo a sus crías en corraletas de metal dentro de un edificio, mientras que el establo 2 las mantuvo al exterior en casetas de madera. La incidencia de la enfermedad en el establo 1 fue de 39.9% y en el establo 2 de

19.7%, y los costos directos e indirectos producidos por neumonías por becerro nacida variaron respectivamente, entre \$501.41 y \$301.07, y entre \$83.25 y \$235.12 pesos .(Pijoan and Chavez, 2003)

El complejo respiratorio bovino es causado por la interacción de virus, bacterias y factores relacionados con el manejo de los animales que les generan estrés, tales como el transporte, el destete, el hacinamiento, los cambios bruscos de temperatura, el confinamiento de animales de diferentes edades, el nivel de inmunoglobulinas en el calostro, entre otros. Tales factores, se asocian con una elevación de la concentración de cortisol en el plasma, lo que provoca un decremento de la función leucocitaria.

Dentro de los agentes infecciosos primarios involucrados se encuentran el herpesvirus bovino tipo 1, el respiratorio sincitial bovino, parainfluenza 3 y de la diarrea viral bovina, estos virus causan un efecto citopático directo en el aparato respiratorio, y además reducen la remoción bacteriana ya que impiden la actividad de los cilios de las células epiteliales de la tráquea, también la capacidad fagocítica del macrófago alveolar se ve alterada, lo cual facilita la colonización pulmonar de agentes secundarios bacterianos; tales como *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* (Cusack *et al.*, 2003; Trigo, 1991; Weekley *et al.*, 1998a; Zecchinon *et al.*, 2005) siendo *Mannheimia* y *Pasteurella* las bacterias aisladas con más frecuencia tanto en los bovinos clínicamente enfermos de neumonía como en los bovinos sanos (Pijoan Aguadé *et al.*, 1999).

Mannheimia haemolytica (Mh) se localiza en la nasofaringe y en las tonsilas de animales sanos, en los cuales, los pulmones son capaces de eliminar la carga bacteriana. (Frank and Briggs, 1992; Narayan *et al.*, 2002). Sin embargo, cuando

se asocian los factores antes mencionados, se eleva la cantidad de Mh que existe en la mucosa nasal de los bovinos y es inhalada hacia los pulmones.

Se ha demostrado que el estrés por frío y el transporte de los animales incrementan los niveles de cortisol en el plasma, suprimiendo la blastogénesis de linfocitos *in vitro*. El transporte, por ejemplo, en terneros de 4 a 6 meses de edad durante periodos de 4 horas provoca una leucocitosis con neutrofilia, disminución de linfocitos T, supresión de la blastogénesis linfocitaria e incremento en la actividad de los neutrófilos, además de la disminución de la actividad del complemento. En caso de clima frío, se ha demostrado, que provoca un aumento en los niveles de cortisol sérico, pero no en los niveles de histamina y bradicinina, tales alteraciones en el sistema inmune probablemente afectan la capacidad del organismo para mantener una homeostasis normal con el microorganismo (Rodostits *et al.*, 2002; Weekley, 1998a).

Los agentes virales y bacterianos antes mencionados, rompen la barrera antimicrobiana de β -defensinas, péptidos aniónicos y secreciones serosas y mucosas del tracto respiratorio, permitiendo a Mh cambiar de un estado comensal a patógeno. La infección por Herpes virus 1, Parainfluenza 3, y el virus de la diarrea viral bovina permiten la proliferación de la bacteria en la nasofaringe ya que impiden la actividad de los cilios de las células epiteliales de la traquea, e inhiben las funciones de los linfocitos y de los neutrófilos. Además el virus sincitial bovino en conjunto con el herpes virus inmunosuprimen al animal debido a la disminución de la actividad de los linfocitos T y B, monocitos y macrófagos (Cusack *et al.*, 2003; Rice *et al.*, 2007).

La transmisión de la mannheimiosis (pasteurelosis) es horizontal mediante aerosoles, los signos clínicos son disnea, depresión, tos, descarga nasal mucopurulenta, rinitis, fiebre de 42 °C, aumento de la frecuencia cardiaca, pérdida

de peso, y lagrimeo. La frecuencia respiratoria aumenta en la fase inicial, seguido de disnea, los animales se inclinan hacia delante con los codos abducidos y el cuello extendido para incrementar la capacidad respiratoria, posteriormente cuando las lesiones pulmonares son extensas, la respiración se torna más difícil, causando que los animales abran el hocico, en la auscultación se percibe un incremento en los sonidos bronquial y vesicular antero ventrales y fricción pleural (Zecchinon *et al.*, 2005). La mortalidad ocurre frecuentemente dentro de las 48 horas después de observarse dichos signos. (Cusack *et al.*, 2003; Trigo, 1991; Weekley *et al.*, 1998a, b).

Las lesiones pulmonares son lobulares y antero ventrales, se caracterizan por una infiltración de neutrófilos y exudado con fibrina dentro de los alvéolos. El septo interlobular se distiende con material gelatinoso que contiene exudado, fibrina y leucocitos, el bronquio presenta necrosis y descamación de las células epiteliales. El alveolo contiene edema, fibrina y ocasionalmente hemorragia, además de células como macrófagos y neutrófilos, que agravan el daño en el pulmón (Zecchinon *et al.*, 2005)

El diagnóstico incluye el aislamiento viral, examen histopatológico, inmunoensayos, procedimientos de transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) o un múltiple PCR en tiempo real propuesto por Zulauf (2007), para identificar los patógenos virales involucrados. Para la detección e identificación de Mh se pueden realizar diferentes técnicas de laboratorio que incluyen: aislamiento y fenotipificación, serotipificación y genotipificación. Para el aislamiento y fenotipificación se utiliza el cultivo *in vitro* en medios ricos como agar sangre y pruebas bioquímicas, que permiten identificar morfológicamente las colonias, observar la producción de hemólisis así como su comportamiento bioquímico (Angen *et al.*, 1999).

Además de las pruebas bioquímicas convencionales, existen micro ensayos comerciales que facilitan y agilizan la fenotipificación, como el sistema API 20 E. Para la serotipificación se emplea la inhibición de la hemaglutinación mediante la utilización de antisueros de referencia específicos para los 17 serotipos conocidos. Para la genotipificación se cuenta con técnicas como hibridación ADN-ADN, electroforesis de enzimas multilocus (EEML), ensayo de ADN polimórfico al azar (APAA), también del polimorfismo del ADN (RADP), análisis de restricción para la detección de los genes del ARNr o ribotipificación y secuenciación del ADN (Angen *et al.*, 1999; Maslow and Mulligan, 1993; Versalovic and Lupski, 2002), así como ensayos de PCR múltiple para identificar distintas especies del género *Mannheimia* (Alexander *et al.*, 2008).

Debido a que la causa de la pasteurelosis es multifactorial, la prevención debe abarcar dichos aspectos como reducir los cambios que provoquen estrés en los animales o dar un lapso de tiempo entre ellos, asegurarse de que el ganado tenga acceso al alimento y agua antes, durante y después del transporte o eventos estresantes (Weekley *et al.*, 1998b). También es indispensable que los neonatos tengan acceso al calostro de la madre, pero se debe considerar la duración de la inmunidad pasiva para poder establecer un calendario de vacunación óptimo (Prado *et al.*, 2006). Se ha comprobado que la vacunación antes y después del destete disminuye la morbilidad y los costos médicos además de presentar una mejor ganancia diaria de peso (Fulton *et al.*, 2004; Speer *et al.*, 2001b).

En algunos países se han realizado estudios para evaluar las diferentes vacunas contra la pasteurelosis, tales como bacterinas que contienen varios antígenos pero proporcionan una inmunidad corta; vacunas con la leucotoxina y el lipopolisacárido libres de células; vacunas polivalentes que proporcionan inmunidad contra antígenos virales y bacterianos y vacunas vivas modificadas que

producen una respuesta inmune más intensa (Cardella *et al.*, 1987; Hodgins and Shewen, 2000; Weekley *et al.*, 1998b). En otros casos, se intenta lograr la inducción de inmunidad local a través de la liberación de antígenos en la mucosa y de esta forma reducir la colonización en la nasofaringe, ya sea mediante la expresión de antígenos de Mh en vectores virales, que facilitarían la replicación en el tracto respiratorio superior, o la administración oral de los antígenos encapsulados en microesferas de alginato, así como el desarrollo de plantas genéticamente modificadas que expresen los antígenos de Mh, con el propósito de producir vacunas transgénicas comestibles (Jaramillo-Arango *et al.*, 2009).

El tratamiento es difícil ya que debe ir enfocado a combatir las diferentes causas de la enfermedad, sin embargo la terapia con antimicrobianos es el método utilizado con más frecuencia. La selección de un quimioterapéutico en general, debería determinarse por el costo, la duración de su acción y que sea de fácil administración, además de la susceptibilidad y resistencia de *Mh* dada en cada localidad. Los antimicrobianos más usados para el tratamiento contra neumonías son oxitetraciclina, trimetoprim con sulfametoxazol, penicilina con estreptomina, tilmicosin, ceftiofur, ampicilina, eritromicina y enrofloxacin (Chang and Carter, 1976; Fales *et al.*, 1982; Pijoan and Aguilar, 2000). También se incluyen el uso de antiinflamatorios no esteroideos como tratamiento auxiliar en los casos graves, (los corticosteroides están contraindicados por el efecto inmunosupresor que poseen), broncodilatadores y mucolíticos (Cusack *et al.*, 2003), pero no existen datos contrastados que apoyen la experiencia de campo de algunos veterinarios sobre su eficacia y valor económico (Rodostits *et al.*, 2002).

2. *Mannheimia haemolytica*

El género *Mannheimia* pertenece a la siguiente clasificación taxonómica: Reino Bacteria; phylum Proteobacteria; clase Gammaproteobacteria; orden

Pasteurellales; familia *Pasteurellaceae*. Posee 6 especies (NCBI, 2009); *M. succiniciproducens* que fue aislada del rumen de bovinos y es capaz de producir ácido succínico, acético y fórmico en condiciones de CO₂, Lee y cols (2002)., pudieron clasificar a ésta bacteria dentro del género gracias al análisis filogenético basado en la secuencia de ARN 16s ribosomal. *M. glucosida*, que corresponde a cepas anteriormente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupos A-H y 9, así como el serotipo 11. *M. granulomatis*, incluye cepas clasificadas previamente como *P. granulomatis*, Bisgaard taxon 20 biovariedades 1 y 2 y *P. haemolytica* biogrupo 3J aisladas de casos de bronconeumonía y conjuntivitis en especies de lepóridos y venados y de la cavidad oral de bovinos. *M. ruminalis*, que consiste en dos biovariedades, una correspondiente a Bisgaard taxon 18 biovariedad 1 y 3, y la otra corresponde a cepas no hemolíticas de *P. haemolytica* biogrupo 8D previamente descritas como *Actinobacillus lignieresii*, las cepas fueron aisladas del rumen de ovinos y bovinos y no se asocian a condiciones de enfermedad. *M. varigena* primeramente como *P. haemolytica* biogrupo 6, Bisgaard taxon 36 y taxon 15 biovariedad 1 y 2, las cepas fueron aisladas en casos de neumonía, mastitis y septicemia en bovinos y en porcinos con neumonía, septicemia y enteritis. Por último *M. haemolytica* (previamente como *P. haemolytica* biogrupo 1) que incluye los serotipos 1, 2, 5-9, 12-14, 16 y 17 todos aislados únicamente de rumiantes (Angen *et al.*, 1999)

Mannheimia haemolytica ha sido reclasificada continuamente, primero fue nombrada como *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt 1885, posteriormente, en 1896, Fludge la renombra como *Bacillus bovisepitica* (Highlander, 2001), en 1932, Newson y Cross proponen el nombre de *Pasteurella haemolytica* por producir una hemólisis débil cuando se cultiva en agar sangre de ovino y fue clasificada en 16 serotipos, basados en la prueba de hemaglutinación indirecta utilizando antígenos capsulares. Smith entre 1959 y 1961, la clasifica en dos biotipos, A y T, basados en su habilidad de fermentar arabinosa y trehalosa

respectivamente. Había 12 serotipos A y 4 serotipos T identificados, estos últimos los reclasificaron en 1990 como *Pasteurella trehalosi*.

Recientemente, *P. trehalosi* fue reclasificada como *Bibersteinia trehalosi* (Blackall et al., 2007). Younan y Fodor caracterizaron el nuevo serotipo A17 aislado de una oveja en Siria (Younan and Fodor, 1995). En 1999, con base en estudios de hibridaciones ADN-ADN y secuencias 16S ARN permitieron renombrar los serotipos A (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) como *Mannheimia haemolytica*, donde el serotipo A11 se renombró como *M. glucosida* (Angen et al., 1999; Bingham et al., 1990; Highlander, 2001; Quirie et al., 1986; Zecchinon et al., 2005).

Mh es una bacteria patógena oportunista del ganado bovino, ovino y otros rumiantes, gram negativa, encapsulada, cocobacilar o bacilo pequeño pleomórfico (1 a 3 μm de diámetro), no móvil, anaerobia facultativa, mesofílica, oxidasa positiva e indol negativa. Fermenta glucosa, D-sorbitol, D-xilosa, maltosa dextrina y arabinosa. Es negativa a las pruebas de gelatinasa, rojo de metilo y Voges-Proskauer, también es negativa a ornitina descarboxilasa y NPG (β -glucosidasa), pero positiva a ONPF (α -fucosidasa). Puede crecer inicialmente en agar MacConkey, agar chocolate y forma colonias de coloración blanca a gris claro con un diámetro de 1 a 3 milímetros, produciendo una hemólisis débil cuando se siembra en agar sangre de ovino (Angen et al., 1999; NCBI, 2009).

