



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA
DE DIFERENTES SEROGRUPOS DE *Pasteurella multocida*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

FERNÁNDEZ ROJAS MIGUEL ÁNGEL

DIRECTOR DE TESIS:

DR. Erasmo Negrete Abascal

Esta tesis fue realizada con apoyo del PAPIIT

Proyecto IN21601

LOS REYES IZTACALA, EDO DE MEX

2011





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.

"La dicha de la vida consiste en tener siempre

Algo que hacer

Alguien a quien amar

Y alguna cosa que esperar"

Anónimo

"El que no posee el don de maravillarse ni de entusiasmarse
más le valdría estar muerto, porque sus ojos están cerrados".

Albert Einstein

"Toda ausencia de prueba

No es prueba de ausencia"

Carl Sagan

"Es el verdadero arte del maestro
despertar la alegría por el trabajo y el conocimiento".

Albert Einstein

Dedicatorias

“A mi familia. A mi madre Margarita por apoyarme siempre, por ser un ejemplo de vida, tenacidad, fortaleza y cariño, gracias por darme la vida y tu cariño. A ti Gerardo por cuidar de mi como a tu hijo, gracias por tu apoyo y confianza. A mis abuelos Ernestina (q.e.p.d) y Silvino por estar siempre a mi lado, gracias por todo su cariño y por ser como mis padres. A mis tíos Toño, Paty y Martin y a mi primo Iván, gracias por apoyarme siempre, por estar a mi lado y por enseñarme la fortaleza que poseemos al ser una familia unida. Los quiero mucho”

“Al amor de mi vida, Brenda, gracias por cambiar mi vida desde que llegaste a ella, gracias por trabajar arduamente a mi lado es este proyecto que es tan tuyo como mio, por darme aliento cuando creí no poder, por tus opiniones, consejos, regaños y criticas gracias. Espero que este sea solo el comienzo de muchos logros juntos ¡Te amo pequeñita!”

“A mis amigos Aldo, Ari, Lizita, Lizota, Carlos, David y el psicólogo Ricardo, jajaja, gracias por hacer de esta etapa de mi vida inolvidable gracias por su compañía y apoyo gracias por ser mis amigos, siempre podrán contar conmigo”

“Al Dr. Erasmo por su infinita paciencia, por contener su puñito y encontrar las palabras para enseñarme y resolver mis dudas, en verdad muchas gracias”

“Al Dr. Sergio por todo su apoyo, consejos, anécdotas, comentarios, criticas, por regañarnos a Brenda y mí cuando no comíamos o cuando no hacíamos otra cosa que trabajar en el laboratorio”

“A los técnicos del laboratorio y compañeros Mónica, Fernando e Ismael gracias a ustedes y a los doctores hoy se, por lo menos, hacer un patrón de proteínas, gracias por ayudarme y aconsejarme durante este tiempo”

“A mis Sinodales M en C. Gloria Luz Paniagua Contreras, M en C. Eric Monroy Pérez y Biol. Alina Uribe Garcia por sus tiempo, comentarios y correcciones para hacer de este un mejor trabajo, gracias”

“Gracias a todos los mencionados aquí ya que sin ustedes dudo mucho haber logrado esto”

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genética de la Unidad de Morfología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y fue financiado por PAPIIT IN216010 y PAPCA FESI-UNAM

INDICE

1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	8
Enfermedades causadas por <i>Pasteurella multocida</i>	
Cólera aviar.....	9
Septicemia hemorrágica.....	9
Rinitis Atrofica.....	10
Pateurelosis en conejos.....	10
Factores de virulencia	
Capsula.....	11
Toxinas.....	11
Fimbrias.....	11
Porina H.....	12
Proteasas.....	12
Sistemas de Secreción	
Sistema de Secreción Tipo I.....	13
Sistema de Secreción Tipo II.....	13
Sistema de Secreción Tipo III.....	14
Sistema de Secreción Tipo IV.....	15
Autotransportadores.....	15
Vesículas de Membrana Externa (OMV)	
Formación de Vesículas de Membrana Externa.....	16
Composición de las Vesículas de Membrana Externa.....	17
Funciones de las Vesículas de Membrana Externa.....	18

Transferencia de DNA.....	19
Transporte de Toxinas.....	19
Transferencia de Compuestos resistentes a antibióticos.....	20
Comunicación Inter-especie.....	20
Predación.....	21
Comunicación entre diferentes reinos.....	21
3. Antecedentes.....	23
4. Justificación.....	25
5. Objetivos	
Objetivo General.....	26
Objetivos Particulares.....	26
6. Materiales y Métodos	
Cepas bacterianas y medio de cultivo.....	27
Obtención de las Vesículas de Membrana Externa.....	27
Microscopia Electrónica.....	27
Electroforesis.....	27
Proteínas Secretadas.....	27
Inmunoreconocimientos.....	28
Actividad Proteolítica.....	28
7. Resultados	
Obtención de Vesículas de Membrana Externa.....	29
Patrón proteico.....	29
Actividad Proteolítica.....	32
Inmunoreconocimientos	
Suero de Aves enfermas.....	32

Suero Anti-vesículas de <i>A. pleuropneumoniae</i>	33
Suero Anti-proteasa de <i>A. pleuropneumoniae</i>	33
Suero policlonal contra una proteína de 13 kDa de <i>G. anatis</i>	35
Proteína Termolábil.....	36
8. Discusión	
Obtención de Vesículas de Membrana Externa.....	38
Perfiles proteicos.....	38
Actividad Proteolítica.....	40
Inmunoreconocimientos	
Suero de Aves enfermas.....	40
Suero Anti-vesículas de <i>A. pleuropneumoniae</i>	41
Suero Anti-proteasa de <i>A. pleuropneumoniae</i>	41
Suero policlonal contra una proteína de 13 kDa de <i>G. anatis</i>	42
9. Conclusiones.....	44
10. Bibliografía.....	45

1. RESUMEN

Pasteurella multocida (Pm), es el agente causal de diversas enfermedades infecciosas en animales, este organismo, es capaz de liberar Vesículas de Membrana Externa (OMV), las cuales contienen factores de virulencia y proteínas inmunogenicas. OMV's en el rango de 50 a 250 nm, fueron observadas por microscopia electrónica de transmisión. Proteínas entre 25 y 180 kDa fueron observadas mediante geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie. Entre estas proteínas, una proteínas termolábil e inmunogenica, de 35 kDa, fue observada en las muestras de OMV's de los diferentes serogrupos usados en este trabajo. La proteína de 35 kDa fue identificada como una OMP A mediante espectrometría de masas y se observó enriquecida en OMV's de Pm 43017(serogrupo B) y Pm 12948 (serogrupo D).

Proteínas en el rango de 20 a 80 kDa fueron inmunoreconocidas por diferentes sueros hiperinmunes de animales infectados con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Avibacterium paragallinarum* o *Gallibacterium anatis*, sugiriéndonos la presencia de proteínas en común entre estos diferentes microorganismos. La presencia de proteasas fue observada en los zimogramas de Pm 43020 (serogrupo E) y en un aislado de campo perteneciente al serogrupo A, usando gelatina porcina o caseína como sustratos. Además bandas de aproximadamente 35 kDa y de pesos moleculares mayores, fueron identificadas en todas las muestras de Pm mediante un suero de conejo anti-proteasa de *A. pleuropneumoniae* usado en un Western-blot.

Palabras clave: *Pasteurella multocida*, Vesículas de Membrana Externa, OMV, proteasas

2. INTRODUCCIÓN

Pasteurella multocida forma parte de la flora normal de nasofaringe, tracto gastrointestinal y genital de animales domésticos y salvajes, sin embargo para varios mamíferos y aves es un importante patógeno del tracto respiratorio que puede desencadenar diversas enfermedades (Tabla 1) provocando severas pérdidas económicas a la industria pecuaria (Benitez, 2005) Además posee importancia médica para el hombre, ya que es responsable de diversas infecciones, la mayoría de ellas secundaria a algún tipo de contacto con animales (Koneman, et al, 2001)

Tabla 1. Patologías según la especie animal infectada con *Pasteurella multocida* (Benitez, 2005)

Huésped	Patología	Serotipos frecuentes	Características destacadas
Bovinos	Septicemia hemorrágica Neumonía	B:2,E:2,B:3,4 A:3,A:3,4	Altas tasas de mortalidad Generalmente asociada a <i>M. haemolytica</i>
Ovinos	Neumonía	D:1,D:4	Consolidación pulmonar
Pollos	Cólera aviar	A:1,A:3,B:4,A:5,A:8	Altas tasas de mortalidad
Pavos	Cólera	A:9	Depresión, inapetencia y diarrea
Cerdos	Rinitis atrófica Neumonía	A:3,D:3 A:3,5 ,D:4,D:10	Involucrada una toxina dermonecrotica Frecuentemente asociada a <i>Mycoplasma spp.</i>
Conejos	Coriza Neumonía	A:12 A:3,A:12	Lagrimo y secreción nasal Consolidación pulmonar

Esta bacteria se transmite de animal a animal principalmente por vía aérea a través de aerosoles. Se cree que la invasión también puede ocurrir a través de tejidos linfoides del tracto respiratorio. Otras posibles rutas de transmisión son por ingestión, contacto sexual, paso a través del canal de

nacimiento. Los brotes más agudos de pasteurelisis pueden ocurrir por la transmisión por ectoparásitos y por medio de fómites y moscas (Citado por Luna, 2003).

P. multocida es una bacteria Gram-negativa capsulada de forma cocobacilar de 0.5 x 1 µm, la cual forma colonias lisas de color gris de 1.5 a 2 mm de diámetro (Benitez, 2005). Está clasificada en cinco serogrupos capsulares denominados A, B, D, E, F y serovares 1-16, basados en antígenos de lipopolisacáridos o antígenos somáticos (Guadarrama, *et al.* 2009). Además no forma esporas y es de amplia distribución a nivel mundial. Puede diferenciarse de otras bacterias de la familia *Pasteurellaceae* porque produce indol, ornitina descarboxilasa, catalasa y oxidasa; fermenta glucosa, sacarosa y sorbitol. No crece en agar Mc Conkey, no utiliza citrato ni lactosa, no produce ureasa y no es NAD dependiente (Citado por Luna, 2003).