Mh puede aislarse a partir de procesos neumónicos en bovinos y ovinos, en septicemias y mastitis en ovejas. De los serotipos conocidos, el A1 y A2 tienen mayor prevalencia en el mundo, ambos colonizan el tracto respiratorio de bovinos y ovinos. (Blanco et al., 1993; Jaramillo Meza et al., 1987; Pijoan Aguadé et al., 1999). Sin embargo, el A1 se aísla más frecuentemente de lesiones neumónicas en los casos mannheimiosis bovina, aún cuando en los bovinos sanos se aíslan

los serotipos A1 y A2 en la nasofaringe, esto debido a que el serotipo A1 rápidamente reemplaza al A2 como serotipo principal posterior a un estado de estrés o de una infección viral. Davies *et al.*, (2001) mencionan que los serotipos A1 y A6 se aíslan en la mayoría de los casos de pasteurelisis bovina, estudios recientes en Alemania y Estados Unidos documentan que el serotipo A6 constituye el 30% del total de serotipos aislados (Al-Ghamdi *et al.*, 2000; Purdy *et al.*, 1997). Recientemente, en México en un estudio realizado por Jaramillo-Arango *et al.*, (2008) de 187 aislamientos, el 26% fue serotipo A1 y el 5% serotipo A6, el 66% resultaron cepas no tipificables por la técnica de hemoaglutinación indirecta y el 3.2% pertenecieron a *M. glucosida*, el cual sólo se había aislado de exudado de ovinos (Blanco *et al.*, 1995).

3. Mecanismos de Patogenicidad

Mh posee factores de virulencia tales como: leucotoxina (LktA), lipopolisacárido (LPS), cápsula, proteínas y lipoproteínas de la membrana externa (OMP), glicoproteasa, adhesinas, enzimas (neuraminidasa, metaloglicoproteasas y proteasas de inmunoglobulinas) y plásmidos de resistencia a quimioterapéuticos. Estos factores permiten a Mh invadir y multiplicarse en el pulmón, como consecuencia lisan a las células fagocíticas de los alvéolos, lo que aumenta la proliferación bacteriana contribuyendo directa e indirectamente al daño pulmonar (Highlander, 2001; Jaramillo *et al.*, 2000; Jeyaseelan *et al.*, 2002; Lo, 2001; Straus *et al.*, 1993; Weekley *et al.*, 1998a; Zecchinon *et al.*, 2005).

3.1 Leukotoxina (LktA)

La LktA de Mh es una proteína termolábil, hidrosoluble, con un peso 104 kDa aproximadamente, se produce en altas concentraciones durante la fase logarítmica por los 16 serotipos y por algunas cepas no tipificables de Mh (Van

Rensburg and Du Preez, 2007). La LktA es una citolisina formadora de poros, pertenece a la familia de las RTX ya que su estructura primaria contiene regiones altamente conservadas, de repeticiones de nonapéptidos ricos en glicina. La organización genética la LktA está dada por un operón que contiene 4 genes, encargados de la síntesis, secreción y activación de la toxina. El gen *lktA* codifica la estructura proteínica de la LktA pero en forma inactiva (proLktA), el gen *lktC* codifica a una proteína capaz de activar a la proLktA mediante acilación. Los genes *lktB* y *lktD* codifican a las proteínas LktB y LktD respectivamente, responsables de transportar a la LktA acilada al medio extracelular (Adamu, 2007; Highlander, 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002)

La LktA reconoce en forma específica a los leucocitos y plaquetas de los rumiantes, lo que sugiere que interactúa con diversos receptores de las células blanco, algunos estudios han demostrado que la LktA se une a las integrinas β_2 a través de la subunidad CD18 y al antígeno leucocitario asociado a función 1 (LFA-1). El principal efecto de la LktA es la formación de poros, la toxina se secreta como monómero y se inserta en la bicapa lipídica formando un poro hidrofílico de 0.6 a 1 nm de diámetro, que permite la salida de potasio y la entrada de calcio, ocasionando el hinchamiento de la célula y posteriormente su lisis (Adamu, 2007; Highlander, 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2002; Van Rensburg and du Preez, 2007; Zecchinon *et al.*, 2005).

En concentraciones altas la LktA provoca lisis de neutrófilos y macrófagos alveolares, lo que impide su actividad antimicrobiana y facilita la proliferación y sobrevivencia de Mh dentro del pulmón, por otro lado, la lisis celular libera enzimas proteolíticas y sustancias proinflamatorias. En bajas concentraciones la LktA induce activación de los neutrófilos y macrófagos alveolares, provocando una translocación del factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y la liberación de mediadores de la inflamación, incluyendo proteasas y especies reactivas de

oxígeno, óxido nítrico y citocinas proinflamatorias, además de inducir la apoptosis (Adamu, 2007; Highlander, 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002; Zecchinon *et al.*, 2005).

3.2 Lipopolisacárido

El LPS bacteriano está presente en los microorganismos gram-negativos, esta formado por un dominio hidrofóbico conocido como Lípido A, un oligosacárido central y un polisacárido distal (antígeno O). Representa 10- 25% del peso de Mh, en la biosíntesis del LPS están involucrados dos genes, que ya han sido clonados y caracterizados. Se han identificado 8 diferentes tipos de LPS en el serotipo 1 de Mh, estas variantes contienen combinaciones 4 oligosacáridos centrales, una del antígeno O, con una repetición idéntica del trisacárido. El antígeno O del serotipo 6, 9 y 12 es químicamente idéntico al serotipo 1, en contraste los serotipos 2 y 8 carecen del antígeno O (Adamu, 2007; Highlander, 2001).

El LPS se une a una proteína de fase aguda (Lipopolisaccharide Binding Protein, LBP por sus siglas en inglés), a través del Lipido A, esta proteína tiene alta afinidad por diferentes tipos de LPS. El complejo LPS-LBP interactúa con monocitos humanos a través de la molécula CD14. Algunos tipos de lípido A se unen a un receptor de membrana denominado receptor tipo Toll 4 (TLR4) presente en macrófagos y células del endotelio, en una interacción que incluye otras proteínas, como LBP, CD14 y MD-2. En los macrófagos, el lípido A es responsable de activar la síntesis de diversos mediadores de la inflamación, tales como la IL-1 β y la IL-8 vía TNF- α , que dirige a los neutrófilos causando así la inflamación y daño en las células del endotelio pulmonar bovino (Adamu, 2007; Highlander, 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2007; Zecchinon *et al.*, 2005). En estudios recientes se ha demostrado que existe un sinergismo entre la LktA y el LPS provocando un incremento en los niveles del mRNA de la IL-8 y mayor expresión de TNF- α , así como la lisis de macrófagos alveolares (Lafleur *et al.*, 2001), y de

acuerdo a Leite y cols (Leite *et al.*, 2003), los neutrófilos incrementan la expresión de LFA-1 después de la exposición con LktA y LPS *in vitro*, y por lo tanto se induce una inflamación exacerbada en los pulmones, característica de la pasteurelisis.

3.3 Cápsula

La cápsula del serotipo A1 participa en la adhesión de la bacteria a la mucosa del pulmón, facilita la colonización e inhibe la fagocitosis por neutrófilos proporcionando a la bacteria resistencia a la lisis mediada por complemento. La cápsula del serotipo A1 está compuesta por residuos de manopiranosos, mientras que la cápsula del serotipo A2 está compuesta por ácido siálico o colomínico, que no es inmunogénico por ser un componente normal de las membranas del hospedero. La inmunización sólo con la cápsula, o en combinación con otros factores de virulencia provoca un incremento en la severidad de las lesiones en los animales vacunados en comparación con los testigos, adicionalmente los niveles altos de anticuerpos no protegen al momento del desafío experimental (Highlander, 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002).

3.4 Proteínas de membrana externa

Mh produce varias proteínas de membrana externa (Outer Membrane Proteins, OMP por sus siglas en inglés) durante su crecimiento en el tejido pulmonar: una OMP de 32 kDa (PomA), probablemente involucrada en el transporte de nutrientes, una PomB de 35 kDa, varias lipoproteínas de superficie con pesos moleculares de 19 a 45 kDa (Lpp38, PlpA, PlpB y PlpD) y OMPs reguladas por hierro (IROMPs) de 77 kDa. Las OMPs *in vitro* aumentan la adherencia y quimiotaxis de los neutrófilos, en macrófagos peritoneales de ratón causan estallido respiratorio con liberación de óxido nítrico y están involucradas en

la reorganización del citoesqueleto de las células del hospedador. Las IROMPs son responsables de la captación de hierro, también son potentes quimiotácticos para los neutrófilos, inhibiendo su actividad fagocítica y alterando la muerte intracelular. Posiblemente las OMPs y lipoproteínas se cree que están involucradas en la sensibilidad sérica y son importantes antígenos protectores. Los anticuerpos contra algunos de estos antígenos son capaces de inducir la fagocitosis y la activación del complemento (Highlander, 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002).

3.5 Enzimas

Todos los serotipos de *Mh* producen una zinc-metaloglicoproteasa, que actúa en la superficie de las células del hospedador y aumenta la adhesión, que trae como consecuencia la agregación plaquetaria y su deposición en los alvéolos, su actividad *in vitro* puede potencializarse por la incubación con la LktA que tiene actividad contra O-sialoglicoproteínas (Highlander, 2001). *Mh* produce la enzima neuraminidasa que participa en la colonización, particularmente en el tracto respiratorio alto, reduciendo la viscosidad del moco e impidiendo la remoción bacteriana que normalmente realizan los cilios en el tracto respiratorio, con lo que resulta una penetración más profunda de la bacteria en el epitelio, además remueve los residuos de ácido siálico en la superficie del epitelio disminuyendo la carga negativa, permitiendo así un mayor acercamiento de la bacteria a la superficie de las células (Abdullah *et al.*, 1991). Las proteasas de inmunoglobulinas son endopeptidasas que separan la IgA monomérica en sus fragmentos Fab y Fc, de tal forma que se favorece la colonización por eliminación local de anticuerpos que bloquean la adherencia. Lee y Shewen (1996) informaron la presencia de una proteasa específica contra IgG en sobrenadante de cultivo parcialmente purificado, constituyendo así el primer anticuerpo presente en el tracto respiratorio bajo en los bovinos. La destrucción de IgG en el pulmón

reduciría la fagocitosis, al inhibir la opsonización por los macrófagos alveolares (Abdullah *et al.*, 1991; Adlam *et al.*, 1984; Angen *et al.*, 1999; Brogden and Clarke, 1997; Donachie *et al.*, 1984; Reggie *et al.*, 2006).

3.6 Plásmidos y genes de resistencia a antibióticos

Dentro de la familia *Pasteurellaceae* se han reportado la presencia de plásmidos con genes de resistencia antimicrobiana, en el caso de *Mh* el plásmido llamado pYFC1, contiene genes de resistencia a sulfonamidas y estreptomycin, en *M. varigena* el plásmido *pMVSCS1* que además contiene el gen de resistencia a cloranfenicol, *Pasteurella multocida* tiene plásmidos como *pIGI* y *pVM111* y el plásmido *pMHT1* presente en los géneros bacterianos antes mencionados (Kehrenberg *et al.*, 2001a; Kehrenberg *et al.*, 2001b; Kehrenberg and Schwarz, 2001, 2002). En estudios con cepas de *Mh* A1, se encontraron plásmidos que codifican a una β -lactamasa, sin embargo no todos los plásmidos que se han reportado poseen genes de resistencia a antibióticos, en algunos casos se presenta la resistencia en ausencia de plásmidos, algunos de ellos se relacionan con la leukotoxina u otros factores de virulencia (Highlander, 2001; Murphy *et al.*, 1993).

3.7 Sistema de secreción tipo I

El sistema de secreción tipo I, es utilizado por las bacterias para liberar proteínas hacia el medio extracelular, en el caso de *Mh* para secretar la LktA, el sistema está formado por 3 proteínas, 2 de membrana interna, específicas para el transporte de la proteína y la tercera que forma un poro, como un túnel que une a las membranas interna y externa (Viswanathan *et al.*, 2004).

3.8 Adhesinas

La adhesión de los microorganismos a las células epiteliales de las mucosas constituye el evento inicial en la colonización bacteriana e involucra interacciones específicas entre las adhesinas bacterianas y los receptores del hospedador. La adherencia le proporciona a la bacteria diversas ventajas, como el incremento de la toxicidad y la resistencia a agentes microbicidas. Entre algunas de las estructuras bacterianas que pudieran participar en la adherencia se reconocen las fimbrias, adhesinas no fimbriales, el glicocálix, el LPS, la cápsula y proteínas de membrana externa.

Muchos integrantes de la familia *Pasteurellaceae* emplean diversas moléculas para adherirse (múltiples adhesinas) e iniciar la infección (Cuadro 1). En el caso de Mh se han descrito 2 tipos de fimbrias, una larga y rígida de 12 nm y otra corta y flexible de 5 nm, estas estructuras no han sido caracterizadas aún, y al parecer no se presentan en todos los aislamientos de Mh. Se ha propuesto que los polisacáridos capsulares, el LPS y OMPs en ausencia de las fimbrias funcionen en procesos de adhesión (Rice *et al.*, 2007, Jacques y Paradis, 1998, Jaramillo *et al.*, 2000, Highlander 2001, Mullen *et al.*, 2007)

Mosier *et al.*, (1995) informaron que el Herpesvirus-1 induce la alteración de los glicoconjugados de la mucosa nasal, y de ésta forma se incrementa la adhesión y la colonización de Mh en la superficie nasal, además, observaron que la infección *in vitro* de líneas celulares bovinas con el virus incrementó la adherencia de Mh.

El análisis del genoma de Mh reveló un amplio repertorio de posibles adhesinas similares a las caracterizadas en otros patógenos del tracto respiratorio. Dentro de los cuales se incluye una hemaglutinina filamentosa (FhaB), descrita en

Bordetella pertusis, dos adhesinas triméricas autotransportadoras y proteínas con doble función de proteasas y adhesinas que son ortólogas en *H. influenzae* y *N. meningitidis*, no obstante, se desconoce si estas proteínas son expresadas por Mh y si funcionan como adhesinas en las células del epitelio respiratorio bovino (Kisiela y Czuprynski, 2009).

Cuadro 1

Sistemas adhesina-receptor encontrados en el grupo HAP

Bacterias del grupo HAP	Adhesina	Receptor
<i>H. ducreyi</i>	LOS Fimbria	- -
<i>H. influenzae</i>	Fimbria (Hib) Fimbria (NTHi) Proteínas de adhesión HMW1/HMW2 Proteínas Hia Hap OapA OMP 46 kDa OMP P2 y P5	Sialil-lactosilceramida - - Glicoproteína, glicosaminoglicanos sulfatados - Lípidos, PE Ácido siálico
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Fimbria Proteínas encontradas en ME OMP (29/34 kDa)	- - Laminina
<i>A. pleuroneumoniae</i>	Fimbria LPS	Proteínas de 15 y 39 kDa de células traqueales porcinas
<i>M. haemolytica</i>	Fimbria LPS, OMP Adhesina 68 kDa	- - N-acetilglucosamina
<i>P. multocida</i>	Fimbria Hemaglutininas OMP Ácido hialurónico Cápsula	- - - CD44 -

ME, membrana externa; LOS, lipooligosacéridos; LPS, lipopolisacárido; OMP, proteína de membrana externa; PE, fosfatidiletanolamina. (Jacques y Paradis, 1998)

En estudios realizados en México, Jaramillo y cols., (2000) purificaron una adhesina con un peso molecular de 68 kDa que aglutina específicamente eritrocitos de conejo cuyo efecto se inhibe principalmente con GlcNAc y ácido N-acetil-neuramínico, así como con glicósidos y glicoproteínas que presentan ácido siálico como mucina, fetuina y transferrina; interactúa con células epiteliales de la tráquea mediante residuos de GlcNAc y estructuras sacáridicas que poseen dicho azúcar, como quitina y glicoproteínas sializadas. De la Mora y cols., (2006) demostraron que esta adhesina reconoce neutrófilos de bovino y ese reconocimiento induce su activación y provoca estallido respiratorio.

La colonización e infección por patógenos podrían prevenirse al bloquear la adhesión, lo que ha motivado el estudio de las adhesinas y sus receptores, su identificación, caracterización, su expresión y regulación. No obstante, la participación de la adhesina y los neutrófilos en el proceso inflamatorio en los pulmones, no está bien documentado.

El propósito de éste estudio fue identificar a los receptores de la adhesina en neutrófilos de bovino a fin de determinar las alteraciones que induce este reconocimiento, así como estudiar su participación en la inflamación aguda que caracteriza a la pasteurelosis. Además, estas observaciones podrían proporcionar las bases para estudios posteriores en los que la adhesina de 68kDa podría utilizarse como inmunógeno potencial en el desarrollo de una vacuna eficaz contra la pasteurelosis que ocasiona pérdidas tan importantes en la industria ganadera.

CAPITULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

SITIO DE INVESTIGACIÓN

Los estudios acerca de la adhesina de *M. haemolytica* se realizaron en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

OBTENCIÓN Y MANEJO DE LA CEPA BACTERIANA

Se utilizó una cepa de referencia de *Mannheimia haemolytica* A1 obsequiada por los doctores G. H. Frank y R. E. Briggs de NADC, USDA, la cual se resembró en agar sangre de ovino cada 10 días aproximadamente para mantenerla viable durante el estudio.

OBTENCIÓN DE LA ADHESINA

- a) Cultivo de Mh: se cultivó la bacteria en agitación constante a 3 diferentes temperaturas 37, 39 y 41°C en caldo infusión cerebro corazón, con el fin de determinar si existía alguna relación entre la temperatura de cultivo y la producción de la adhesina. Se centrifugó, conservando la biomasa en congelación a -20°C y el sobrenadante se mantuvo en refrigeración a 4°C por un máximo de 12 horas hasta su uso.

- b) Precipitación con sulfato de amonio: el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio a una saturación final del 75%, con el objeto de eliminar polisacáridos capsulares y recuperar las proteínas presentes. Se centrifugó a 4°C durante 30 min a 2 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y las proteínas presentes en el precipitado de resuspendieron con solución salina

isotónica (SSI, NaCl 0.9%) y se dializaron exhaustivamente contra esa misma solución.

- c) Lisado de la bacteria: se lisaron de acuerdo al protocolo descrito por Molloy (Molloy et al., 1998) para obtener las proteínas citosólicas y de membrana, la biomasa se resuspendió con 50 ml de TRIS-base 40mM (pH 9.5), se sonicó a 70 pulsaciones, con una amplitud de 9.20 Hz, en hielo hasta obtener una solución cristalina, se centrifugó, manteniendo el sobrenadante en congelación hasta su uso.

- d) Actividad Aglutinante: Se determinó la actividad aglutinante del extracto crudo antes y después de ser precipitado y dializado, y de los lisados bacterianos, empleando sangre obtenida de conejos del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se realizó en placas de fondo U por diluciones dobles seriadas y con eritrocitos de conejo al 1% en SSI ajustada pH 7.4, el título hemaglutinante se considera como la inversa de la última dilución que presenta actividad aglutinante, la actividad específica de los diferentes extractos se determinó al dividir el título hemaglutinante por ml entre el contenido proteico en mg, de acuerdo a lo reportado por Jaramillo y cols (1998).

- e) Determinación de la concentración de proteínas utilizando un kit de Pierce con BCA (ácido bicincolínico) y como estándar concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina. La prueba se realizó en placas de fondo plano agregando 25 µl de cada muestra y 200 µl de la solución de trabajo, se incubó a 37°C durante 30 minutos y se realizó la lectura a 562 nm en un espectrofotómetro Spectrum UV.Vis.

PURIFICACIÓN DE LA ADHESINA POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Para separar los elementos proteicos y purificar la adhesina se montaron 3 columnas de afinidad de acuerdo a lo reportado por Jaramillo *et al.*, 2000: de estroma de eritrocitos de conejo entrampados en sefarosa, de fetuina y mucina submaxilar bovina, acopladas a Sepharose CL-4bB; para eliminar el conservador de la Sepharosa se lavaron 5ml, con agua milliQ, se mezcló con 10 ml de carbonato de potasio (K_2CO_3) y 5 ml de bromuro de cianógeno disuelto en acetonitrilo (1g/ml) en agitación constante por 20 min a 4°C, posteriormente se lavó la Sepharose activada con 3 l de agua milliQ fría, y un lavado final con cloruro de sodio 0.5 M, bicarbonato de sodio 0.5 M pH 9, se añadió la fetuina o mucina (5mg/ml) en solución, manteniendo la mezcla en agitación constante por 48 hrs a 4°C. (Vazquez et al., 1993). Las columnas se equilibraron con SSI, se aplicó cada muestra (el lisado bacteriano y el precipitado) por separado, a una velocidad de 10 ml/hr y se colectaron fracciones de 1 ml. En cada caso la “fracción no retenida” (FNR) se eluyó con SSI hasta que presentó una lectura cercana a 0, a una longitud de onda de 280nm, la “fracción retenida” (FR) se eluyó con una solución 200 mM de GlcNac en SSI. Cada una de las fracciones retenidas se dializó contra SSI y se midió su actividad aglutinante.

Análisis electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para separar las proteínas presentes en los extractos, en los lisados y en las fracciones retenidas se realizó un SDS-PAGE al 10% (Laemmli, 1970), se empleó un gel concentrador al 5% y un gel separador al 10% de acrilamida, 20 µg de cada muestra se diluyeron en una proporción 1:2 en amortiguador (TRIS-HCl 75 mM, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.001%, pH 8.8) y se sometieron a ebullición durante 10 min, se emplearon estándares de peso molecular conocido (BioRad), la migración electroforética se realizó aplicando un voltaje constante de

80 en amortiguador de corrida (TRIS 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1%, pH 8.3), los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0.2% y se destiñeron con ácido acético/metanol o se tiñeron con nitrato de plata.

COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE LA ADHESINA

Para determinar la concentración y composición de aminoácidos de la adhesina de Mh, se realizó por cromatografía de gases con derivados alditos trifluoroacetilados: se hidrolizaron 50 mg de la adhesina en 1 ml de metanol/HCl 0.5 N durante 24 h a 100°C, posteriormente a los derivados trifluoro-acetil-aditales se les añadió 100 ml de piridina y 100 ml de ácido trifluoroacético. La composición de los aminoácidos se determinó por el método de Zanetta *et al.*, (1999), en un cromatógrafo de gas Varian 2100 (Orsay, Francia), agregando los derivados trifluoro-acetil-aditales a una columna capilar (25x0.32 mm), conteniendo silicón OV-210 al 5% (Applied Science Lab., Buffalo NY); el programa de temperatura se estableció de 100 a 240°C, con un incremento de 2°C por minuto. Como estándar interno se utilizó lisina (Sigma Chem., St. Louis, MO).

OBTENCIÓN DE NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES DE BOVINO DE SANGRE PERIFÉRICA

Los neutrófilos se obtuvieron de sangre venosa periférica por punción de la vena yugular de animales clínicamente sanos utilizando EDTA como anticoagulante. La sangre se centrifugó a 900 x g durante 15 min a 4°C, se recuperó el 60% de la fracción roja inferior, y se le agregó 2 veces el volumen de buffer de lisis (NH₄Cl, NaHCO₃, EDTA₂Na), se agitó ligeramente hasta observar la lisis de eritrocitos, se añadió el mismo volumen de PBS, se homogenizó y se centrifugó por 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante; el procedimiento anterior

se repitió hasta que el botón ya no estuvo contaminado con eritrocitos. El botón se resuspendió en 3 ml de PBS, se cuantificaron las células en un hemocitómetro.

OBTENCION DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE NEUTRÓFILOS DE BOVINO

Los neutrófilos 1×10^8 se incubaron en una solución de lisis (100 μ l/ml de inhibidores de proteasas, PMSF 4 mM y tritón X-100 al 1%. por cada 100 millones de células) durante 30 min a 4°C en agitación constante. La suspensión resultante se centrifugó a 12 000 rpm durante 30 min para eliminar los residuos celulares, se recuperó el sobrenadante y se conservó a -20°C hasta su uso.

PURIFICACIÓN DEL RECEPTOR PARA LA ADHESINA DE Mh

El receptor se purificó en una columna de adhesina acoplada a Sepharose 4B-CL (Pharmacia Chemicals Uppsala, Sweden), la columna se preparó de acuerdo al método descrito previamente. Una vez que se acopló la adhesina a la Sepharosa se colocó en una columna con un volumen de 10 ml y se equilibró con PBS pH 7.4. Se agregó el lisado celular de los neutrófilos de bovino, la fracción no retenida se eliminó con PBS hasta que se obtuvo una densidad óptica cercana a cero a 280nm, la fracción retenida se eluyó con 5ml de GlcNac 200 mM en PBS. Las fracciones con densidad óptica positiva a 280 nm se recolectaron, se dializaron contra PBS y se concentraron por centrifugación con un centrífugo (Amicon).

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se determinó la concentración de proteínas de acuerdo al método de Bradford (1976) modificado para microvolúmenes en placa de ELISA, se utilizó como estándar albúmina sérica bovina (BSA). La prueba se realizó por triplicado,

se utilizaron 10 μ l de muestra y 200 μ l del reactivo de Bradford (ácido ortofosfórico 8.5%, azul de Coomassie G-250 1%, etanol absoluto 5%), la lectura se realizó en un lector de ELISA (Dynatech MR5000) a 570 nm.

ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES

Para separar las proteínas presentes en las fracciones puras por isoelectroenfoque y posteriormente por su masa molecular, se prepararon las muestras (100 μ g de proteína) de las fracciones puras del receptor de la adhesina, con solución de rehidratación (urea 8M, CHAPS 0.5%, DTT 0.2%, IPG Buffer pH 3-10, 0.5%, azul de bromofenol 0.002%) hasta obtener un volumen total de 130 μ l. Se vertieron las muestras en los carriles de la bandeja de rehidratación (Amersham, Biosciences) y se colocaron tiras de poliacrilamida de 7 cm de longitud y un rango de pH 3 a 10, (GE Healthcare, Bio-sciences), cada carril se recubrió con aceite mineral e incubado a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se colocaron las tiras en la cámara (Multiphor II Amersham, Biosciences) y se corrió la primera dimensión en tres fases: la primera a 200 V, por 1 min, a 0.001 kilovolts por hora (kVh); en seguida a 3500 V, por 90 min, a 2.8 kVh, y finalmente a 3500 V, durante 35 min a 2.2 kVh. Para la segunda dimensión, se utilizaron 10 ml SDS-buffer (Tris HCl 50 mM pH 8.8, Urea 6 M, Glicerol 30%, SDS 2%, y azul de bromofenol 0.002%, agua destilada cbp 200 ml) y se le añadieron 100 mg de DTT, la tira se incubó con la solución en agitación constante durante 15 min a temperatura ambiente, se desechó la solución anterior y se incubó nuevamente con 10 ml de SDS-buffer con 250 mg de iodoacetamida durante 15 min, en agitación constante. El gel separador se preparó de acrilamida al 12.5%, se colocó en una cámara de electroforesis vertical, en la parte superior se situó la tira con el marcador de peso molecular embebido en un gel de agarosa al 0.5%, la electroforesis se corrió a 80 V por 4 horas. Los geles se tiñeron con

azul de Coomasie. En el gel testigo, los neutrófilos no se activaron con adhesina, únicamente se incubaron con PBS durante 30 minutos.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Para separar los antígenos protéicos y ser identificadas con anticuerpos de suero de bovinos enfermos de neumonía, se realizó una inmunoelectrotransferencia de acuerdo a Towbin *et al* (1979). Después de la electroforesis, se incubó el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa y papeles filtro gruesos en amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8.3) durante 1 hora. Se colocaron los papeles filtro, en medio de éstos la membrana de nitrocelulosa bajo el gel de poliacrilamida, se transfirió en un aparato Trans-Blot SD semi Dry Transfer cell (Biorad) a 25 V, 100 mA, durante 1 hora, posteriormente la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para localizar y separar los pesos moleculares, se destiñó con agua destilada y se bloquearon los sitios reactivos libres con la solución bloqueadora (PBS, leche descremada 5%, albúmina sérica bovina 1%, tween 20 al 0.01%) durante una hora. La membrana se lavó 5x con PBS tween 0.01% durante 5 min cada lavado, se incubó con adhesina (1 mg/ml) en PBS+CaCl₂ 1mM durante 1 hora, se lavó nuevamente con PBS Tween, en seguida se incubó con suero de bovino enfermo de neumonía, se volvió a lavar y finalmente se incubó con anticuerpos contra gammaglobulinas de bovino unidos a peroxidasa. Para revelar se empleó el kit Opti-4CN (Biorad) siguiendo las indicaciones del fabricante, en seguida se procedió a la detección colorimétrica incubando la membrana en una solución Opti-4CN diluyente, Opti-4CN sustrato. En los testigos, después de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon y se incubaron con PBS sin adhesina, posteriormente el proceso fue el mismo.