Enfermedades causadas por *Pasteurella multocida*

Como ya se menciona, *P. multocida* provoca una amplia gama de enfermedades en diferentes organismos, a continuación se explican de manera general las más relevantes:

I. Cólera aviar

Es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a aves domésticas y silvestres. Estas pueden portar al organismo durante un largo periodo de tiempo y ser una fuente de contagio para otras aves, se estima que *P. multocida* puede sobrevivir alrededor de un mes en aerosoles y de 2 a 3 meses en los cadáveres de aves muertas y el suelo.

La bacteria entra a los tejidos de las aves a través de las membranas mucosas de la faringe, de la conjuntiva o de heridas cutáneas. En estado agudo, las aves presentan fiebre, anorexia, descarga mucosa por el pico, diarrea, cianosis, respiración aumentada y hemorragia en los pulmones, si las aves no son tratadas, pueden morir. Además también se han presentado muertes súbitas sin signos de enfermedad (Citado por Luna, 2003).

II. Septicemia hemorrágica

La septicemia hemorrágica es una enfermedad aguda y fatal del ganado y búfalos causada por *Pasteurella multocida* serotipos B:2 y E:2 endémicos de Asia y África respectivamente. Esta

enfermedad es más frecuente en búfalos en malas condiciones en su manejo. Los síntomas clínicos frecuentemente no se observan pero incluyen, fiebre, pérdida del apetito, descargas nasales, incremento en la salivación y dificultad para respirar, además se presenta hinchazón en la región submandibular. La muerte usualmente es rápida y la mortalidad es generalmente de un 100% en los animales infectados (De Alwis, 1999).

La septicemia hemorrágica es considerada como la enfermedad de mayor impacto económico en el sureste de Asia, en el este, noreste, sur y la zona central de Africa (Verma y Jaiswal, 1998)

III. Rinitis atrófica en cerdos

Es una enfermedad contagiosa del ganado porcino causada por cepas de *P. multocida* toxigénicas del serotipo D, que sintetiza una exotoxina de acción dermonecrótica, tiene carácter endémico, plurifactorial, de curso subagudo-crónico, muy extendida y con fuerte impacto económico. La enfermedad se caracteriza por la total o parcial desaparición de los cornetes nasales, acompañada de distorsión facial y hemorragias nasales; las repercusiones en los índices productivos pueden ser graves.

El contagio suele ser directo, vía aerógena (oronasal), fundamentalmente roce de ollares, ya sea por medio del moco nasal, estornudos, olfateo, etc.; las fuentes de infección corresponden a saliva, lágrimas, aerosoles (Taylor, 1995).

IV. Pasteurelosis en conejos

En esta patología, la bacteria coloniza el tracto respiratorio superior y se desplaza hacia el oído medio del conejo, provocando una infección ótica, lo que conlleva al desarrollo de conjuntivitis y pérdida del equilibrio, entre los síntomas que se presentan, están: tos, descarga nasal viscosa, pérdida de apetito y disminución de peso (Citado por Luna, 2003).

Factores de virulencia de *Pasteurella multocida*

En el caso de *P. multocida*, esta expresa diferentes factores de virulencia, como lo son: proteínas tóxicas, fimbrias, capsula, porinas, proteasas y enzimas neuraminidasa y hialuronidasa (Negrete-Abascal, *et al.* 1999).

a. Cápsula

En bacterias Gram negativas, la capsula está compuesta por polisacáridos polianiónicos altamente hidratados y se encuentra fuera de la membrana externa. La capsula juega un papel importante para la bacteria, ya que determina el acceso de ciertas moléculas, participan en la adherencia a superficies e incrementan la tolerancia a la desecación.

La enfermedad que causa éste microorganismo, depende generalmente del serogrupo al que pertenezca, de esta manera, los serogrupos A y F afectan a aves causando cólera aviar, los serogrupos B y E provocan septicemia hemorrágica en ganado vacuno y búfalos, mientras que el serogrupo D afecta a cerdos, provocándoles rinitis atrófica. Todo esto sugiere que la capsula se encuentra relacionada con la enfermedad y especificidad del hospedero.

Además se considera a la capsula como un factor de virulencia, ya que se ha visto que las cepas capsuladas son más virulentas y capaces de resistir la inmunidad mediada por el complemento y la fagocitosis (Boyce y Adler, 2000).

b. Toxinas

En general, las cepas de *P. multocida* que causan cólera aviar, septicemia hemorrágica o neumonía, no expresan ninguna toxina. Hasta la fecha solo la toxina dermonecrotica (PMT) secretada por el serogrupo D es la única toxina identificada.

La toxina dermonecrotica actúa intracelularmente al modular la subunidad $G\alpha_q$ en la vía de transducción de señales de la fosfolipasa C, lo que en consecuencia incrementa la permeabilidad endotelial (Harper, *et al*, 2006). Esta toxina, es letal para ratones y cerdos en dosis de $1\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal.

c. Fimbrias

Para que se lleve a cabo una colonización exitosa por parte de la bacteria, es necesario que esta, sea capaz de adherirse a las células del hospedero, en diversas bacterias Gram negativas, se ha observado la presencia de fimbrias tipo IV, en el caso de *Pasteurella multocida*, estas se han aislado y caracterizado en los serogrupos A, B y D (Ruffolo, *et al*, 1997). Además, *P. multocida* posee varios genes dentro de su genoma (*ptfA*, *fimA*, *flp1*, *flp2*, *hsf_1* y *hsf_2*) los cuales codifican proteínas similares a las de fimbrias de otras bacterias (Harper, *et al*, 2006)

Asimismo se observó que *P. multocida*, gracias a fimbrias tipo IV, es capaz de adherirse a la mucosa epitelial de la nasofaringe de su hospedero (Ruffolo, *et al*, 1997).

d. Porina H

Las porinas son proteínas embebidas en la membrana de la célula que forman un poro o canal, el cual permite el paso de moléculas hidrofílicas generalmente no mayores a 600 Da, tanto al interior como al exterior de la célula como nutrientes, antibióticos e inhibidores entre otros. La porina H es la principal proteína de membrana de *P. multocida*. Esta OMP fue caracterizada como una porina ya que está relacionada con la superfamilia de las porinas en bacterias Gram negativas, debido a su alto contenido de glicina, bajo contenido en prolina y su carencia de cisteína (Citado por Luna, 2003).

e. Proteasas

Son enzimas degradativas que catalizan la hidrólisis total o parcial de las proteínas a péptidos. Estas se clasifican de acuerdo al tipo de reacción que catalizan, a la naturaleza química del sitio activo que poseen y su relación evolutiva con respecto a su estructura química (Barret, 1994)

Debido a que las proteasas desempeñan varias funciones en diferentes niveles de organización, son necesarias fisiológicamente para todos los organismos. En el caso de bacterias, la virulencia de algunas de estas, está relacionada con la secreción de proteasas extracelulares (Rao, *et al*, 1998). En el caso de *P. multocida* se ha visto que esta es capaz de secretar proteasas pertenecientes a la clase de las metaloproteasas y que estas presentan inmunoreconocimiento cruzado con un suero policlonal generado a partir de una proteasa de *Actinobacillus pleuropneumonie* (Negrete, *et al*, 1999). Posteriormente al purificar y caracterizar una proteasa de *Actinobacillus pleuropneumonie* también se observó que pertenecía a la clase de las metaloproteasas (Negrete, *et al*, 1998).

Sistemas de secreción

Las bacterias Gram-negativas poseen dos membranas diferentes, la membrana citoplasmática y la membrana externa, separadas por el periplasma, el cual contiene varios componentes estructurales y enzimas (Ramón, *et al*. 2006). Estas bacterias expresan cinco sistemas diferentes de

excreción entre los cuales, el sistema I y IV realizan un transporte activo de factores de virulencia de manera extracelular (Simeone, *et al*, 2009; Henderson, *et al*, 2004).

a. Sistema de Secreción Tipo 1 (SST1)

Este mecanismo es utilizado por una amplia gama de bacterias para la secreción de toxinas, proteasas y lipasas. Es una vía Sec-independiente, por lo que no se requiere del procesamiento de un péptido líder para atravesar la membrana citoplásmica; la secreción proteica se da en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular (Koster, *et al*. 2000).

Los sustratos a exportarse por este sistema presentan una señal de secreción en el extremo carboxilo terminal, que sin embargo, no es procesada. Esta señal es específica para ciertas subfamilias de sustratos como por ejemplo, las proteasas; sin embargo, aún se desconoce la naturaleza de dicha señal y el mecanismo mediante el que es reconocido.

El SSTI está constituido por tres componentes: un canal en la membrana externa denominado PME (proteína de membrana externa), un transportador ABC (de sus siglas en inglés *ATP binding cassette*) en la membrana interna (MI) y una proteína periplásmica que también está anclada a la MI y que se denomina PF (proteína de fusión) (Binet, *et al*. 1997)

b. Sistema de Secreción Tipo II (SSTII)

El SSTII es responsable de secretar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y toxinas, como la toxina del cólera. Esta vía también se conoce como sistema general de secreción y ocurre en dos etapas. Primero, la maquinaria Sec trasloca el sustrato con péptido líder a través de la membrana citoplasmática, por lo que el SSTII es una vía Sec-dependiente. Dicho péptido es generalmente una secuencia corta (de aproximadamente 30 aminoácidos), de los que uno o varios presentan carga positiva, además de una secuencia de 10 a 20 aminoácidos hidrofóbicos.

En una segunda etapa, la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la ME por un complejo sistema multiprotéico llamado tipo II o secretón (Thanassi y Hultgrenl. 2000; Lee y Schneewind, 2001)

c. Sistema de Secreción Tipo III

Es una vía Sec-independiente en la que la secreción ocurre en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular, que desempeña un papel central en la patogenicidad de muchas bacterias Gram-negativas. El SSTIII ha sido identificado en una gran variedad de patógenos de humanos, animales y plantas, incluyendo especies de *Bordetella*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Xanthomonas* y *Yersinia*. Mediante este sistema los factores de virulencia se pueden traslocar hasta el citosol de la célula eucarionte. La maquinaria está conservada entre los diferentes patógenos, sin embargo debido a que las proteínas secretadas difieren completamente, este mecanismo de transporte permite a sus portadores generar una amplia gama de enfermedades (Hueck, 1998). Además de su papel en la patogénesis, el SSTIII posee un parecido estructural y funcional con la maquinaria de biogénesis flagelar (Macnab, 1999).

Los sustratos a traslocarse por el SSTIII carecen de una señal de secreción definida, sin embargo, para algunas proteínas tanto del sistema flagelar, como del de virulencia, se ha demostrado que la señal se localiza en el dominio amino terminal (Hueck, 1998). A pesar de esto, no ha sido posible identificar secuencias conservadas en esta región y algunos datos sugieren que es más bien una propiedad fisicoquímica.

Tanto el flagelo, como el traslocón de secreción de moléculas efectoras, son sistemas complejos que requieren de más de 20 proteínas que se ensamblan en largas estructuras macromoleculares que atraviesan ambas membranas bacterianas, y en los sistemas de virulencia, también la membrana plasmática eucarionte. Es a través de dichos complejos macromoleculares que ocurre el proceso de secreción

Los complejos secretores de los factores de virulencia han sido aislados y observados por microscopía electrónica en *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, y recientemente en *E. coli* enteropatógena (Gonzalez- Pedrajo y Dreyfus, 2003). Existe una gran similitud entre los componentes estructurales de estas maquinarias con el cuerpo basal del flagelo, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo común de reconocimiento de sustrato y de exportación. Se ha propuesto que el aparato de exportación flagelar es el precursor evolutivo del sistema de secreción de virulencia (Hueck, 1998; Macnab, 1999).

d. Sistema de Secreción Tipo IV

Este sistema es un transportador versátil que secreta tanto ácidos nucleicos como proteínas. La exportación de la toxina pertussis (agente causante de la tos ferina) por *Bordetella pertussis* se lleva a cabo a través de esta vía y se han identificado sistemas homólogos en diferentes patógenos como *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori* y *Brucella suis*, entre otros (Christie y Vogel, 2000).

Los estudios realizados en los últimos años en este sistema se han enfocado a la identificación de las interacciones entre los componentes descritos, con la finalidad de poder definir los pasos en los que ocurre el proceso. La señal de reconocimiento no ha sido identificada y la base molecular del reconocimiento entre proteínas y complejos nucleoprotéicos en el SSTIV, aún no se conoce.

e. Autotransportadores

A través de este sistema se exportan proteínas con diferentes funciones incluyendo proteasas, toxinas, adhesinas e invasinas. Los autotransportadores representan una vía Sec-dependiente ya que utilizan la maquinaria Sec para atravesar la membrana interna; sin embargo, las proteínas no requieren de factores adicionales para transitar del periplasma hacia el exterior celular, como su nombre lo indica, dirigen su propia exportación. El extremo carboxilo terminal de la proteína dirige la secreción de la región amino terminal a través de la membrana externa (Gonzalez-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

La proteína a secretarse presenta tres diferentes regiones funcionales: una secuencia señal en el amino terminal para atravesar la membrana interna, seguida de un dominio también llamado pasajero, que dará origen a la proteína expuesta a la superficie celular y por último el dominio β en el carboxilo terminal, que permite la secreción a través de la membrana externa formando una estructura de barril con 10-18 hebras antiparalelas (Henderson, *et al.* 1998).

Vesículas de membrana externa (OMV)

En casi todos los casos, los factores de virulencia de bacterias Gram-negativas patógenas, son secretados al medio para la supervivencia de la bacteria y/o para causar daños a su hospedero. Este proceso de secreción de las bacterias Gram-negativas, es complejo por el hecho de que dichas bacterias se encuentran cubiertas por dos membranas lipídicas, la membrana interna y externa así

como el periplasma. Debido a esto las bacterias Gram-negativas desarrollaron varias estrategias, que les permitiera que sus factores de virulencia ganaran acceso al medio extracelular, generalmente tejidos o el flujo sanguíneo de su hospedero (Kuehn y Kesty, 2005).

Aunado a los sistemas de secreción mencionados anteriormente, se encuentra la liberación de Vesículas de membrana externa (OMV), estas estructuras son de forma esférica con un tamaño entre los 50 – 250 nm y son liberadas al medio durante el crecimiento de la bacteria, además, se ha visto que su producción aumenta cuando la bacteria se encuentra bajo estrés (Ellis, *et al*, 2010).

i. Formación de las Vesículas de membrana externa

El mecanismo molecular por el cual se forman las OMV's es aún desconocido, sin embargo Beveridge (1999) propuso que en el caso de *P. aeruginosa* sus vesículas se forman gracias a que se ve afectada la naturaleza anionica de la membrana externa.

Los lipopolisacaridos (LPS) de *P. aeruginosa* contienen dos tipos de antígeno-O: la banda A que es pequeña y posee una carga neutra, y otra banda más larga y cargada negativamente, la banda B. Beveridge al estudiar naturaleza de las OMV's observo que estas estaban compuestas primordialmente por la banda B del antígeno-O y propuso que las OMV's son menos propensas a formarse en zonas de la membrana con alto contenido de LPS con la banda A. En contraparte, las áreas ricas en LPS de banda B son más propensas a crear burbujas debido a la repulsión de cargas de las cadenas más largas y cargadas negativamente, con esto, Beveridge propuso que las áreas ricas en LPS de banda B causa un abultamiento de la membrana y forma estructuras curvas, las cuales pueden eventualmente desprenderse, formando así las OMV's (Kadurugamuwa & Beveridge, 1995, 1996; Li *et al*, 1996) (Fig. 1) (Ellis, *et al*. 2010).

Esta fue la primera hipótesis formulada acerca de la formación de vesículas de membrana y a pesar de nuevas hipótesis formuladas por otros autores (Kuehn & Kesty, 2005; Mashburn-Warren and Whiteley, 2006), todos incorporan aspectos de este modelo.

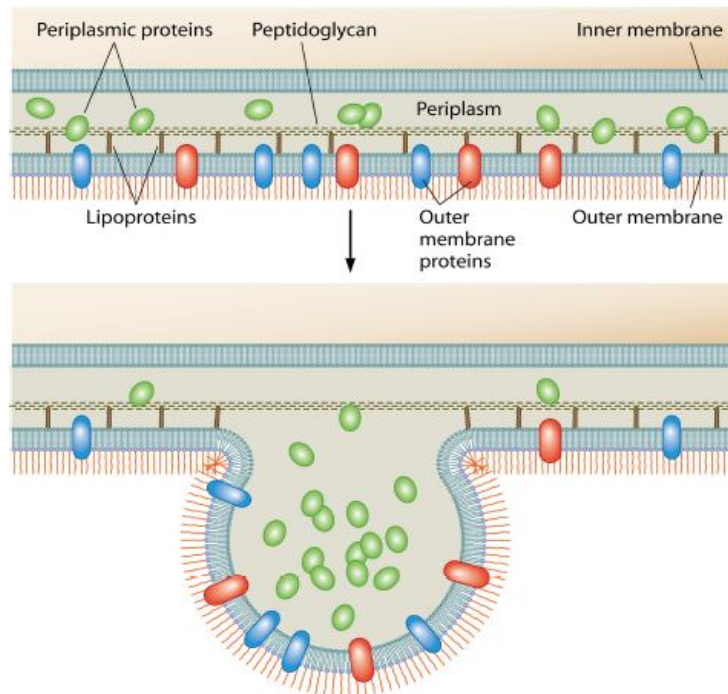


Fig 1. Modelo acerca de la formación de OMV's, donde se puede observar que poseen componentes tanto del periplasma así como de la membrana externa (Ellis, *et al*, 2010)

ii. Composición de las Vesículas de membrana externa

Las OMV se encuentran formadas por los componentes de la membrana externa y el periplasma incluyendo proteínas, fosfolípidos, lipopolisacáridos y OMP's. Además se ha comprobado que ciertos organismos liberan factores de virulencia, ejemplo de esto son las OMV's liberadas por *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales contienen: proteasas, fosfolipasa C, fosfatasa alcalina y hemolisinas (Kadurugamuwa, *et al*, 1995). En el caso de miembros de la familia *Pasteurellaceae* se ha reportado la presencia de toxinas y proteasas en OMV's liberadas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Negrete, *et al*, 2000). Hasta la fecha, se han reportado diferentes factores de virulencia secretados por diferentes bacterias Gram-negativas utilizando como vehículos a las OMV's (Tabla 2.) (Ellis, *et al*, 2010)

Aunque todavía es desconocido el beneficio de empaquetar toxinas dentro de las vesículas, se han propuesto dos potenciales ventajas: I) Las OMV's sirven para concentrar los factores de virulencia y enfocar la liberación de su contenido sobre su blanco; y II) al encontrarse los factores de virulencia en el interior de las vesículas, se encuentran protegidas de la degradación y/o

reconocimiento por alguno de los factores del hospedero o de otros organismos (Mashburn-Warren, *et al*, 2008)