SECUENCIACIÓN DEL RECEPTOR DE LA ADHESINA

Para identificar al receptor de la adhesina y posteriormente analizar los fragmentos peptídicos y obtener la secuencia de aminoácidos del receptor, se realizó espectrometría de masas mediante la ionización deserción asistida con láser (MALDI-TOF) de péptidos, obtenidos por digestión triptica. Posterior a la electroforesis de 2D, los puntos que contenían las fracciones de proteína, así como las bandas proteicas que se revelaron en la inmunoelectrotransferencia fueron retirados del gel y digeridos con 0.05 mg de tripsina en 500 µl de bicarbonato de amonio pH 8, a 37°C por 24 horas, se inhibió la digestión a 2°C durante 2 horas. La fracción se secó con el equipo Gyrovap (Howe, Londres). Posteriormente la fracción se mezcló con 1 µl de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (12 mg/ml de CHO, 70:30) y se dejó cristalizar a temperatura ambiente. Se analizaron los iones positivos de los péptidos en un espectrofotómetro de masas Vision 2000 (Finnigan MAT Bremen, Germany) a 337 nm con luz UV. Las masas de cada péptido fueron comparadas en la base de datos del NCBI BLAST (2009).

INMUNOHISTOQUÍMICA

Para visualizar el lugar donde se produce la unión de la adhesina a los neutrófilos se realizó una inmunohistoquímica. Se colocaron 1×10^6 células de neutrófilos en medio DMEM sin complementos en portaobjetos tratados previamente con silano (se sumergieron en una solución de silano al 4% en acetona durante 5 min y se lavaron 2 veces en agua destilada por 5 min), se incubaron a 37°C durante 30 min, se les agregó adhesina a distintas concentraciones (0.5, 1 y 1.5 µg) con incubación a diferentes tiempos (0, 30 y 60 min), se lavaron las laminillas con PBS y se fijaron las células con paraformaldehído al 1%. Se agregaron 200 µl de solución de albúmina al 2% e incubaron a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS y sumergieron en Tritón

X-100 al 2%, se lavaron nuevamente en PBS y e incubaron toda la noche con la adhesina biotinilada en cámara húmeda a 4°C, se lavaron con PBS +CaCl₂ 1mM por 5 min. Se incubó con extravidin-FITC (1:80) durante 1 hora, se lavó nuevamente con PBS+CaCl₂ 1mM durante 5 min, se montaron los portaobjetos con Vecta Shield-DAPI en la oscuridad y se selló con barniz alrededor del portaobjetos. Se observó en un microscopio de fluorescencia.

CAPITULO IV

RESULTADOS

PURIFICACION DE LA ADHESINA

Al precipitado y al lisado celular se les determinó la actividad aglutinante y la concentración de proteínas. Además dichas proteínas se analizaron por SDS-PAGE, se observaron proteínas de diversos pesos moleculares, entre 20 y 100 kDa (fig 1). En el cuadro 2 se observa mayor actividad aglutinante en las temperaturas de 39 y 41°C de el precipitado, mientras que en el lisado se presenta más aglutinación a los 37°C, así mismo en caso de la actividad específica, se muestra un valor más alto en el precipitado a 39°, seguido por el de 41°C, en caso de los lisados sólo hay actividad específica a los 37°C.

Cuadro 2
ACTIVIDAD AGLUTINANTE, CONCENTRACIÓN DE
PROTEÍNAS Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA DEL PRECIPITADO Y
LISADO, OBTENIDOS DE CULTIVOS DE *M. haemolytica* A
DIFERENTES TEMPERATURAS

MUESTRA		UHA	[] PROT	A. ESP
PRECIP	37°	0	1.6	0
	39°	32	2.4	13.3
	41°	64	8.8	7.2
LISADO I	37°	8	1.6	5
	39°	0	0.9	0
	41°	0	1.6	0

PRECIP: precipitado al 75% con sulfato de amonio; UHA: Unidades hemoaglutinantes, [] PROT: concentración de proteínas mg/ml. A ESP: Actividad específica

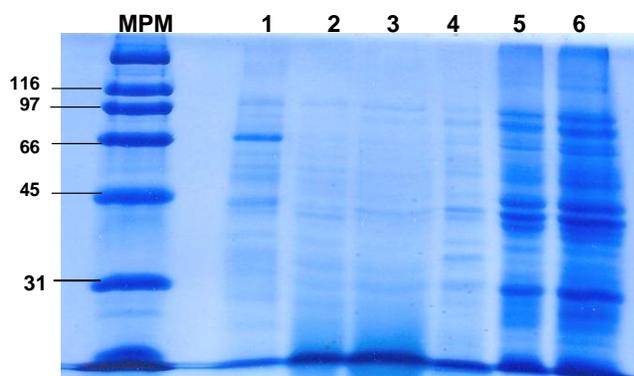


Fig 1. SDS-PAGE. MPM Marcador de peso molecular; carriles 1 a 3 sobrenadantes de cultivo de *Mannheimia haemolytica* cultivada a 37, 39 y 41°C; carriles 4 a 6 lisados de Mh cultivada a 37, 39 y 41°C

A las fracciones puras obtenidas se les determinó la concentración de proteínas, su actividad aglutinante y con estos valores se calculó su actividad específica (cuadros 3 a 5). Así mismo, dichas fracciones se analizaron por SDS-PAGE, se ilustra en la figura 2, donde se observan proteínas de 68 y 45 kDa aproximadamente provenientes de fracciones puras.

En la columna de fetuina se puede observar que se obtuvo una mayor actividad específica de la fracción pura en la temperatura de 39°C, tanto de la muestra de células lisadas (64) como del precipitado (29), sin embargo del cultivo a 37°C, el precipitado no presentó actividad aglutinante.

En cuanto a la columna de mucina, la actividad específica en el caso de la fracción pura obtenida del precipitado aumenta con la temperatura (de 0 a 6.4), teniendo una mayor actividad a los 41°C . Mientras que en la fracción pura obtenida del lisado celular de Mh, la mayor actividad se presentó a los 39°C (cuadro 4).

En la columna de estroma de conejo, la mayor actividad específica se observó en la fracción purificada a partir del lisado celular cultivado a 37°C (32), la cual decrece con el aumento de temperatura (cuadro 5). Se pudo observar una

mayor actividad específica en las columnas de mucina y fetuina de la fracción pura obtenida del lisado celular cultivado a 39°C, mientras que la mayor actividad se obtuvo de la columna de mucina del precipitado del cultivo a 41°C (34.7).

Cuadro 3
ACTIVIDAD AGLUTINANTE, CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS FRACCIONES PURAS OBTENIDAS POR CROMATOGRFÍA EN UNA COLUMNA DE FETUINA

	TEMPERATURA DE CULTIVO (°C)					
	37		39		41	
	LISADO	PRECIP	LISADO	PRECIP	LISADO	PRECIP
UHA	16	0	64	64	32	16
[] PROT	4,5 mg/ml	0.125	1	2.2	5	6
ACTIVIDAD ESPECÍFICA	3.5	0	64	29	6.4	2.6

UHA: Unidades hemoaglutinantes; [] PROT: concentración de proteínas mg/ml, PRECIP: precipitado con sulfato de amonio al 75%

Cuadro 4
ACTIVIDAD AGLUTINANTE, CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS FRACCIONES PURAS OBTENIDAS POR CROMATOGRFÍA EN UNA COLUMNA DE MUCINA

T°	TEMPERATURA DE CULTIVO DE Mh					
	37		39		41	
	LISADO	PRECIP	LISADO	PRECIP	LISADO	PRECIP
MUESTRA						
UHA	16	0	128	8	32	8
[] PROT	0.4	0.1	2	17.5	5	0.23
ACTIVIDAD ESPECÍFICA	40	0	64	0.45	6.4	34.7

UHA: Unidades hemoaglutinantes; [] PROT: concentración de proteínas mg/ml, PRECIP: precipitado con sulfato de amonio al 75%

Cuadro 5
ACTIVIDAD AGLUTINANTE, CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS FRACCIONES PURAS OBTENIDAS POR CROMATOGRFÍA EN UNA COLUMNA DE ESTROMA DE CONEJO

	TEMPERATURA DE CULTIVO DE Mh FR Col Estroma					
	37		39		41	
	LISADO	PRECIP	LISADO	PRECIP	LISADO	PRECIP
UHA	8	0	32	4	8	4
[] PROT	0.25	13	1.8	15	2.3	17
ACTIVIDAD ESPECÍFICA	32	0	17.7	0.26	3.4	0.23

UHA: Unidades hemoaglutinantes; [] PROT: concentración de proteínas mg/ml, PRECIP: precipitado con sulfato de amonio al 75%

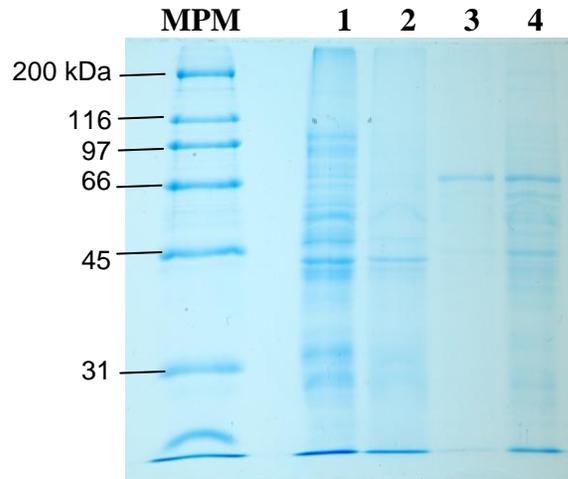


Fig 2 SDS-PAGE. MPM marcador de peso molecular; carril 1 lisado de Mh cultivada a 37°C; carril 2 FNR; carril 3 FR; carril 4 FR del lisado de Mh a 41°C;

Para determinar la composición de aminoácidos, se unieron las fracciones purificadas de las diferentes columnas y temperaturas de cultivo. Los aminoácidos encontrados y sus porcentajes se observan en el cuadro 6, donde se comparan la adhesina (1) obtenida por Jaramillo *et al.*, (2000) y la obtenida en el presente estudio (2). Cabe destacar que el aminoácido en mayor proporción es la glicina (22.8%), seguido por la serina (22.2%) y carece de histidina, arginina, prolina, tirosina, cisteína, leucina y fenilalanina, aminoácidos presentes en la adhesina que menciona Jaramillo *et al.*, (2000).

Cuadro 6

COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE LAS ADHESINAS DE *M. haemolytica*

ADHESINA			
Adhesina "1" 68kDa		Adhesina "2" 68 kDa	
Aminoácido	%	Aminoácido	%
ASP	8	ASP	7.1
GLU	14	GLU	9.3
SER	16	SER	22.2
GLI	17	GLI	22.8
HIS	3	HIS	0
ARG	2	ARG	0
ALA	11	ALA	8.5
PRO	4	PRO	0
TIR	1	TIR	0
VAL	4	VAL	3.5
MET	1	MET	7.7
CIS	1	CIS	0
ILE	3	ILE	16.2
LEU	5	LEU	0
FEN	3	FEN	0
LIS	4	LIS	2.4

Adhesina "1" reportada por Jaramillo *et al.*, 2000, adhesina "2" obtenida en el presente trabajo.

PURIFICACIÓN DEL RECEPTOR DE LA ADHESINA

La purificación del receptor de la adhesina se ilustra en la figura 3, se empleó una columna de afinidad de Mh, la primera fracción colectada se denomina “no retenida” y son aquellas moléculas que no son reconocidas por la adhesina de Mh, posteriormente, cuando la lectura en el espectrofotómetro a 280 nm de absorbancia llegó a cero, se eluyó la columna con el azúcar GlcNac a 200 mM y se obtuvo la FR, a la cual se le determinó la concentración de proteínas y se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en una y dos dimensiones (figuras 4 y 5). En la figura 5 se observan dos proteínas 26 kDa aproximadamente y con un punto isoeléctrico de 7 y 8. En la figura 6 se ilustran 2 proteínas de 150 y 60 kDa aproximadamente, a las cuales se les identificaron los péptidos mediante MALDI-TOF.

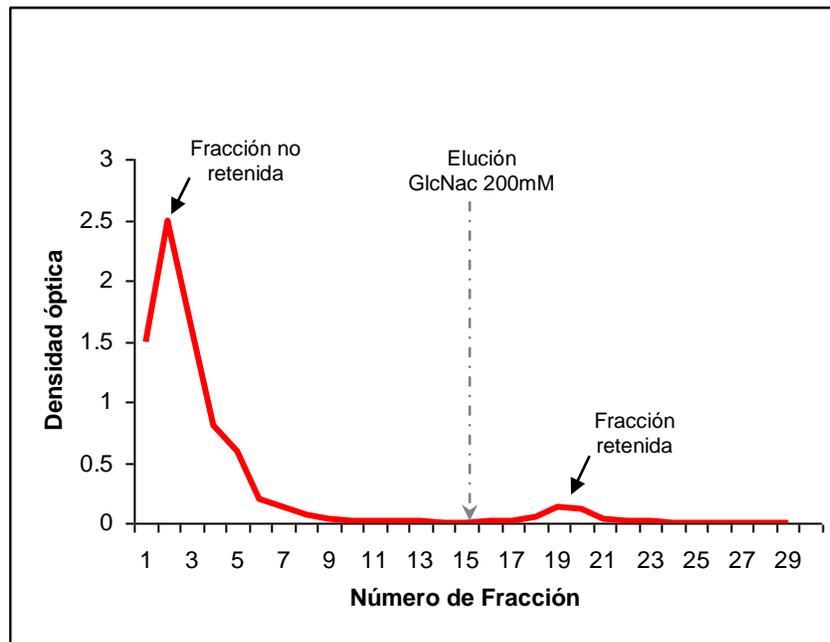


Fig 3. Purificación del receptor en neutrófilos de bovino, de la adhesina de *Mannheimia haemolytica* mediante cromatografía de afinidad. **GlcNac:** N-acetil D-glucosamina.

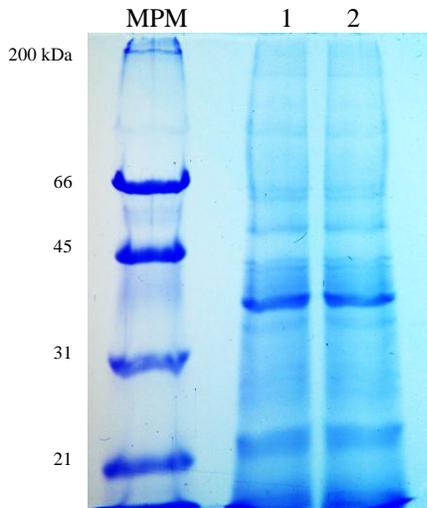


Fig. 4 SDS-PAGE; MPM (marcador de pesos moleculares); carriles 1 y 2 Fracción retenida del lisado de neutrófilos de bovino

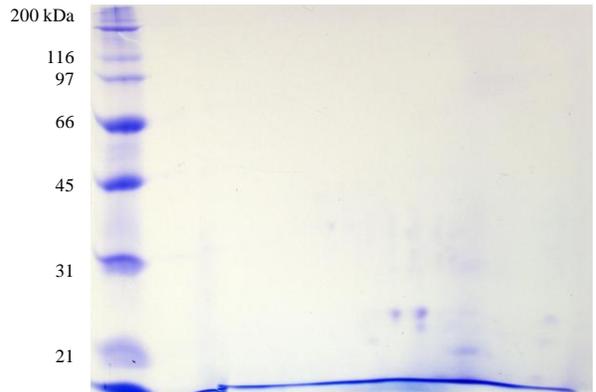


Fig. 5 Electroforesis del receptor de la Adh, en 2D en gel de poliacrilamida, con tiras IPG pH 3 a 10 y de 7 cm de longitud.

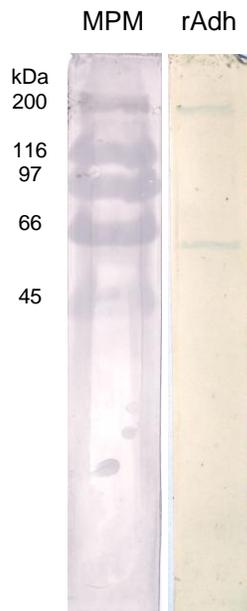


Fig 6. Inmunoelctrotransferencia MPM Marcador de peso molecular; Proteínas de neutrófilos que reconocen a la adhesina de *Mannheimia haemolytica*.

INMUNOHISTOQUÍMICA

En la figura 7 se pueden observar las fotos tomadas de los neutrófilos de bovino incubados con diferentes concentraciones de la adhesina y a diferentes tiempos, las filas I, II y III indican las concentraciones de adhesina empleadas 0.5, 1 y 1.5 μg respectivamente, mientras que las columnas a, b y c, los diferentes tiempos de incubación de 0, 30 y 60 minutos. Se observa reconocimiento de la adhesina biotinilada, que al incubarse con extravidin-FITC da la coloración verde en los neutrófilos en los diferentes tiempos y a las diferentes concentraciones, tanto en su superficie como en el interior de los mismos. Los núcleos se tiñeron con Vecta Shield-DAPI, dando la coloración azul. Se empleó como control positivo a la proteína del germen de trigo (WGA) que reconoce, igual que la adhesina, al GlcNac. En las fotos de la figura 8 se puede observar que hay reconocimiento en los diversos tiempos de incubación y a las diferentes concentraciones de la proteína.

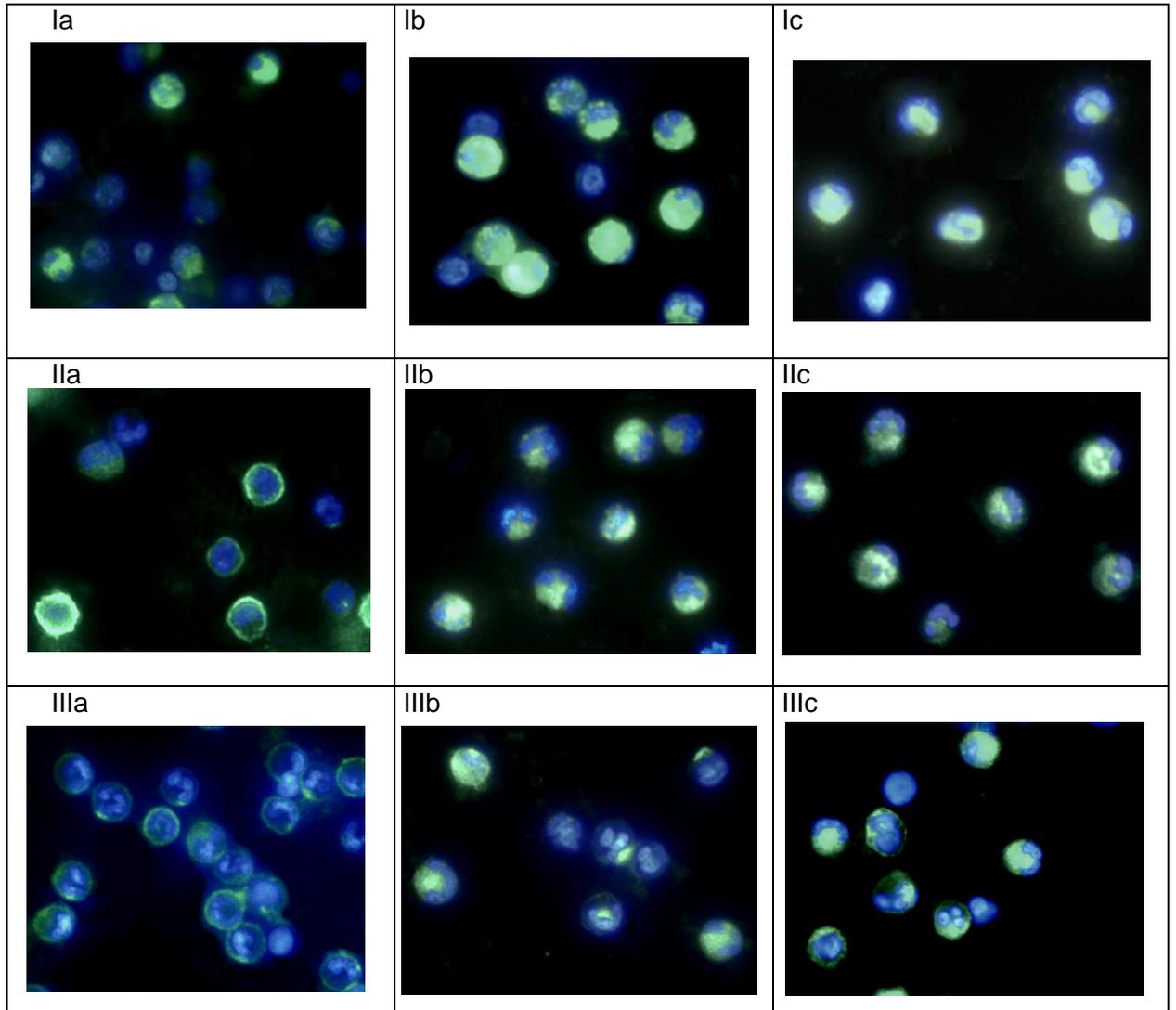


Fig 7 Inmunohistoquímica con neutrófilos de bovino activados con adhesina de *Mannheimia haemolytica* en concentraciones de 0.5 µg (I), 1 µg (II) y 1.5 µg (III) y a diferentes tiempos, 0 min (a), 30 min (b) y 60 min (c)

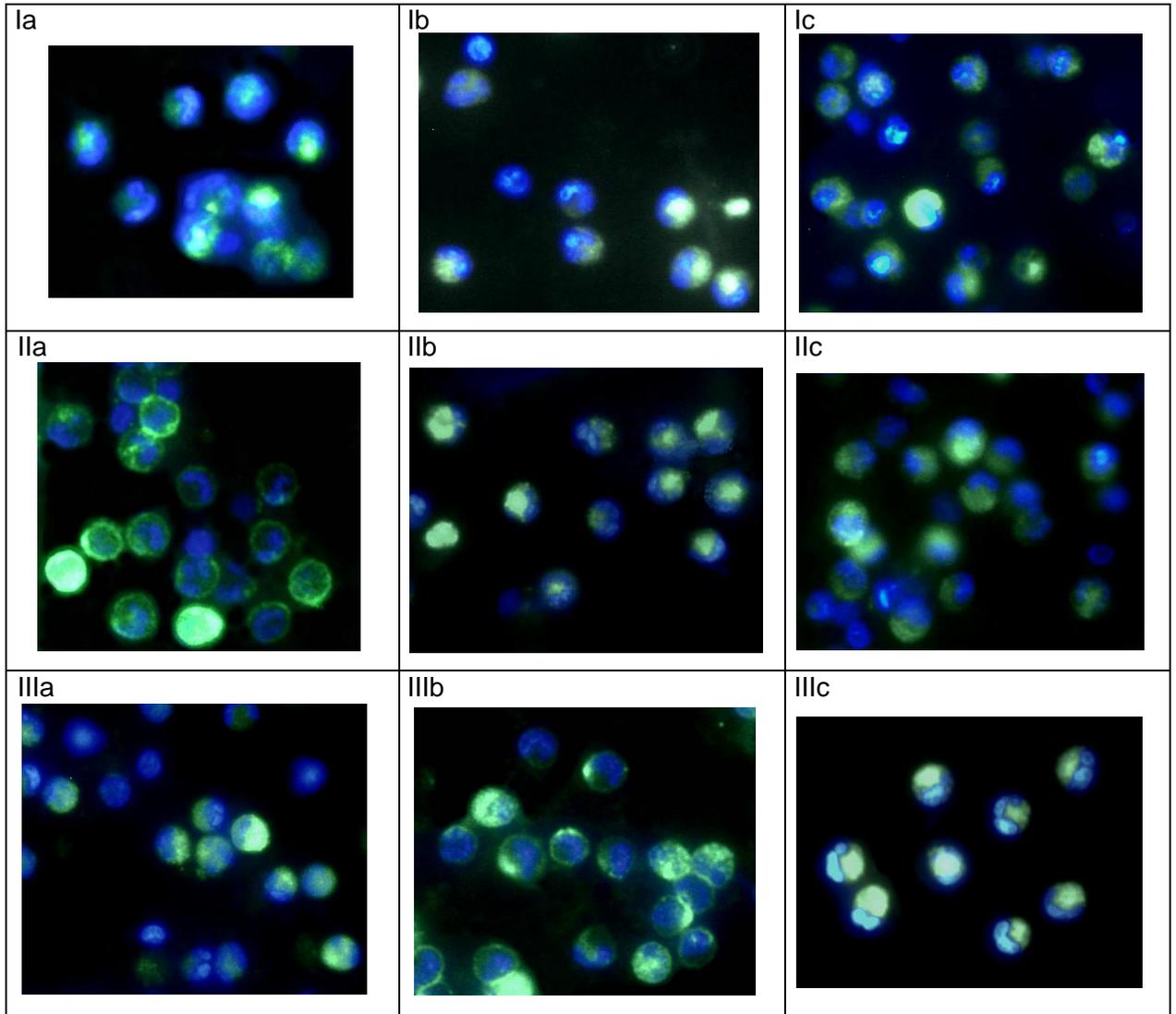


Fig 8. Inmunohistoquímica con neutrófilos de bovino activados con WGA a concentraciones de 0.5 µg (I), 1 µg (II) y 1.5 µg (III) y a diferentes tiempos, 0 min (a), 30 min (b) y 60 min (c)

ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES

Se activaron neutrófilos de bovino con diversas concentraciones de adhesina durante 30 minutos, posteriormente se lisaron y las proteínas obtenidas se analizaron mediante electroforesis en dos dimensiones (fig. 9). Las proteínas presentes en los geles de los neutrófilos incubados se observan semejantes, en cuanto a pesos moleculares y puntos isoeléctricos, sin embargo en el gel testigo no se observan un grupo de proteínas con pesos moleculares de 25 a 30 kDa y punto isoeléctrico de 6 a 8.

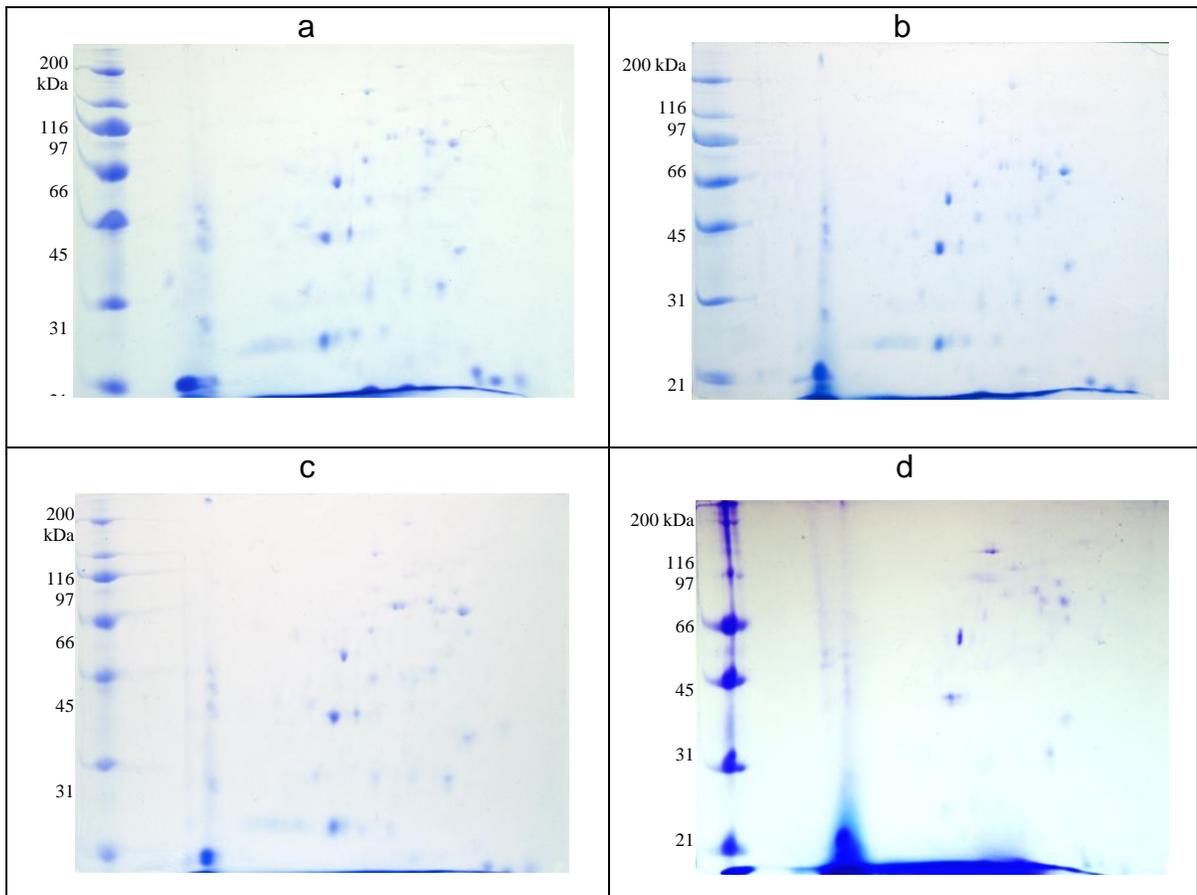


Fig 9. Electroforesis en dos dimensiones de neutrófilos de bovino activados con diferentes concentraciones de adhesina de *Mannheimia haemolytica*: a (0.5 μ g), b (1 μ g), c (1.5 μ g) y d (testigo). Los neutrófilos se lisaron posteriormente. Geles teñidos con azul de Coomassie

IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DEL RECEPTOR MEDIANTE MALDI-TOF

Por medio del reconocimiento la inmunoelectrotransferencia, se identificaron 3 proteínas que reconoció el suero de bovino, a partir de ellas se obtuvo la secuencia de las mismas. La primera obtenida en un gel de dos dimensiones (fig. 5), con un peso molecular aproximado 26 kDa y con un punto isoeléctrico de 7 la cual presentó homología con la haptoglobina de bovino, cuyo peso es de 45 kDa con puntoisoeléctrico de 7.83

La secuencia siguiente corresponde a la haptoglobina, los péptidos en rojo pertenecen al análisis por MALDI-TOF de la muestra.