Species	Vesicle-associated virulence factor(s) (reference[s])	Virulence-associated activity (reference[s]) ^a
<i>Acetobacillus acinomycetemcomitans</i>	Leukotoxin, GroEL (46, 73)	Bone-resorbing activity, chicken embryo lethality, cytotoxic (22, 73, 105)
<i>Acetobacillus pleuropneumoniae</i>	Apx toxin, proteases (102)	Proteolytic (102)
<i>Bacteroides fragilis</i>	Hemagglutinin, alkaline phosphatase, esterase lipase, acid phosphatase, phosphohydrolase, α - and β -galactosidases, α -glucosidase, glucosaminidase, β -glucuronidase (109)	Hemagglutinating and enzymatic activities (109)
<i>Bacteroides succinogenes</i>	Cellulase, xylanase (35)	Aryl- β -glucosidase, aryl- β -xylosidase, endoglucanase, xylanase activities (35)
<i>Bordetella pertussis</i>	AC-Hly, FHA, pertussis toxin (Ptx) (62)	ND
<i>Borrelia burgdorferi</i>	OspA, OspB, OspD (26, 123)	HUVEC adherence (123)
<i>Brucella melitensis</i>	Omp25, Omp31 (42)	ND
<i>Burkholderia cepacia</i>	PLC-N, lipase, PSCP, 40-kDa protease (2)	Enzyme activities (2)
EHEC O111:H-	ClyA (136)	Pore forming (136)
ETEC	LT (61, 137, 138)	Enterotoxigenic and vacuolating activities (61, 78)
ExPEC	Alpha-hemolysin, CDT, iron and hemin binding OMPs (6, 10)	Hemolytic, causing detachment of cells from monolayer (6)
STEC O157:H7	Shiga toxin 2 (81, 143)	Cytotoxic (143)
UPEC	CNF1 (83)	Cytotoxic (83)
<i>Helicobacter pylori</i>	VacA, Lewis antigen LPS (34, 63, 75)	Vacuolating activity (75), cytotoxic, stimulating proliferation, IL-8 secretion (66, 76)
<i>Legionella pneumophila</i>	Mip (lpg0791), IcmK/IcmX, flagellin, phospholipase C, LaiE/LaiF, phospholipase, chitinase, acid phosphatases, Hsp60, proteases, diphosphohydrolase (40)	Inhibition of phagolysosome fusion, proteolytic and lipase activity (33, 40)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	UspA1/UspA2 (127)	Binds C3 complement in serum (127)
<i>Neisseria meningitidis</i>	PorA, NlpB, NarE (putative) (93, 134)	TNF- α , IL-6, activation of tissue factor (procoagulant), profibrinolytic and antifibrinolytic factors (12, 119)
<i>Photobacterium luminescens</i>	Toxin AB, GroEL (49)	Insecticidal (79)
<i>Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis</i>	Arg- and Lys-gingipain cysteine proteinases (27, 48, 72)	Cleavage and loss of CD14 from macrophage, cleavage of IgG, C3, IgM (47)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Phospholipase C, hemolysin, alkaline phosphatase, Cif, PQS, quinolines, protease, β -lactamase (20, 21, 70, 89, 91, 92, 119)	Decrease of apical CFTR expression, <i>in vitro</i> enzyme activities, bactericidal quinolines, IL-8 stimulation (8, 20, 21, 70, 91, 92)
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Protective antigens (9)	ND
<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 1	Shiga toxin 1 (30)	Toxicity (30)
<i>Shigella flexneri</i>	IpaB, IpaC, IpaD (68)	Invasion (68)
<i>Treponema denticola</i>	Dentilysin, adhesins, proteases (19, 116)	Chymotryptic activity, disruption of tight junctions (19, 116)
<i>Vibrio anguillarum</i>	Metalloprotease, hemolysin, phospholipase (58)	Protease, metalloprotease, hemolytic activities (58)
<i>Vibrio cholerae</i>	RTX toxin (14)	Cell rounding, depolymerizing actin (14)
<i>Xanthomonas campestris</i>	Cellulase, β -glucosidase, xylosidase, avirulence proteins, type 3 secretion system proteins (124)	ND
<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	Bacteriocin, fimbrial adhesin, pore-forming protein, chitinase (79)	Chitinase activity, insecticidal (79)

Tabla 2. Factores de virulencia asociados a vesículas de membrana de diferentes bacterias (Ellis, *et al*. 2010)

iii. Funciones de las vesículas de membrana externa

Como hemos visto, la composición de la OMV's es compleja, debido a esto no es de sorprender que lleven a cabo varias funciones durante el desarrollo de las bacterias que son capaces de producirlas. Dentro de estas funciones, se encuentra el transporte de toxinas así como de material

genético, medios de comunicación con otras bacterias, la transferencia de factores de resistencia a antibióticos, predación y la comunicación entre reinos diferentes

1. Transferencia de DNA

En 1999, Kolling y Matthews proporcionaron evidencia de la presencia de material genético en las OMV's, al observar que las vesículas aisladas de la cepa O157:H7 de *E. coli* albergaba DNA el cual se encontraba protegido de la degradación por parte de las DNasas al encontrarse en el interior de las vesículas, con este estudio se demostró que *E. coli* O157:H7 es capaz de mediar la transferencia de DNA de una cepa a otra por medio de las vesículas, y de esta forma permitir una eficiente transformación de genes. Además se apoyaron a los trabajos realizados en 1982 por Kanhl y colaboradores quienes demostraron que células competentes de *H. parainfluenzae* poseían grandes cantidades de "burbujas" en su membrana externa en comparación con las células no competentes; por otra parte en el mismo año Deich y Hoyer observaron la misma condición en *H. influenzae*. Gracias a estos trabajos se sugirió entonces que las OMV's juegan un rol importante en la competencia natural y pueden funcionar como una manera de proteger al DNA de la degradación exógena (Mashburn-Warren y Whiteley, 2006).

2. Transporte de toxinas

Como ya se menciono anteriormente, varias bacterias patógenas incluidas, *E. coli*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Helicobacter pylori* y *Shigella dysenteriae* entre otras, producen OMV's asociadas a toxinas y son capaces de liberar dichas toxinas a sus células blanco. Un caso particular es el de la citolisina A de *E. coli*, ya que al parecer las OMV's no sirven solamente para el transporte de esta toxina sino que también es fundamental para ensamblar la forma oligomérica activa de esta toxina. La citolisina A (Cly A) es la proteína más abundante encontrada en las OMV's de *E. coli* y se encuentra como monómeros inactivos en el periplasma. Además se observo que la Cly A era más potente cuando se aislaba a partir de OMV's que al ser aislada del periplasma (Wai, et al. 2003)

3. Transferencia de compuestos resistentes a antibióticos

Las OMV's no solo son importantes para el transporte de toxinas, también son importantes para el transporte de proteínas entre bacterias de la misma especie. Ciofu y colaboradores (2000), demostraron que *P. aeruginosa* usa OMV's como vehículos para transportar una proteína que confiere resistencia contra antibióticos usados para tratar infecciones crónicas provocadas por *P. aeruginosa*, la β -lactamasa, de una bacteria a otra. Este transporte de β -lactamasa de una célula a otra permitía a las bacterias portadoras dentro de una población, transmitir esta proteína resistente a antibióticos (β -lactámicos). Aunque obviamente era necesario que dichas células poseyeran el gen codificante de la proteína, observaron que esta proteína en altas concentraciones liberada por pocas bacterias, era suficiente para que la mayoría de la población resistiera la acción del β -lactámico. Con esto se vio que las OMV's podían ser un nuevo método de resistencia bacteriana a antibióticos promoviendo la supervivencia y persistencia en casos clínicos.

4. Comunicación Inter-especie

Muchas bacterias usan señales químicas para comunicarse y modular la expresión de ciertos genes. Estos sistemas, llamados Sistemas de Quorum Sensing (QS), permiten a la bacteria monitorear el estado de la densidad poblacional y coordinar sus actividades en base a dicha densidad celular (Parsek y Greenberg, 2000)

En el caso de *P. aeruginosa*, ésta controla la transcripción de alrededor del 5% de sus genes por medio del QS. Un aspecto fundamental del QS es el movimiento de señales dentro del medio extracelular, donde estos sirven como medios de comunicación entre células. En 2005 Mashburn-Warren y Whiteley, reportaron que una molécula que forma parte del PQS (Pseudomonas Quinolone Signal), una red de señales, estaba asociada a OMV's que servían para el transporte de señales en una población de *P. aeruginosa*. De esta manera, el uso de OMV's para el transporte de señales en *P. aeruginosa* cobra relevancia, ya que *P. aeruginosa* al ser un miembro importante dentro de las comunidades microbianas de la rizosfera, las OMV's facilitan el flujo de señales a través de estas comunidades y

pueden servir también como protectores de estos mensajes químicos de la degradación por parte de otros miembros de las comunidades (Mashburn-Warren y Whiteley, 2006).

5. Predación

Esta función llevada a cabo por las OMV's fue puesta en evidencia gracias a trabajos realizados por Li *et al* (1996) y Kadurugamuwa y Beveridge (1999). Li propuso que las OMV's aisladas de *P. aeruginosa* poseían actividad antimicrobiana, estudios posteriores identificaron una proteína con actividad murein-hidrolasa capaz de romper los enlaces covalentes de los peptidoglicanos llevando a la célula a su lisis. Posteriormente en 1999 se observó que las OMV's de este mismo organismo y *Shigella flexneri* eran capaces de incorporarse a la membrana de *Salmonella Typhi*, *Salmonella entérica* y *E. coli*, así mismo vieron que al integrarse las OMV's dentro de la membrana externa de estas bacterias, permitía abrir y liberar los componentes de éstas en el periplasma, y que esto a su vez permitía el acceso subsecuente a la capa de peptidoglicanos de la bacteria blanco. Años más tarde se trató de probar si se tenía el mismo efecto lítico sobre organismos Gram-positivos ya que su composición de peptidoglicanos e hidrofobicidad, con respecto a las bacterias Gram negativas, es diferente. Por esto, se evaluó la actividad de las OMV's de *P. aeruginosa* sobre *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus hirae*, obteniendo como resultado que las OMV's actuaban de manera inmediata sobre las células blanco en especial sobre *B. subtilis*, con lo cual se concluyó que las OMV's sirven a la célula como un medio de predación natural y favorece la competitividad de la célula durante el crecimiento de la bacteria en una población polimicrobiana (Mac Donald y Beveridge, 2002).

6. Comunicación entre diferentes reinos

Otro uso potencial de las OMV's es el transporte de señales entre simbioses procariotas y eucariotas. Uno de estos sistemas es la simbiosis entre *Rhizobium* spp. y su pareja leguminosa. Varias especies de rhizobia, forman nódulos en sus

raíces capaces de fijar nitrógeno. En estos nódulos, las bacterias convierten el nitrógeno atmosférico en amonio para el uso de la planta, mientras esta ofrece a la bacteria un sustrato donde crecer (Patriarca, *et al*, 2002). La formación de estos nódulos, requiere de una comunicación específica entre la planta y la bacteria, esta última produce una señal llamada factor Nod, el cual se ha visto que puede ser insertada en membranas artificiales (Goedhart *et al*, 1999). Hasta la fecha no es claro aun si el factor-Nod puede ser transportado a través de OMV's sin embargo debido a la naturaleza membranosa de las vesículas, se cree que este factor puede ser cargado en las vesículas y ser transportado a la planta (Mashburn-Warren y Whiteley, 2006).