1	MSALQAVVTL	LLCGQLLAVE	TGSEATADSC	PK APEIANSH	VEYSVR YQCD
51	KYYK LHAGNG	VYTFNNK QWI	NK DIGQQLPE	CEEDDSCPEP	PKIENGYVEY
101	LVR YQ CKPYY	TLR TCGDGVY	TFNSKKQWIN	KNIGQK LPEC	EAVCGKPKHP
151	VDQVQRIIGG	SLDAKGSFPW	QAKMVSQHNL	ISGATLINER	WLLTTAKNLY
201	LGHSSDKKAK	DITPTLRLYV	GKNQLVEVEK	VVLHPDHSKV	DIGLIKLRQK
251	VPVNDKVMP	CLPSKDYVKV	GRVGYVSGWG	RNENFNFTTEH	LKYVMLPVAD
301	QDKCVKHYEG	VDAPKNKTAK	SPVGVQPILN	ENTFCVGLSK	YQDDTCYGDA
351	GSAFVVHDKE	DDTWYAAGIL	SFDKSCAVAE	YGVYVKVTSI	LDWVRKTIAN
401	N				

Se obtuvo la secuencia de otra proteína con peso molecular de 150 kDa (fig 6), que presenta homología con la talina 1 de bovino, con peso molecular de 269 kDa y punto isoeléctrico de 5.81, los péptidos en rojo corresponden a los analizados por MALDI-TOF.

1	MVALSLKISI	GNVVKTMQFE	PSTMVYDACR	IIRERPEAL	SGPPSDFGLF
51	LSDDDPKKG	WLEAGKALDY	YMLRNGDTME	YRKKQRPLKI	RMLDGTVKTV
101	MVDDSKVTVD	MLMTICARIG	ITNHDEYSLV	REIMEEKKEE	VTGTLRKDKT
151	LLRDEKKMEK	LKQKLHTDDE	LNWLDHGRTL	REQGVEEHET	LLRRKFFYS

201	DQNVDSRDPV	QLNLLYVQAR	DDILNGSHPV	SFDKACEFAG	FQCQIQFGPH
251	NEQKHKAGFL	DLKDFLPKEY	VKQKGERKIF	QAHKNCGQMS	EIEAKVRYVK
301	LARSLKTYGV	SFFLVKEKMK	GKNKLVPRLL	GITKECVMRV	DEKTKEVIQE
351	WNLTNIKRWA	ASPKSFTLDF	GDYQDGYYSV	QTTEGEQIAQ	LIAGYIDIIL
401	KKKKSVDHFG	LEGDEESTML	EDSVSPKKST	VLQQQYNRVG	KVEHGSVALP
451	AIMRSGASGP	ENFQVGSMP	AQQQITSGQM	HRGHMPPLTS	AQQALTGTIN
501	SSMQAVQAAQ	ATLDDFDLTP	PLGQDAASKA	WRKNKMDISK	HEIHSQVDAI
551	TAGTASVVNL	TAGDPAETDY	TAVGCAVTTI	SSNLTEMSRG	VK LLAALLED
601	EGSGRPLLQ	AAKGLAGAVS	ELLR SAQPAS	AEPRQNLLQA	AGNVGQASGE
651	LLQQIGESDT	DPHFQDVLQ	LAK AVASAAA	ALVLK AKSVA	QRTEDSGLQT
701	QVIAAATQCA	LSTSQLVACT	KVVAPTISP	VCQEQLVEAG	RLVAKAVEGC
751	VSASQAATED	AQLLR GVGAA	ATAVTQALNE	LLQHVR AHAT	GAGPAGRYDQ
801	ATDTILTVTE	NIFSSMGDAG	EMVRQAR ILA	QATSDLVNAI	KADAEESDL
851	ENSR KLLSAA	KILADATAKM	VEAAKGAAAN	PDSEEQQQRL	REAAEGLRMA
901	TNAAAQNAIK	KKLVQRLEHA	AK QAAASATQ	TIAAAQHATS	TPKASAGPQP
951	LLVQSC AVA	EQIPLLQGV	RGSQAQPDS	SAQLALIAAS	QSFLQPGGKM
1001	VAAAKASVPT	IQDQASAMQL	SQCAK NLGT A	LAELR TAAQK	AQEACGPLEM
1051	DSALSVVQNL	ERDLQEVKAA	ARDGKLGKPLP	GETMEKCAQD	LGNSTK AVSS
1101	AIAQLLGEVA	QGNENYAGIA	ARDVAGGLRS	LAQAAR GVAA	LTSDPAVQAI
1151	VLDTASDVLD	KASSLIEEAK	KAAGHPGDPE	SQQLRAQVAK	AVTQALNRCV
1201	SCLPGQRDQD	NALRAVG DAS	KRLSDSLPP	STGTFQEAQS	RLNEAAAGLN
1251	QAATELVQAS	RGTPQDLARA	SGRFGQDFST	FLEAGVEMAG	QAPSQEDRAQ
1301	VVSNLKGISM	SSSKLLLA AK	ALSTDPAPT	LKSQLAAAAR	AVTDSINQLI
1351	SMCTQQAPGQ	KECDNALREL	ETVRELLENP	VQPINDMSYF	GCLDSVMENS
1401	KVLGEAMTGI	SQNAKNGNLP	EFGEAVATAS	KALCGFTEAA	AQAAYLVGVS
1451	DPNSQAGQQG	LVEPTQFARA	NQAIQMACQS	LGEPGCTQAQ	VLSAATIVAK
1501	HTSALCNSCR	LASARTANPT	AKRQFVQSAK	EVANSTANLV	KTIKALDGAF
1551	TEENRAQCRA	ATAPLLEAVD	NLSAFASNPE	FSSVPAQISP	EGRAAMEPIV
1601	ISAKTMLESA	GGLIQTARAL	AVNPRDPPRW	SVLAGHSRTV	SDSIKKLITS
1651	MRDKAPGQLE	CETAIAALNS	CLR DLQASL	AAVSQQLAPR	EGISQEALHT
1701	QMLTAVQEIS	HLIEPLASAA	RAEASQLGHK	VSQMAQYFEP	LTLAAVGAAS
1751	KTL SHPQQMA	LLDQTK LAE	SALQLLYTAK	EAGGNPKQAA	HTQEALEEAV
1801	QMMTEAVEDL	TTTLNEAASA	AGVVGGMVDS	ITQAINQLDE	GPMGEPEGSF
1851	VDYQTTMVRT	AK AIAVTVQE	MVTK SNTSPE	ELGPLANQLT	SDYGRLASQA
1901	KPAAVAAENE	EIGAHIKHRV	QELGHGCAAL	VTKAGALQCS	PSDAYTKKEL

1951	IECARRVSEK	VSHVLAALQA	GNRGTQACIT	AASAVSGIIA	DLDTTIMFAT
2001	AGTLNREGAE	TFADHREGIL	KTAKVLVEDT	KVLVQNAAGS	QEK LAQAAQS
2051	SVATITRLAD	VVKLGAASLG	AEDPETQVVL	INAVKDVAKA	LGDLISATKA
2101	AAGK VGDDPA	VWQLKNSAKV	MVTNVTSLLK	TVKAVEDEAT	KGTRALEATT
2151	EHIRQELAVF	CSPEPPAK TS	TPEDFIRMTK	GITMATAKAV	AAGNSCR QED
2201	VIATANLSRR	AIADMLRACK	EAAYHPEVAP	DVRLRALHFG	RECANGYLEL
2251	LDHVLLTLQK	PSPELKQQLT	VHSKR VAGSV	TELIQAAEAM	KGTEWVDPED
2301	PTVIAENELL	GAAAAIEAAA	KKLEQLKPR A	KPKEADESLN	FEEQILEAAK
2351	SIAAATSALV	KAASAAQREL	VAQGKVGAI P	ANALDDGQWS	QGLISAARMV
2401	AAATNNLCEA	ANAAVQGHAS	QEKLISAKQ	VAASTAQLLV	ACKVKADQDS
2451	EAMKRLQAAG	NAVKRASDNL	VKAAQKAAAF	EEQENETVVV	KEKMVGZIAQ
2501	IIAAQEEMLR	KERELEEARK	KLAQIRQQQY	KFLPSELRDE	H

La tercera proteína con peso molecular aproximado de 60 kDa (fig 6), se analizó y presenta homología con la cadena beta del fibrinógeno de bovino, con peso molecular de 53 kDa y punto isoeléctrico de 8.45. Los péptidos en rojo corresponden a los identificados por MALDI-TOF.

1	QFPTDYDEGQ	DDRPKVGLGA	RGHRPYDKK K	EEAPSLRPVP	PPISGGGYRA
51	RPATATVGQK	KVERKPPDAD	GCLHADPDLG	VLCPTGCK LQ	DTLVRQERPI
101	RKSIEDLRNT	VDSVSRTSSS	TFQYITLLKN	MWKGR QNQVQ	DNENVVNEYS
151	SHLEKHQLYI	DETVKNNIPT	KLRVLSILE	NLRSKIQKLE	SDVSTQMEYC
201	RTPCTVTCNI	PVVSQKECEK	IIRNEGETSE	MYLIQPEDSS	KPYRVYCDMK
251	TEKGGWTVIQ	NRQDGSVDFG	RKWD PYKQGF	GNIATNAEGK	KYCGVPGEYW
301	LGNDR ISQLT	NMGPTKLLIE	MEDWKGDKVT	ALYEGFTVQN	EANKYQLSVS
351	KYKGTAGNAL	IEGASQLVGE	NRTMTIHNSM	FFSTYDRDND	GWKTTDPRKQ
401	CSK EDGGGW	YNR CHAANPN	GRIYWGGAYT	WDMAKHGTDD	GVVWMNWQGS
451	WYSMKKMSMK	IRPYFPEQ			

CAPITULO V

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se han propuesto como factores de virulencia diversos componentes y productos de *M. haemolytica* A1, incluyendo la adhesina, el polisacárido capsular, las fimbrias, las proteínas de membrana externa reguladas por hierro, la leucotoxina, el lipopolisacárido, las lipoproteínas, la neuraminidasa, sialoglicoproteasa y proteínas de unión a transferrina.

La adhesión de patógenos a la mucosa del epitelio respiratorio es un paso fundamental en la colonización e infección, las bacterias se unen a la superficie epitelial mediante receptores específicos, la expresión de los diferentes mecanismos de adherencia, están regulados por las condiciones microambientales y por la superficie celular dentro del mismo hospedero. En su forma más simple, la adhesión microbiana requiere la participación de una adhesina y su receptor, las interacciones que se establecen entre estos componentes son el resultado de enlaces complementarios específicos que permiten a la bacteria adherirse y evitar los mecanismos de defensa del hospedero. (Rauvala, 1983; Beachey, 1981)

Estudios previos han demostrado la habilidad de Mh para adherirse a las células epiteliales *in vitro*. Mh produce diversos componentes de superficie que le permiten adherirse, tales como: fimbrias, glicocalix, LPS, OMPs y adhesinas (Kisiela and Czuprynski, 2009; Jaramillo *et al*, 1999; Brogden and Clarke, 1997; Frank and Briggs, 1992; Highlander, 2001). Jaramillo y cols (2000) estudiaron una adhesina de Mh, que obtuvieron con el método de extracción salina desarrollado por Gentry, separaron extractos solubles bacterianos, de los cuales, al ser pasados por una columna de cromatografía de afinidad lograron purificar la

adhesina. En el presente trabajo además, se pudo demostrar que Mh libera la adhesina al medio cuando se cambian las condiciones de crecimiento, como la elevación de la temperatura, que en condiciones naturales, podría corresponder a la fase febril del hospedero, lo que sugiere que una infección previa viral en los bovinos probablemente favorece la adhesión de Mh a las células del tracto respiratorio, así como a los neutrófilos de los bovinos.

En el presente trabajo no fue posible determinar cual sería la forma más efectiva de purificar la adhesina por cromatografía de afinidad, empleando las columnas de mucina, fetuina y estroma de conejo, ya que las muestras obtenidas eran muy variables en cuanto a la concentración de proteínas y actividad aglutinante. Sin embargo, se comprobó que la adhesina de Mh reconoce el azúcar N-acetil-glucosamina de glicoproteínas como la mucina, la fetuina y las presentes en la superficie de los eritrocitos de conejo, tal como fue reportado anteriormente por Jaramillo *et al.*, (2000).

Por otro lado, al obtener el porcentaje de aminoácidos de la adhesina que se purificó en el presente estudio, existieron diferencias entre lo reportado por Jaramillo *et al.*, (2000) en varios aminoácidos, e incluso la falta de algunos como Histidina, Arginina, Prolina, Tirosina, Cisteína, Leucina y Fenilalanina (cuadro 6) lo que sugiere se trata de otra proteína que también le confiere propiedades de adhesión.