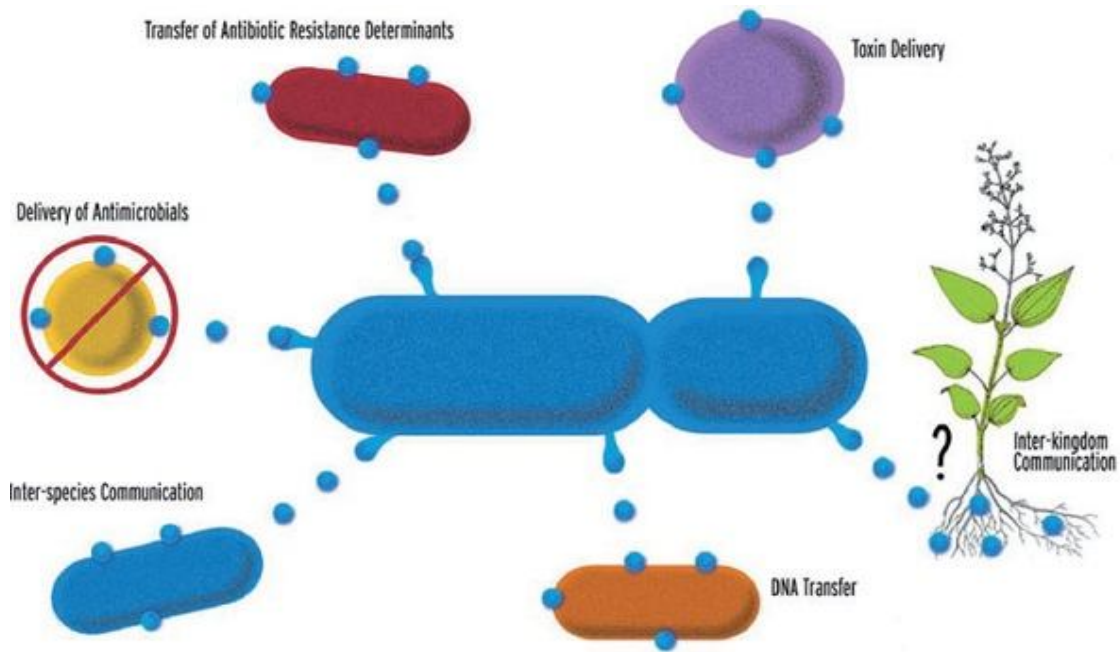


Fig 2. Roles conocidos e hipotéticos de las OMV's (Mashburn-Warren y Whiteley, 2006)

3. ANTECEDENTES

Las enfermedades que causa *Pasteurella multocida* a sus diferentes hospederos, han causado grandes pérdidas económicas. En el caso de la septicemia hemorrágica, de 1936 a 1944 provocó 40,000 muertes por año en la India, durante los años 50's el promedio de muertes por año fue de 30,000 a 60,000, mientras que en los años 70's el promedio de muertes por año fue de alrededor de 40000 bovinos (De Alwis, 1999).

En Norteamérica en los años 80's se estima que la industria ganadera perdió aproximadamente 800 millones de dólares y de 400 a 600 millones en los años 90's (Verma y Jaiswal, 1998).

En cuanto a la rinitis atrófica, se reportaron pérdidas por 1, 230,000 a 5, 939,000 libras esterlinas debido al control y tratamiento de esta enfermedad en la industria pecuaria de Reino Unido (Jordán y Roe, 2004)

Por otra parte, se produjeron pérdidas por 200 millones de dólares en la industria de las aves en 1986 (Luna, 2003) y posteriormente en 2000 hubo pérdidas por 640 millones de dólares en las industrias avícolas y ganaderas de Estados Unidos (Bowland y Shewen, 2000)

En cuanto a los factores de virulencia así como a las Vesículas de Membrana Externa, estas han sido descritas en diferentes microorganismos, los principales son:

- Kadurugamuwa y Beveridge en 1995, evaluaron la secreción de vesículas de membrana de *P. aeruginosa* al exponerla a gentamicina, observando que la cantidad de vesículas secretadas así como su tamaño aumentaba al ser expuesta la bacteria al antibiótico y que estas contenían una cantidad ligeramente mayor de LPS de banda B que las secretadas en condiciones normales
- Negrete-Abascal y colaboradores en 2000 aislaron y caracterizaron vesículas de membrana de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, encontrando que están contienen proteasas y toxinas, las cuales dañan al hospedero además de evitar la actividad bactericida favoreciendo la colonización del patógeno.

- Kuehn y Kesty en 2005 estudiaron la interacción entre hospedero-patógeno y su relación con las vesículas membranales, concluyendo que las vesículas desempeñan un papel importante en el establecimiento y colonización del hospedero, así como que las toxinas que estas transportan es un potente mecanismo de virulencia que presentan algunas bacterias patógenas Gram-negativas.
- Ramón Rocha en 2005, caracterizo las vesículas de membrana aisladas de *Haemophilus paragallinarum*, observando que tenían un tamaño entre 25 y 250 nm y que estas contenían, proteasas en estado inactivo, proteínas inmunogénicas, ácidos nucleicos y una hemaglutinina
- Amano y compañía en 2010, comprobaron que las vesículas de membrana tienen una función ofensiva en las interacciones hospedero-parasito, concluyendo que estas tienen la capacidad de diseminar factores de virulencia específicos a las células y tejidos del hospedero.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que las Vesículas de membrana externa no han sido descritas en *P. multocida* y su participación es importante en las infecciones que producen las bacterias capaces de secretarlas, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar las vesículas de membrana externa de *P. multocida*.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

- Aislar y caracterizar las vesículas de membrana externa de diferentes serogrupos de *P. multocida*

Objetivos particulares

- Aislar vesículas de membrana externa de diferentes serogrupos de *P. multocida*
- Obtener el perfil proteico de las vesículas de membrana mediante SDS-PAGE
- Identificar proteínas inmunogenicas presentes en las OMV's mediante inmunoreconocimientos con diferentes sueros de microorganismos pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*
- Demostrar la presencia de proteasas por medio de zimogramas

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y medio de cultivo

Las cepas que se utilizaron en este trabajo fueron *P. multocida* ATCC 43017, 43020, 12948 y dos aislados de conejo C-44 y C-35 gentilmente donadas por el Dr. Francisco Aguilar, INIFAP-Microbiología. Todas las cepas fueron crecidas en caldo soya tripticaseína por 24 h a 37°C.

Obtención de las Vesículas de membrana externa

1.5 L de medio de cultivo inoculados con cada cepa fueron centrifugados a 11000 rpm por 20 min. a 4 °C; el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de celulosa (0.22 µm) para remover remanentes celulares. Las vesículas de membrana externa (OMV) se colectaron por centrifugación a 45000 rpm x 2h a 4°C, fueron resuspendidas en 500 µl de Tris-HCl 20 Mm pH 7.5 y mantenidas en congelación a -20° hasta su utilización (Zhou, *et al.* 1998)

Microscopía electrónica

Muestras de 20 µg se colocaron en rejillas de cobre recubiertas con Formvar, se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico al 1% y se observaron en microscopio electrónico de transmisión (Kadurugamuwa y Beveridge, 1995)

Electroforesis

El perfil proteínico de las OMV se obtuvo por corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). Este patrón de proteínas se comparo con los de extractos totales y proteínas secretadas al medio (Negrete- Abascal, *et al.* 1994).

Proteínas secretadas.

El sobrenadante de cultivo libre de células se precipito en frío con sulfato de amonio al 70%, por 24 h. Para recuperar las proteínas precipitadas, el sobrenadante se centrifugo a 8000 x g a 4°C y el concentrado de proteínas se resuspendió en Tris-HCl 20 mM (Negrete-Abascal, *et al.* 1994)

Inmunoreconocimiento

Para determinar la presencia de proteínas con capacidad inmunogénica se realizaron geles de poliacrilamida al 10%. Después de la separación electroforética las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con leche al 5 %. Posteriormente se incubaron con anti-sueros contra VM de *A. pleuropneumoniae* (Negrete-Abascal, et al, 2000), suero anti-proteasa de *A. pleuropneumoniae* (Negrete- Abascal, et al, 1998), o sueros de aves infectadas experimentalmente con *G. anatis* (Salgado, 2011), *A. paragallinarum* (Mena, 2003) *P. multocida* o *G. anatis* y uno policlonal contra una proteína de 13 kDa, correspondiente a una pilina de *G. anatis* (Salgado, 2011). Como anticuerpos secundarios se emplearon suero anti-conejo, anti-rata, anti-pollo o proteína A, todos ellos peroxidados. Para evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo se empleo diaminobencina y H₂O₂ (Towbin, et al. 1979).

Actividad proteolítica

Para determinar si las OMV's contenían proteasas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % copolimerizados con gelatina al 0.1%. Las muestras fueron tratadas con EDTA 20 mM 30 minutos antes de ser cargadas al gel y no fueron tratadas con β-mercaptoetanol ni hervidas. Después de la electroforesis, los geles fueron incubados en presencia de Triton X100 al 2.5%, durante una hora a temperatura ambiente y enseguida, para activar a las proteasas, se utilizo un amortiguador de Tris 50 mM – CaCl₂ pH 7.5. Al teñir el gel con azul de coomasie, las zonas claras indicaron donde se llevo a cabo la actividad proteolítica (Ramón, et al. 2006).

7. RESULTADOS

Obtención de Vesículas de Membrana

Las muestras de Vesículas de membrana (OMV) obtenidas por ultra centrifugación fueron teñidas con ácido fosfotungstónico y observadas en el microscopio electrónico. En la Fig. 3 se muestran las vesículas secretadas al medio por *P. multocida*, durante el crecimiento de la misma. Se puede observar que son predominantemente de forma circular y su diámetro oscila entre 50 y 250 nm.

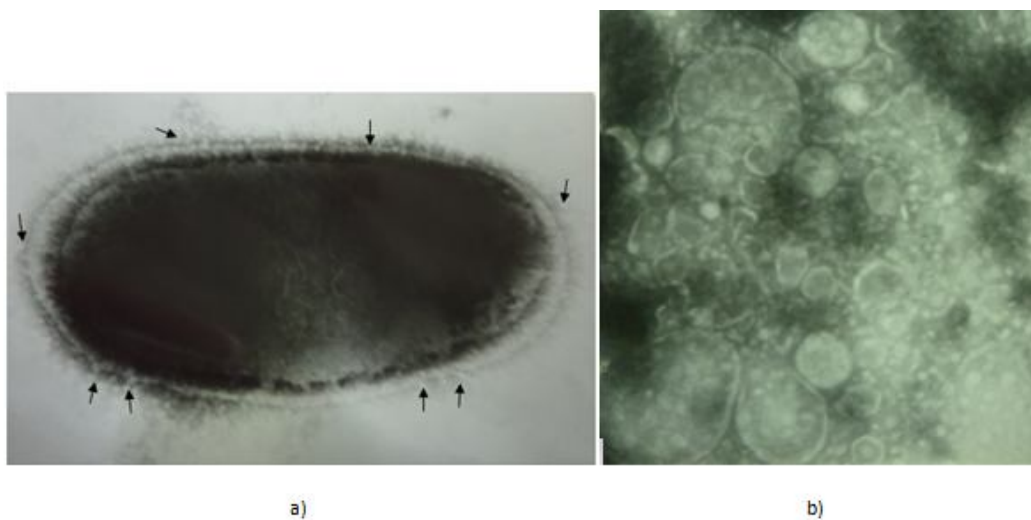


Fig. 3 a) Micrografía electrónica de *Pasteurella multocida* 12948 liberando vesículas de membrana indicado por las flechas, b) agregado de vesículas de membrana de Pm 12948

Patrón proteico.

Con el fin de obtener el perfil de proteínas de las vesículas, se realizó un análisis electroforético con las muestras de los diferentes serogrupos de *P. multocida* (43017, 43020, C-35, C-44 y 12948) de extractos totales, OMV y proteínas secretadas al medio.

El perfil proteínico de las muestras de extractos totales, nos permitió observar proteínas de 23 a 160 kDa (Fig. 4). Mientras que el número de proteínas presentes en las Vesículas de membrana (Fig. 5) es menor, para todos los serogrupos, que el mostrado en extractos totales.

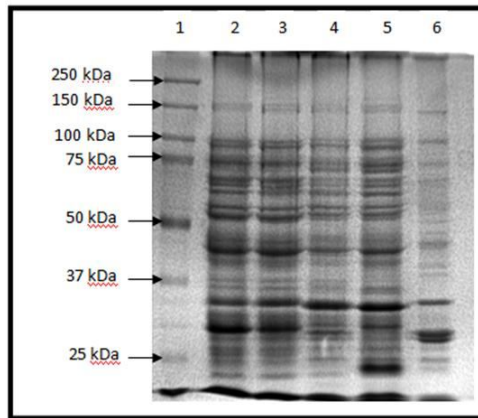


Fig. 4 Patrón de proteínas de extractos totales de diferentes serogrupos de *Pasteurella multocida* donde se observan bandas de proteínas en el rango de 25 hasta 150 kDa aproximadamente. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: Pm 43017, carril 3: Pm 43020, carril 4: Pm C35, carril 5: Pm C44 y carril 6 Pm 12948.

En OMV se observaron proteínas de pesos moleculares entre 24 a 120 kDa; en este patrón de proteínas se identificó una proteína de 35 kDa, presente en todos los serogrupos, la cual podría corresponder a una de las principales OMPs descritas en *P. multocida* (Jacques, *et al*, 1998). Además, se pudo observar un enriquecimiento de esta proteína en OMV de las cepas 43017 y 12948 (Fig. 5)

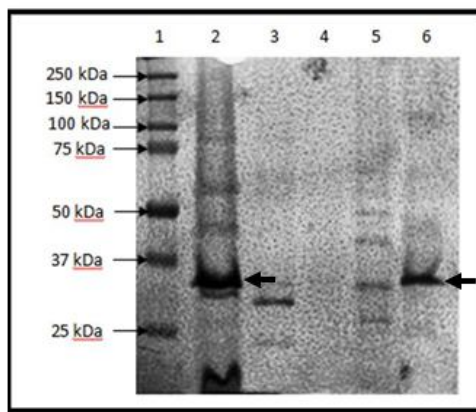


Fig. 5 Patrón de proteínas de OMV de diferentes serogrupos de *P. multocida*. Las flecha señalan una banda enriquecida de aproximadamente 35 kDa en Pm 43017 (carril 2) y 12948 (carril 6) Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: Pm 43017, carril 3: Pm 43020, carril 4: Pm C35, carril 5: Pm C44 y carril 6: Pm 12948

Por otra parte de las muestras de proteínas secretadas (Fig. 6), se encontraron en el rango de 24 a 200 kDa ; se observo que aunque el perfil proteico por arriba de 50 kDa es muy semejante entre los diferentes serovares, a pesos moleculares menores a 50 kDa el patrón de proteínas tiende a diferir encontrándose enriquecidas algunas proteínas; en Pm 43020 y 12948 (carril 3 y 6) se enriquece una proteína de aproximadamente 39 kDa, además de presentarse una banda de 38 kDa en Pm 43020, mientras que en ambos aislados de conejo, se observa enriquecida una banda de 35 kDa y por último, Pm 43020 y C-44 presentan una banda enriquecida en común, de aproximadamente 29 kDa (carril 3 y 5).

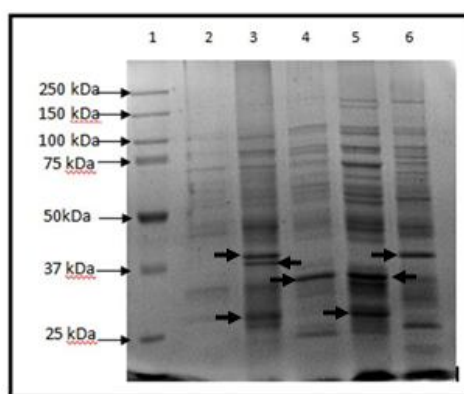


Fig. 6 Patrón de proteínas secretadas de diferentes serogrupos de *P. multocida*. Se observan proteínas en un rango de 25 a 170 kDa aproximadamente, las flechas señalan las proteínas enriquecidas en los diferentes serogrupos. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: Pm 43017, carril 3: Pm 43020, carril 4: Pm C35, carril 5: Pm C44 y carril 6: Pm 12948

Todas las bandas de las diferentes muestras de vesículas se encuentran también en los extractos totales (Tabla 3).

Tabla 3. Relación entre las proteínas encontradas en las diferentes muestras de OMV con respecto a los extractos totales

Muestras de OMV	Pesos de proteínas encontradas en OMV	Proteínas compartidas con extractos totales
43017	83, 55, 42, 35, 32, 31	83, 55, 42, 35, 32, 31
43020	35, 31, 23	35, 31, 23
C-44	45, 39, 35, 29	45, 39, 35, 29
12948	35	35

Actividad proteolítica

Para determinar si las vesículas de membrana de los diferentes serogrupos, tenían actividad proteolítica, se realizaron geles de poliacrilamida al 10%, copolimerizados con gelatina porcina al 0.1%, obteniendo el patrón mostrado (Fig. 7)

Se puede observar que solo las muestras de Pm 43020 y la del aislado de campo C-44, presentan actividad, en la primera se observan bandas de 174 y 237 kDa, mientras que en C-44 las bandas fueron de 65, 110 y 237 kDa aproximadamente

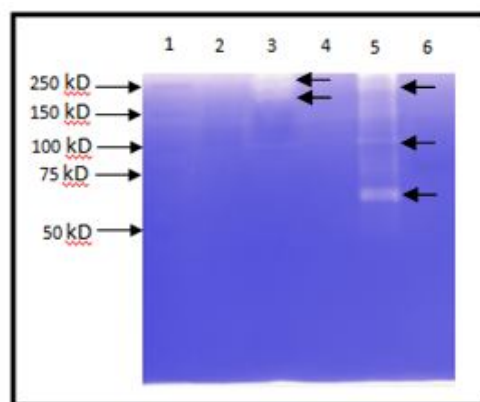


Fig 7. Actividad proteolítica de muestras de OMV en gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina al 0.1 %. Carril 1 (Marcador de peso molecular), carril 2 (Pm 43017), carril 3 (Pm 43020), carril 4 (Pm C35), carril 5 (Pm C44) y carril 6 (Pm 12948).

Inmunoreconocimientos

i. Sueros de aves enfermas

Se probaron sueros de aves infectadas experimentalmente con *G. anatis* (Fig. 8d), *A. paragallinarum* (Fig. 8c), y uno más que estaba infectado con *P. multocida* y *G. anatis* (Fig. 8b). El primer suero reconoció una banda de 35 kDa en la muestra de vesículas de Pm 12948, C-35 y C-44, en estas últimas, se observó reconocimiento para otras proteínas, en C-35 se pudieron reconocer bandas de 31 y 25 kDa, mientras que en el caso de Pm C-44 se reconoció una banda de 26 kDa. En cuanto a Pm 43020, se reconocieron dos bandas, con pesos de 31 y 29 kDa, en las muestras de extractos totales y vesículas, mientras que Pm 43017 se reconocieron dos bandas de 34 y 31 kDa (Fig. 9d).

El suero de aves enfermas con *A. paragallinarum* también reconoció la banda de 35 kDa en la muestra de vesículas de Pm 12948 y de Pm 43017, además en muestras de ésta última se reconocieron dos bandas más de 34 y 31 kDa (Fig. 9c). En cuanto a los aislados de conejo, C-35 reconoció la banda de 35 kDa, además de las bandas de 31 y 25 kDa reconocidas con los otros dos sueros de aves enfermas (Fig 8c), por su parte en la muestra de Pm C-44 se observó la banda de 35 kDa y una de 26 kDa reconocida por el suero de animales enfermos con *G. anatis*.