Jaramillo Meza (1998) mencionó que se han identificado otras proteínas de peso molecular similar al de la adhesina, en perfiles electroforéticos de preparaciones proteicas de la membrana externa, después de cultivar la bacteria en condiciones restringidas de hierro. Bajo estas condiciones se identificó una banda proteica de 70 kDa, cuyo análisis indicó una mezcla de tres diferentes proteínas, una de las cuales contiene epítopos específicos de serotipo y su

expresión, no es regulada por hierro, a diferencia de las otras que si son reguladas por este elemento. Una de estas últimas proteínas es altamente inmunogénica y normalmente se encuentra asociada con otra proteína de 100 kDa, que se une a la transferrina y cuya expresión también es regulada por hierro; mientras que la otra es la principal proteína que se tiñe en SDS-PAGE practicados en preparaciones de membrana externa de la bacteria y al parecer es menos inmunogénica.

Así mismo Kisiela y Czuprynski, (2009) demostraron la presencia de dos proteínas de superficie de Mh, con peso molecular aparente de 30 kDa, que le permiten adherirse a células del epitelio bronquial de bovino *in vitro*. Tales proteínas se identificaron como proteína de membrana externa termolábil (homóloga con OmpA) y la Lipoproteína 1 (Lpp1). La OmpA se ha informado que está involucrada en la adhesión e invasión bacteriana de varios patógenos gram negativos y en la activación de mecanismos de defensa del hospedero, por otro lado, la Lpp1 tiene homología con un cassette de transportadores de unión a ATP (ATP-binding cassette, ABC por sus siglas en inglés), los cuales se ha informado que contribuyen a la adhesión en otros patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, aunque en Mh aún no se conoce la función de dicha proteína (Berry *et al.*, 1996; Duim *et al.*, 1997; Pichavant *et al.*, 2003; Prasadarao *et al.*, 1996; Serino *et al.*, 2007). Lo cual muestra la importancia de continuar con investigaciones sobre los diversos mecanismos que puede emplear Mh para adherirse a las diferentes células del hospedero.

Como se ha mencionado anteriormente, un paso esencial para la invasión e infección es la adhesión bacteriana, y por lo tanto la interacción de las adhesinas con sus receptores en el hospedador. Se ha demostrado que Mh interactúa con células epiteliales de la tráquea a través de interacciones específicas con residuos de GlcNac y estructuras que poseen dicho azúcar (Jaramillo *et al.*, 2000), con células del epitelio bronquial (Kisiela y Czuprynski, 2009) y con leucocitos de

bovino, especialmente neutrófilos, a los que activa y les provoca estallido respiratorio (De la Mora *et al.*, 2006).

Los neutrófilos tienen un papel importante en la presentación de la enfermedad, entran a los pulmones de 4 a 6 horas después del desafío con Mh, después de 10 horas postinoculación, del 10 al 30% de los pulmones presentan infiltración de neutrófilos, microscópicamente se observa una bronconeumonía fibrinopurulenta. Los bronquiolos contienen un exudado fibrinoso con infiltración de neutrófilos extendiéndose hasta el epitelio bronquial y la capa submucosa. El conteo de neutrófilos, es un indicador del estado de salud de los pulmones en los bovinos, la proporción normal en fluido bronco alveolar de macrófagos y neutrófilos es de 10:1, sin embargo en animales enfermos de neumonía, la proporción de neutrófilos aumenta de 1:10. Esto apoya la teoría de que Mh inicia la respuesta inflamatoria en los pulmones, posterior a un estado de estrés o una infección viral, por la estimulación e infiltración de los neutrófilos, éstos al ser activados exacerbaban el daño en el tejido pulmonar, con la liberación de enzimas (Moore, 1999).

La función principal de los neutrófilos es la destrucción y la erradicación de los microorganismos en el sitio de infección, mediante la liberación de enzimas preformadas como fosfatasa ácida, lactoferrina, lisozima y defensinas, que tienen propiedades antibacteriales. Una vez activados secretan sustancias proinflamatorias como catepsinas que activan otras células inflamatorias, incluyendo a los mismos neutrófilos y a plaquetas. Además, los neutrófilos son capaces de generar anión superóxido, ácido hipocloroso e iones hidroxilo mediante explosión oxidativa, tales radicales libres destruyen a los microorganismos fagocitados (Coomber *et al.*, 2001; Moore, 1999; De la Mora *et al.*, 2006).

Se han realizado estudios sobre la participación de los neutrófilos en la pasteurelisis bovina, Leite *et al.*, (2002) informaron que la leukotoxina de Mh se une a la integrina β_2 CD11a/CD18 de los neutrófilos de bovino y que las citocinas como la IL 1, el TNF α y el INF γ , aumentan dicha interacción *in vitro*. De la Mora *et al.*, (2006) demostraron por citometría de flujo que los neutrófilos son las principales células blanco de la adhesina de Mh y en menor proporción los monocitos. Esta interacción depende del reconocimiento específico de receptores de GlcNAc. Además induce la producción de radicales libres por un mecanismo no opsónico que al parecer juega un papel importante en el daño tisular en la mannheimiosis.

En la inmunohistoquímica realizada en el presente estudio, se observó reconocimiento de los neutrófilos a la adhesina dentro y en la superficie, independientemente de la concentración o de los tiempos de incubación, sin embargo en los geles de dos dimensiones si se observan diferentes proteínas con respecto al gel testigo, lo que sugiere que existe una activación y por lo tanto una modificación en la síntesis de proteínas en los neutrófilos, lo que se comprueba con la identificación por MALDI-TOF, en el caso de la haptoglobina (Hp) de bovino.

La Hp es una α_2 -globulina con un peso molecular aproximado de 125 kDa, tiene una estructura de 4 cadenas $(\alpha\beta)_2$, unidas por puentes disulfuro. Está constituida por monómeros de 16 a 23 kDa (cadenas α) y 35 a 40 kDa (cadenas β). Su función principal es evitar la pérdida de hierro, mediante la formación de complejos muy estables con la hemoglobina libre en la sangre, por lo tanto se le atribuye un efecto bacteriostático por la restricción del hierro disponible que es necesario para el crecimiento bacteriano. Por ejemplo, se ha demostrado que la Hp humana inhibe el crecimiento *in vitro* de *Sreptococcus pyogenes* (Delange *et al.*, 1998).

La Hp es la principal glicoproteína de fase aguda en los bovinos, que aumenta en plasma en respuesta a inflamación y estrés. Varios tipos de células, como los hepatocitos, fibroblastos y leucocitos producen la Hp. Además de unirse a la hemoglobina, se le atribuyen funciones de inmunomodulación, reparación tisular, efecto bacteriostático y protección contra daño oxidativo. La Hp se considera un importante antioxidante, debido a que la hemoglobina es la principal fuente de hierro, y éste es capaz de producir especies reactivas de oxígeno. También puede evitar el daño oxidativo asociado con la producción de superóxido de los neutrófilos por el bloqueo de su activación con FMLP, ácido araquidónico y zymozan opsonizado. Asimismo la Hp tiene efectos antiinflamatorios por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

En los bovinos, Godson *et al.*, (1996) demostraron que la concentración de Hp sérica aumenta después de inducir experimentalmente inflamación, trauma y enfermedades *in vivo*. En la inducción experimental de la enfermedad respiratoria con inoculaciones separadas de Herpesvirus bovino tipo 1 y *Mannheimia haemolytica* A1, se observó un incremento de la concentración de Hp sérica. El aumento se presentó en pocos animales con la primera inoculación (Herpesvirus), después de la segunda inoculación (Mh) la mayoría de los animales presentaron mayor concentración de Hp sérica, además de fiebre, pérdida de peso y signos propios de neumonía.

Mitchell *et al.*, (2008) informaron que al inducir estrés en el ganado bovino, observaron neutrofilia en sangre y aumento de la concentración de Hp sérica. En su estudio, el estrés provocado en el destete, transporte y castración provocaron cambios en el fluido bronco alveolar con la respuesta de proteínas de fase aguda y estrés oxidativo.

Con base a lo anterior, se puede suponer que la adhesina, además de favorecer la invasión de Mh, al interactuar con la haptoglobina de los neutrófilos, evita que ésta cumpla su función como inmunomodulador y antioxidante, y por lo tanto, podemos comprender cómo los neutrófilos contribuyen a que el daño en el tejido pulmonar sea severo.

En el presente estudio, se realizó una inmunoelectrotransferencia utilizando un lisado de neutrófilos de bovino y se incubó con adhesina. Las bandas observadas se secuenciaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. Las proteínas de 150 y 53 kDa, presentaron homología con talina 1 y la cadena beta de fibrinógeno de bovino respectivamente. De la Mora *et al.*, (2006) purificaron un receptor de la adhesina en neutrófilos de bovino que tiene homología con la vinculina.

La talina 1 es una proteína de alto peso molecular del citoesqueleto concentrada en regiones de contacto célula-sustrato y en los linfocitos en la unión celular. La talina puede unirse a las integrinas, pero con baja afinidad, y a la vinculina con mayor afinidad (Rees *et al.*, 1990, Calderwood *et al.*, 2002). El aparato de adhesión celular posee proteínas de unión a actina (PUA) como la vinculina, talina y paxilina, que tienen la función de conectar los microfilamentos de actina en el citoesqueleto, con receptores proteicos de la membrana, como las integrinas. Básicamente el dominio intracelular de las integrinas se une a las PUA, las cuales a su vez se unen a la actina. De este modo, los receptores de membrana pueden obtener información del medio extracelular e introducirla a la célula y, por lo tanto modificar la adhesión celular, el movimiento y como consecuencia el crecimiento, diferenciación y expresión genética (Soboyejo, 2007).

El fibrinógeno es una proteína plasmática, cuya principal función es formar la fibrina para prevenir la pérdida de sangre por daño vascular. Además de su importante papel en la hemostasis, el fibrinógeno contribuye a la cicatrización de heridas y participa en otros procesos fisiológicos y patológicos por la interacción de múltiples dominios con proteínas de distintos tipos celulares. MacNeil *et al.*, (2002) informaron que el sobrenadante de cultivo de *Mannheimia haemolytica* A1 y *Pasteurella trehalosi* serotipo 10 contiene proteínas que se unen a fibrinógeno, sin embargo no identificaron dichas proteínas, sugieren que además de estar involucradas en la adhesión y evasión de la fagocitosis, podrían iniciar la cascada de coagulación, y por lo tanto provocar los depósitos de fibrina, que caracterizan la pasteurelosis. Por otro lado Jongerius *et al.*, (2007), demostraron que una proteína extracelular de unión a fibrinógeno de *Staphylococcus aureus* tiene la propiedad de evadir las moléculas del complemento, de tal forma que quizá la adhesina puede ayudar a *M. haemolytica* a evadir el sistema inmune.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que:

- ❖ La temperatura de cultivo de *Mannheimia haemolytica* es importante para la purificación de la adhesina, ya que se obtuvo una mayor actividad específica a temperaturas de 39 y 41°C.
- ❖ La adhesina a diferentes concentraciones y tiempos de incubación interactúa con los neutrófilos de bovino.
- ❖ La adhesina del presente trabajo tiene diferencias en la composición de aminoácidos con respecto a la reportada por Jaramillo *et al.*, (2000)
- ❖ La adhesina que se purificó en el presente estudio, tiene un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, ya que podría favorecer las

lesiones en el tejido pulmonar por la respuesta exacerbada de los neutrófilos al bloquear las funciones de la haptoglobina, además de que, posiblemente, al unirse al fibrinógeno, podría activarlo dando lugar a la fibrina y con ello, la presentación típica de la pasteurelisis bovina, una neumonía fibrinopurulenta, aunque esto no se ha podido comprobar, además es posible que la interacción con el fibrinógeno contribuya con la evasión de *M. haemolytica* al sistema inmune. La adhesina de *M. haemolytica*, al reconocer a la talina de los neutrófilos, probablemente favorece su migración o inclusive su activación y por lo tanto el estallido respiratorio.

- ❖ Finalmente, es necesario destacar que se requieren más estudios sobre los mecanismos de adhesión y factores de virulencia de *Mannheimia haemolytica* y los efectos exactos de daño provocados por la adhesión en los neutrófilos y de tal forma reforzar la idea de que la adhesina es uno de los candidatos potenciales para ser inmunógenos y de esta forma contribuir en la prevención de la enfermedad neumónica que provoca importantes pérdidas en la industria ganadera.

LITERATURA CITADA

- Abdullah, K.M., Lo, R.Y., Mellors, A., 1991. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease gene. *J Bacteriol* 173, 5597-5603.
- Adamu, J., 2007. *Mannheimia haemolytica*: Phylogeny and genetic analysis of its major virulence factors. *Israel J of Vet Med* 62, 6-13.
- Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge, A., Lindon, J.C., Baker, P.R., Beesley, J.E., Spacey, B., Craig, G.R., Nagy, L.K., 1984. Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* (serotype A1) organisms. *J Gen Microbiol* 130, 2415-2426.
- Aguilar Romero, F., Jaramillo Meza, L., Morales Alvarez, F., Trigo, F., Güemes Suárez, F., 1997. Evaluación de la protección contra la pasteurelisis neumónica, en corderos vacunados con diferentes antígenos de *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet Mex* 28, 221-229.
- Alexander, T.W., Cook, S.R., Yanke, L.J., Booker, C.W., Morley, P.S., Read, R.R., Gow, S.P., McAllister, T.A., 2008. A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. *Vet Microbiol* 130, 165-175.
- Al-Ghamdi, G.M., Ames, T.R., Baker, J.C., Walker, R., Chase, C.C., Frank, G.H., Maheswaran, S.K., 2000. Serotyping of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J Vet Diagn Invest* 12, 576-578.

- Angen, O., Mutters, R., Caugant, D.A., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 1999. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 1, 67-86.
- Berry, AM., Paton, JC., 1996. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37 kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 64, 5255-5262.
- Bingham, D.P., Moore, R., Richards, A.B., 1990. Comparison of DNA:DNA homology and enzymatic activity between *Pasteurella haemolytica* and related species. Am J Vet Res 51, 1161-1166.
- Blackall, P., Bojesen, A., Chistensen, H., Bisgaard, M., 2007. Reclassification of *Pasteurella trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 57, 666-674.
- Blanco, V.F.J., Trigo, F.J., Jaramillo-Meza, L., Aguilar, R.F., Tapia, P.G., Suárez, G.F., 1993. Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. Vet Mex 24, 107-112.
- Blanco, V.F.J., Trigo, F.J., Jaramillo-Meza, L., Aguilar, R.F., 1995. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from México. Rev. Lat-Am. Microbiol 37, 121-126.