Finalmente, el suero de aves infectadas con *P. multocida* y *G. anatis*, reconoció la banda de 35 kDa en las muestras de vesículas de 12948, 43017 (Fig. 9b), además de reconocer dos bandas, reconocidas con el suero de aves infectadas con *A. paragallinarum* (Fig. 9c). En Pm 43020 se reconocieron bandas de 61, 54, 31 y 29 kDa en las muestras de extractos totales y vesículas. Las muestras de Pm C-35 presentaron reconocimiento de la banda de 35 kDa así como las de 31 y 25 kDa vistas en los otros sueros y una más de aproximadamente 58 kDa (Fig. 8b), la cual también se observó al usar el suero de aves enfermas con *G. anatis* (Fig. 8d). Por último C-44 reconoció las bandas de 35 y 26 kDa al igual que los otros sueros de aves enfermas.

ii. Suero Anti-Vesículas de *A. pleuropneumoniae*

El suero contra vesículas reconoció proteínas en común con los sueros de aves infectadas (Tabla 4), en el caso de Pm 12948 mostro la banda de 35 kDa en la muestra de vesículas al igual que en Pm 43017 (Fig. 9a) quien además mostro la banda en extractos totales y al igual que los sueros de *G. anatis*(Fig. 9d) y *P. multocida/G. anatis* (Fig. 9c) mostro bandas de 34 y 31 kDa. En cuanto a los aislados de campo, C-35 compartió una banda de 58 kDa con los sueros de aves infectadas con *G. anatis* (Fig. 8d) y *P. multocida* con *G. anatis* (Fig. 8c), mientras que en C-44 mostro la banda de 26 kDa además de compartir bandas de 28 y 24 kDa con los sueros de *G. anatis* y *P. multocida* con *G. anatis*

iii. Suero Anti-Proteasa de *A. pleuropneumoniae*

Debido a que en el gel de actividad proteolítica, solo dos muestras de vesículas de los diferentes serogrupos presentaron actividad, se quiso corroborar que efectivamente las demás muestras no poseían proteasas en su interior, por lo que se llevo a cabo un inmunoreconocimiento con este mismo suero a las diferentes muestras de vesículas, encontrando que en todas ellas se reconoce una proteína de 37 kDa aproximadamente (Fig. 10)

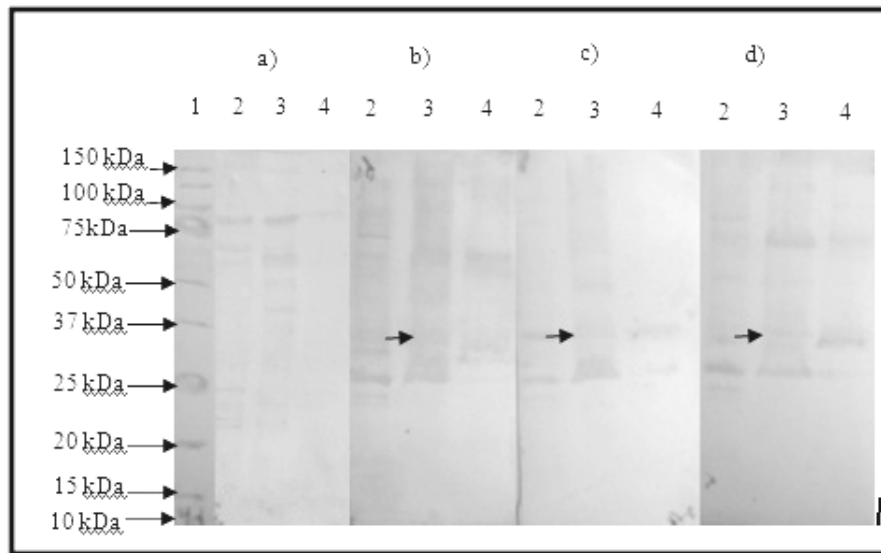


Fig 8. Inmunoreconocimiento de las proteínas obtenidas de extractos (2), vesículas (3) y proteínas secretadas (4) de Pm C-35, por diferentes sueros hiperinmunes contra, a) VM de *A. pleuropneumoniae*, aves infectadas experimentalmente con b) *P. multocida* y *G. anatis*, c) *A. paragallinarum* o d) *G. anatis*. Marcador de peso molecular (1). Podemos observar que una proteína de aproximadamente 35 kDa es reconocida por varios antisueros al igual que en el caso de Pm 43017.

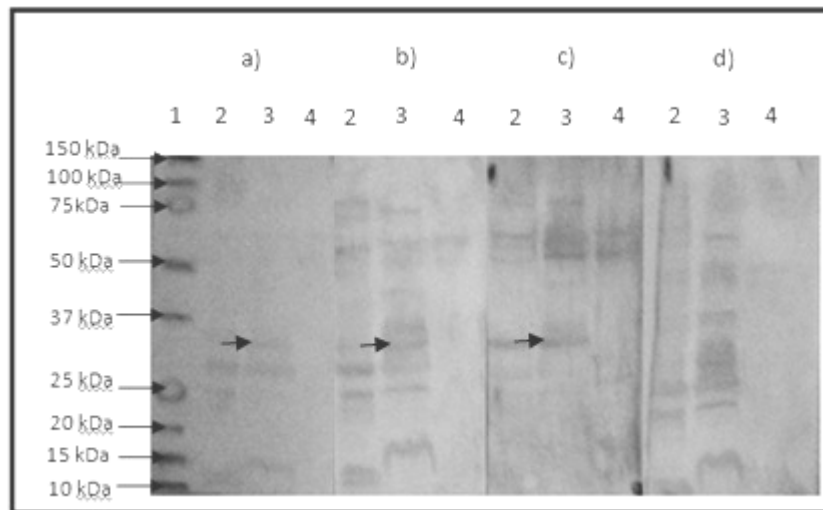


Fig 9. Inmunoreconocimiento de las proteínas obtenidas de extractos (2), vesículas (3) y proteínas secretadas (4) de Pm 43017, por diferentes sueros hiperinmunes contra, a) VM de *A. pleuropneumoniae*, aves infectadas experimentalmente con b) *P. multocida* y *G. anatis*, c) *A. paragallinarum* o d) *G. anatis*. Marcador de peso molecular (1). La flecha señala una proteína de 35 kDa reconocida por todos los sueros.

Tabla 4. Proteínas conservadas entre las diferentes cepas reconocidas por diferentes sueros generados a partir de organismos pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*

Cepa	Suero de aves infectadas con <i>G. anatis</i>	Suero de aves infectadas con <i>A. paragallinarum</i>	Suero de aves infectadas con <i>P. multocida</i> y <i>G. anatis</i>	Suero Anti-Vesículas de <i>A. pleuropneumoniae</i>
43017	34, 31	35,34,31	35,34,31	35,34,31
43020	31,29	Ninguna	61,54,31,29	Ninguna
C-35	58,35,31,25	35,31,25	58,35,31,25	58
C-44	35,28,26,24	35,26	35,28,26,24	28,26,24
12948	35	35	35	35

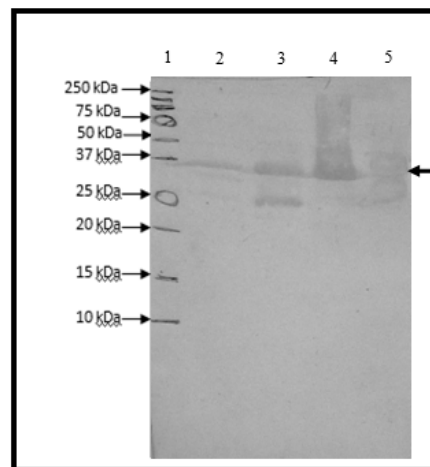


Fig 10. Inmunoreconocimiento de una proteína de aproximadamente 37 kDa en todas las muestras de vesículas de Membrana de los diferentes serogrupos Pm 43020 (2), Pm C-35 (3), Pm C-44 (4) y Pm (12948) por un suero hiperinmune anti-proteasa de *A. pleuropneumoniae*.

iv. Suero policlonal contra una proteína de 13 kDa de *Gallibacterium anatis*

Por otra parte, debido a que las vesículas se forman de la membrana externa, y esta posee fimbrias, se realizó un inmunoreconocimiento con un suero policlonal contra una proteína de 13 kDa de *Gallibacterium anatis*, la cual corresponde a una subunidad de las fimbrias de este organismo. De esta forma pudimos observar reconocimiento para dos proteínas principalmente de aproximadamente 27 kDa y 37 kDa en Pm 12948 y ambos aislados de conejo (Fig. 11 3, 4 y 5),

mientras que en Pm 43020 y Pm 43017 (datos no mostrados) se observó una tenue banda de aproximadamente 32 kDa (Fig. 11)

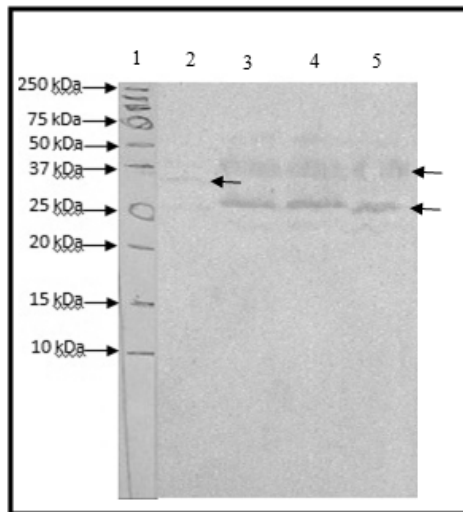


Fig 11. Inmunoreconocimiento de las muestras de Vesículas de Membrana de los diferentes serogrupos Pm 43020 (2), Pm C-35 (3), Pm C-44 (4) y Pm (12948) por un anticuerpo policlonal contra una proteína de 13 kDa *Gallibacterium anatis*. Marcador de peso molecular (1)

Proteína termolabil

Como pudimos observar, al realizar los inmunoreconocimientos se observó que la mayoría de ellos reconocían una proteína de aproximadamente 35 kDa, además de esto se observó que al tratarla bajo ciertas condiciones la proteína cambiaba de peso (Fig. 12). Debido a esto y a la capacidad de ser reconocida por distintos sueros de diferentes organismos, se decidió identificar la proteína por medio del MALDI-TOF. Este análisis de los péptidos obtenidos por espectrometría indicaron que esta proteína de 35 kDa correspondía a una Omp A.