- Bowland, S., Shewen, P., 2000. Bovine Respiratory disease: comercial vacines currently available in Canada. *Can Vet* 41, 33-48.
- Brogden, K., Clarke, C., 1997. Increase of glycocalyx and altered lectin agglutination profiles of *Pasteurella haemolytica* A1 after incubation in bovine subcutaneous tissue chambers in vivo or in ruminant serum in vitro. *Infect Immun* 65, 957-963.
- Calderwood, D.A., Yan, B., de Pereda, J.M., Alvarez, B.G., Fujioka, Y., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H., 2002. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem* 277, 21749-21758.
- Cardella, M.A., Adviento, M.A., Nerving, R.M., 1987. Vaccination studies against experimental bovine *Pasteurella* pneumonia. *Can J Vet Res* 51, 204-211.
- Chang, W., Carter, G., 1976. Multiple drug resistance in *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* from cattle and swine. *J Am Vet Med Assoc* 169, 710-712.
- Coomber, B., Nyarko, K., Noyes, T., Gentry, P.A., 2001. Neutrophil-Platelet Interactions and their relevance to bovine respiratory disease. *The Veterinary Journal* 161, 41-62.
- Cusack, P.M., McMeniman, N., Lean, I.J., 2003. The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust Vet J* 81, 480-487.

- Davies, R.L., Whittam, T.S., Selander, R.K., 2001. Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (lktA) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. J Bacteriol 183, 1394-1404.
- De la Mora, A., Trigo, F., Jaramillo, L., Garfias, Y., Solorzano, C., Agundis, C., Pereyra, A., Lascurain, R., Zenteno, E., Suarez-Guemes, F., 2006. The N-acetyl-D-glucosamine specific adhesin from *Mannheimia haemolytica* activates bovine neutrophils oxidative burst. Vet Immunol Immunopathol 113, 148-156.
- Delange, J., Langlois, M., Ouyang, J., Claeys, G., De Buyzere, M., Wuyts, B., 1998. Effect of haptoglobin phenotypes on growth of *Streptococcus pyogenes*. Clin Chem. Lab Med 36, 691-696.
- Donachie, W., Gilmour, N.J., Mould, D.L., Poxton, I.R., 1984. Comparison of cell surface antigen extracts from two serotypes of *Pasteurella haemolytica*. J Gen Microbiol 130, 1209-1216.
- Duim, B., Bowler, LD., Eijk, PP., Jansen, HM., Dankert, J., Alphen, L van. 1997. Molecular variation in the mayor outer membrane protein P5 gene of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* during chronic infections. Infect Immun 65, 1351-1356.
- Fales, W., Selby, L., Webber, J., Hoffman, L., Kintner, L., Nelson, S., Miller, R., Thorne, J., McGinity, J., Smith, D., 1982. Antimicrobial resistance among *Pasteurella* spp recovered from Missouri and Iowa cattle with bovine respiratory disease complex. J Am Vet Med Assoc 181, 477-479.

- Frank, G.H., Briggs, R.E., 1992. Colonization of the tonsils of calves with *Pasteurella haemolytica*. Am J Vet Res 53, 481-484.
- Fulton, R.W., Briggs, R.E., Payton, M.E., Confer, A.W., Saliki, J.T., Ridpath, J.F., Burge, L.J., Duff, G.C., 2004. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1^a, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. Vaccine 22, 643-649.
- Godson, D.L., Campos, M., Attah-Poku, S.K., Redmond, M.J., Cordeiro, D.M., Sethi, M.S., Harland, R.J., Babiuk, L.A., 1996. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. Vet Immunol Immunopathol 51, 277-292.
- Highlander, S.K., 2001. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (pasteurella) haemolytica*. Front Biosci 6, D1128-1150.
- Hodgins, D.C., Shewen, P.E., 2000. Vaccination of neonatal colostrum-deprived calves against *Pasteurella haemolytica* A1. Can J Vet Res 64, 3-8.
- Jacques, M., Paradis, S.E., 1998. Adhesin-receptor interactions in Pasteurellaceae. FEMS Microbiol Rev 22, 45-59.
- Jaramillo, L., Diaz, F., Hernandez, P., Debray, H., Trigo, F., Mendoza, G., Zenteno, E., 2000. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. Glycobiology 10, 31-37.

- Jaramillo Meza, L., Aguilar Romero, F., Trigo, F.J., 1987. Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida*, aisladas de pulmones neumónicos de becerros en México. *Vet Mex* 18, 185-188.
- Jaramillo Meza, L., 1998. Aislamiento de una hemaglutinina de *Pasteurella haemolytica* A1 y el estudio de su especificidad por carbohidratos. Maestría. UNAM, México.
- Jaramillo-Arango, C.J., Hernandez-Castro, R., Suarez-Guemes, F., Martinez-Maya, J.J., Aguilar-Romero, F., Jaramillo-Meza, L., Trigo, F.J., 2008. Characterisation of *Mannheimia* spp. strains isolated from bovine nasal exudate and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico. *Res Vet Sci* 84, 7-13.
- Jaramillo-Arango, C.J., Trigo, F., Suarez-Guemes, F., 2009. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *Vet Mex* 40, 293-315.
- Jeyaseelan, S., Sreevatsan, S., Maheswaran, S.K., 2002. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Anim Health Res Rev* 3, 69-82.
- Kehrenberg, C., Salmon, S.A., Watts, J.L., Schwarz, S., 2001a. Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of the tet(H) plasmid pMHT1. *J Antimicrob Chemother* 48, 631-640.

- Kehrenberg, C., Schulze-Tanzil, G., Martel, J.L., Chaslus-Dancla, E., Schwarz, S., 2001b. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet Res* 32, 323-339.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S., 2001. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. *FEMS Microbiol Lett* 205, 283-290.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S., 2002. Nucleotide sequence and organization of plasmid pMVSCS1 from *Mannheimia varigena*: identification of a multiresistance gene cluster. *J Antimicrob Chemother* 49, 383-386.
- Kisiela, D.I., Czuprynski, C.J., 2009. Identification of *Mannheimia haemolytica* adhesins involved in binding to bovine bronchial epithelial cells. *Infect Immun* 77, 446-455.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lafleur, R.L., Malazdrewich, C., Jeyaseelan, S., Bleifield, E., Abrahamsen, M.S., Maheswaran, S.K., 2001. Lipopolysaccharide enhances cytolysis and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin. *Microb Pathog* 30, 347-357.
- Lee, P.C., Lee, S.Y., Hong, S.H., Chang, H.N., 2002. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol* 58, 663-668.

- Lee, C.W., Shewen, P.E., 1996. Evidence of bovine immunoglobuline G1 (IgG1) protease activity in partially purified culture supernate of *Pasteurella haemolytica* A1. *Can J Vet Res* 60, 127-132.
- Leite, F., Gyles, S., Atapattu, D., Maheswaran, S.K., Czuprynski, C.J., 2003. Prior exposure to *Mannheimia haemolytica* leukotoxin or LPS enhances beta(2)-integrin expression by bovine neutrophils and augments LKT cytotoxicity. *Microb Pathog* 34, 267-275.
- Leite, F., O'Brien, S., Sylte, M.J., Page, T., Atapattu, D., Czuprynski, C.J., 2002. Inflammatory cytokines enhance the interaction of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin with bovine peripheral blood neutrophils in vitro. *Infect Immun* 70, 4336-4343.
- Lo, R.Y., 2001. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet Microbiol* 83, 23-35.
- Maslow, J., Mulligan, M., 1993. Molecular Epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 17, 153-164.
- Mitchell, G.B., Clark, M.E., Siwicky, M., Caswell, J.L., 2008. Stress alters the cellular and proteomic compartments of bovine bronchoalveolar lavage fluid. *Vet Immunol Immunopathol* 125, 111-125.
- Molloy, M.P., Herbert, B.R., Walsh, B.J., Tyler, M.I., Traini, M., Sanchez, J.C., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L., Gooley, A.A., 1998. Extraction of

membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 837-844.

Moore, K., 1999. Chemiluminescence of bronchoalveolar and blood neutrophils in calves challenged with *Pasteurella haemolytica* A1. Doctor of Veterinary Science. Guelph, Ontario, Canada.

Mosier, D.A., Simons, K.R., Briggs, D.J., Uhlich, G.A., 1995. Lectin histochemistry of normal and herpesvirus-infected bovine nasal mucosa. *Vet Pathol* 32, 140-146.

Mullen, L.M., Nair, S.P., Ward, J.M., Rycroft, A.N., Williams, R.J., Henderson, B., 2007. Comparative functional genomic analysis of Pasteurellaceae adhesins using phage display. *Vet Microbiol* 122, 123-134.

Murphy, G.L., Robinson, L.C., Burrows, G.E., 1993. Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. *J Clin Microbiol* 31, 2303-2308.

Narayan, S., Nagaraja, T., Chengappa, M., Steward, G., 2002. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol* 84, 337-356.

NCBI 2009. Taxonomy (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=45201&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unloc k>).

Pichavant, M., Delneste, Y., Jeannin, P., Fourneau, C., Brichet, A., Tonnel, AB., Gosset, P. 2003. Outer membrane protein A from *Klebsiella pneumoniae*

activates bronchial epithelial cells: implication in neutrophil recruitment. *J Immunol* 171, 6697-6705.

Pijoan Aguadé, P., Aguilar Romero, F., Morales Alvarez, F., 1999. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Vet Mex* 30, 149-155.

Pijoan, A.P., Aguilar, R., 2000. Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus*, aisladas en becerras lecheras en establos de Tijuana. *Vet Mex* 2, 153-156.

Pijoan, A.P., Chavez, D.J.A., 2003. Costos Provocados por Neumonias en becerras lecheras para remplazo, mantenidas bajo dos sistemas de alojamiento. *Vet Mex* 34, 333-342.

Prado, M.E., Prado, T.M., Payton, M., Confer, A.W., 2006. Maternally and naturally acquired antibodies to *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Vet Immunol Immunopath* 111, 301-307.

Prasadarao, N., Wass, C., Weiser, J., Stins, M., Huang, S., Kim, K., 1996. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* 64, 146-153.

Purdy, C.W., Raleigh, R.H., Collins, J.K., Watts, J.L., Straus, D.C., 1997. Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from pneumonic lungs of stressed feeder calves. *Curr Microbiol* 34, 244-249.

- Quirie, M., Donachie, W., Gilmour, N.J., 1986. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. *Vet Rec* 119, 93-94.
- Rees, D.J., Ades, S.E., Singer, S.J., Hynes, R.O., 1990. Sequence and domain structure of talin. *Nature* 347, 685-689.
- Reggie, Y.C., Sathiamoorthy, S., Shewen, P.E., 2006. Analysis of in vivo expressed genes in *Mannheimia haemolytica* A1. *FEMS Microbiol Lett* 265, 18-25.
- Rice, J.A., Carrasco-Medina, L., Hodgins, D.C., Shewen, P.E., 2007. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 8, 117-128.
- Rodostits, O., Gay, C., Blood, D., Hinchcliff, K., 2002. *Medicina Veterinaria. Tratado de enfermedades del ganado Bovino, ovino, caprino y equino.*, 9^o Edition. Mc Graw-Hill, España, 1530 p.
- SAGARPA 2006. Producción Pecuaria en México 2000-2005 (Servicio de Información Estadística, Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/prod0001.htm>).
- Serino, L., Nesta, B., Leuzzi, R., Fontana, M., Monaci, E., Mocca, B., Cartocci, E., Massignani, V., Jerse, A., Rappouli, R., Pizza, M., 2007. Identification of a new Ompa-like protein in *Neisseria gonorrhoeae* involved in the binding to human epithelial cells and in vivo colonization. *Mol. Microbiol.* 64, 1391-1403.
- Shewen, P.E., Lee, C.W., Perets, A., Hodgins, D.C., Baldwin, K., Lo, R.Y., 2003. Efficacy of recombinant sialoglycoprotease in protection of cattle against

pneumonic challenge with *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* A1. Vaccine 21, 1901-1906.

Soboyejo, W., Srivatsan, T., 2007. Advanced structural materials: Properties, design optimization, and applications. CRC Press, United States of America, 493 p.

Speer, N., Young, C., Roeber, D., 2001a. The importance of preventing bovine respiratory disease: a beef industry review. Bovine Pract 35, 189-196.

Speer, N., Young, C., Roeber, D., 2001b. The importance of preventing bovine respiratory disease a beef industry review. Bovine Pract 35, 189-196.

Straus, D.C., Unbehagen, P.J., Purdy, C.W., 1993. Neuraminidase production by a *Pasteurella haemolytica* A1 strain associated with bovine pneumonia. Infect Immun 61, 253-259.

Trigo, F., 1987. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. Cien Vet 4, 1-36.

Trigo, F.J., 1991. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la Pasteurelisis pulmonar bovina. Vet Mex 22, 131-134.

Van Rensburg, E., Du Preez, J.C., 2007. Effect of pH, temperature and nutrient limitations on growth and leukotoxin production by *Mannheimia haemolytica* in batch and continuous culture. J Appl Microbiol 102, 1273-1282.

- Vazquez, L., Massó, F., Rosas, P., Montaña, L., Zenteno, E., 1993. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B, 617-623.
- Versalovic, J., Lupski, J., 2002. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol* 10, 15-21.
- Viswanathan, V.K., Sharma, R., Hecht, G., 2004. Microbes and their products--physiological effects upon mammalian mucosa. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 727-762.
- Weekley, L.B., Veit, H.P., Eyre, P., 1998a. Bovine Pneumonic Pasteurellosis Part I. Pathophysiology. *The Compendium* 17, 33-46.
- Weekley, L.B., Veit, H.P., Eyre, P., 1998b. Bovine Pneumonic Pasteurellosis Part II. Clinical Presentation And Treatment. *The Compendium* 20, 56-62.
- Whiteley, L.O., Maheswaran, S.K., Weiss, D.J., Ames, T.R., Kannan, M.S., 1992. *Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: pathogenesis. *J Vet Intern Med* 6, 11-22.
- Younan, M., Fodor, L., 1995. Characterisation of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). *Res Vet Sci* 58, 98.
- Zanetta, J.P., Timmerman, P., Leroy, Y., 1999. Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of the O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of the monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology* 9, 255-266.

Zecchinon, L., Fett, T., Desmecht, D., 2005. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet Res* 36, 133-156.

Zulauf, B., 2007. Multiplex Real-Time PCR in the detection and differentiation of Bovine Respiratory Disease Pathogens. Oregon State University, Oregon.