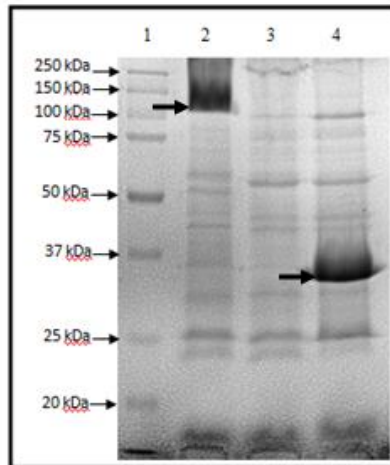


Fig 12. Patrón de proteínas de vesículas de membrana tratadas con diferentes condiciones, preparación cruda de OMV de Pm 12948 (2), OMV de Pm 12948 con β mercaptoetanol (3) y OMV de Pm 12948 con β mercaptoetanol y hervidas. Se observa que la proteína de 35 Kda presenta un peso diferente de aproximadamente 100 kDa cuando se encuentra en ausencia de β mercaptoetanol y calor. Marcador de peso molecular (1)

8. DISCUSIÓN

Obtención de OMV's

Un proceso de suma importancia en la colonización e infección de bacterias patógenas es la liberación de vesículas de membrana (OMV). El mecanismo exacto mediante el cual se forman aún no se conoce, sin embargo varios trabajos concuerdan en que la vesiculación se da debido a la repulsión de cargas por parte de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa, lo que ocasiona la formación de estructuras curvas en la bacteria, las cuales son liberadas al medio, conteniendo material del periplasma y la membrana (Beveridge, 1999; Kadurugamuwa & Beveridge, 1995, 1996; Li *et al*, 1996; Kuehn & Kesty, 2005; Mashburn-Warren and Whiteley, 2006) Este proceso se da a lo largo del crecimiento poblacional de la bacteria ya que se ha visto que las OMV cumplen con diferentes funciones importantes para la bacteria como predación, vehículos de comunicación inter-específica y entre diferentes reinos, transferencia de DNA, toxinas y factores de resistencia (Mashburn-Warren y Whiteley, 2006)

Estas estructuras se han podido describir en miembros de la familia *Pasteurellaceae* como *A. pleuropneumoniae* (Negrete-Abascal, *et al.* 2000) y *A. paragallinarum* (Ramón, 2005) en donde se reportaron vesículas de membrana de forma esférica con tamaños de 20 a 200 nm y 25 a 300 nm respectivamente. En este trabajo se pudieron observar vesículas con un tamaño menor, siendo de 50 a 250 nm, lo cual concuerda con lo reportado por Kadurugamuwa y Beveridge (1995) quienes observaron que las OMV de *P. aeuroginosa* tenían un tamaño entre 100 a 150 nm cuando la bacteria era crecida en presencia de gentamicina, mientras que al ser crecidas sin antibiótico, su diámetro era de 50 a 80 nm aproximadamente (Fig 3)

Perfiles proteicos

En cuanto a los perfiles de proteínas de extractos totales se refiere, se observaron patrones proteicos similares, siendo una de estas proteínas en común la proteína de 35 kDa. En cuanto a el patrón proteico de las OMV fue diferente que el visto en las muestras de extractos totales y proteínas secretadas para todos los serogrupos, sin embargo todas las proteínas de las OMV se encontraban también en las muestras de extractos y algunas en proteínas secretadas, por lo que

es posible deducir que las bandas que encontramos, corresponden a proteínas de la membrana y del periplasma (Kadurugamuwa, *et al*, 1995)

En el caso de las OMV vimos que todas las muestras, a excepción de *Pm* C-35, presentan una proteína de 35 kDa, la cual estaba enriquecida en *Pm* 43017 y 12948 (Fig. 5) en comparación con las muestras de extractos totales de todos los serogrupos en las que se observa la proteína de 35 kDa aproximadamente en la misma concentración (Fig. 4). A pesar de que no se observó en el gel con muestras de C-35, los inmunoreconocimientos demostraron que también se encontraba dicha proteína solo que en menor cantidad.

Esta proteína de 35 kDa fue reportada anteriormente por Dabo y colaboradores (1996) quienes observaron que esta proteína pesaba 35 kDa al ser calentada a 100 °C. Al obtener la secuencia de esta proteína se vio que tenía un 60% de homología con una OMP A de *E. coli*. Posteriormente estos investigadores (2003) caracterizaron a esta proteína como una OMP A-like de *Pm* serotipo A:3 y dieron una posible configuración de esta proteína en la membrana. Esto concuerda con nuestros resultados, pues en muestras de vesículas, esta proteína presentó un cambio de peso al ser tratada con β -mercaptoetanol y ser calentada a 96 °C (Fig. 12), además por medio del análisis de los péptidos obtenidos por espectrometría, se corroboró que esta proteína corresponde a una OMP A.

La familia de las OMP A es la de mayor abundancia en la membrana externa (Dabo, *et al*. 2006), numerosas especies de bacterias gram-negativas, tanto entéricas como no-entericas, contienen proteínas termolábiles estructuralmente similares a esta OMP (Beher, *et al*. 1980), algunas de estas bacterias incluyen a *A. actinomycetemcomitans*, *Haemophilus somnus*, *H. influenzae*, *H. ducreyi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *P. aeruginosa*, y *Serratia marcescens*. En el caso del género *Pasteurella*, además de la proteína reportada para *P. multocida*, se han identificado dos proteínas de 32 y 35 kDa en *M. haemolytica*, de las cuales, la proteína de 35 kDa posee una homología del 60% con la OMP A descrita en *E. coli* y hasta del 100% con una OMP A de *A. actinomycetemcomitans* y *H. somnus* (Mahasreshti, *et al*. 1996)

En cuanto al rol que desempeña esta proteína, parece ser que se encarga de mantener la integridad de la membrana, al funcionar como un enlace entre la membrana externa y la capa subyacente de peptidoglicanos, esta hipótesis se fundamenta en la observación de que mutantes carentes de OMP A generaban células esféricas y que solo podían sobrevivir bajo condiciones

osmóticas equilibradas (Sonntag, *et al.* 1978). Además Weiser y Gotschlich, (1991) demostraron que esta proteína es importante para la virulencia de la bacteria, al observar que mutantes de *E. coli* carentes de OMP A reducían su virulencia al contrario de las que poseían la OMP, quienes eran más virulentas y resistentes.

Actividad Proteolítica

Las proteasas son enzimas capaces de degradar parcial o totalmente proteínas y péptidos, estas se clasifican de acuerdo a sus características (Barret, 1994). En trabajos anteriores se ha demostrado que *P. multocida* es capaz de secretar proteasas pertenecientes a la clase de las metaloproteasas y que estas presentan reconocimiento con un suero policlonal generado a partir de una proteasa de *A. pleuropneumoniae* (Negrete, *et al.*, 1999). En este trabajo pudimos evidenciar la presencia de proteasas activas en las muestras de vesículas de Pm 43020 y C- 44, las cuales fueron tratadas con un agente quelante ya que las muestras se difuminaban (Fig. 7). Este resultado concuerda con el trabajo mencionado anteriormente, en el cual la actividad se veía inhibida por un quelante (EDTA), además Negrete y colaboradores (1998) caracterizaron a una proteasa de *A. pleuropneumoniae* también como una metaloproteasa al observar que la actividad se veía inhibida por EDTA a una concentración de 10 mM. Por lo tanto podemos suponer que las proteasas encontradas en las vesículas de *P. multocida*, también pertenecen a la misma clase.

Inmunoreconocimientos

i. Sueros de aves enfermas

En los reconocimientos con estos sueros, pudimos observar que varias proteínas en común fueron reconocidas en los diferentes serogrupos, de estos, solo Pm 43020 y C-35 presentaron bandas en común entre los diferentes sueros de un peso superior a 35 kDa, siendo de 54 y 61 kDa en 43020 y 58 kDa en el aislado de campo, el cual compartió proteínas de 35 y 31 kDa con Pm 43017 y 12948, mientras que C-44 coincidió en la banda de 35 kDa con las demás. Esto se puede explicar debido al hecho de que al formarse a partir de la membrana externa y poseer componentes del periplasma, las vesículas de membrana poseen componentes de estas, entre estos OMP's. Este resultado nos sugiere que dichos organismos, *G. anatis* y *A. paragallinarum*, poseen proteínas con funciones

similares y que además estas se encuentran conservadas en los diferentes serogrupos de *P. multocida*.

ii. Suero Anti- Vesículas de *A. pleuropneumoniae*

Con el suero anti-vesículas pudimos ver que al igual que en los reconocimientos con los sueros de aves enfermas, existen proteínas en común entre los diferentes serogrupos, una vez más resalta la proteína de 35 kDa la cual fue reconocida en Pm 43017 y 12948, además se reconocieron bandas de 34 y 31 kDa en 43017, mientras que en los aislados de conejo y Pm 43020 se reconocieron otras bandas que aunque no fueron reconocidas en las otras cepas, se pudo observar que si lo fueron por los sueros de *G. anatis* y *P. multocida* con *G. anatis*, lo cual una vez más podría indicar que *G. anatis* y *A. pleuropneumoniae* conservan proteínas con funciones similares con *Pasteurella multocida*. Este resultado concuerda con lo obtenido por Frosch y colaboradores (1991) quienes al realizar un análisis de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la OMP Ctr A de diferentes serogrupos de meningococo, observando que esta se encuentra en todos ellos. Además esta proteína Ctr A es una reminiscencia de otras proteínas conservadas en diferentes especies de *Neisseria* como *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*

En cuanto a la importancia de encontrar la OMP A en las muestras de vesículas de *P. multocida* y que haya sido reconocida por casi todos los sueros, se puede remitir a lo siguiente: i) las OMP constituyen un mecanismo importante para la colonización del hospedero además de servir como vehículos de diversos compuestos útiles para la comunicación, resistencia o para la colonización misma (Kadurugamuwa y Beveridge, 1995; Kuehn y Kesty 2005; Amano 2010; Ellis *et al*, 2010; Mashburn-Warren y Whiteley, 2006; y Negrete-Abascal *et al*, 1999, 2000, etc.) ii) se ha visto que esta OMP favorece la adhesión de la bacteria a la célula hospedera gracias a que puede unir la fibronectina y heparina de la matriz extracelular (Dabo *et al*, 1996). A pesar de esto el rol de esta proteína en la patogenicidad e inmunidad se encuentra aun bajo estudio.

iii. Suero Anti-Proteasa de *A. pleuropneumoniae*

Por otra parte, al querer corroborar que las demás muestras de vesículas además de Pm 43020 y C-44, poseían actividad proteolítica se realizó el reconocimiento de las cinco muestras de vesículas con este suero anti-proteasas, el cual evidencio que a pesar de no mostrar degradación, todas las

cepas presentan una proteasa de aproximadamente 37 kDa, este resultado concuerda con lo reportado por Negrete-Abascal *et al.* (2000) quienes tampoco observaron la acción de las proteasas, sin embargo la presencia de estas se puso en evidencia por medio de un inmunoreconocimiento con un suero dirigido contra las proteasas de *A. pleuropneumoniae*, el cual indico que las proteasas se encontraban pero en estado inactivo.

Dicho estado inactivo puede explicarse por lo observado por Kadurugamuwa y Beveridge (1997) quienes vieron que la elastasa presente en las OMV's de *P. aeuroginosa*, al translocarse en la membrana y llegar al periplasma se encuentra en un estado de pro-enzima, carente de actividad, por lo cual podemos suponer que en las proteasas presentes en las OMV's de Pm 43017, C-35 y 12948 sucede un proceso similar.

iv. Suero contra una proteína de 13 kDa de *G. anatis*

Como hemos visto, el primer paso para el desarrollo de la infección por parte de un organismo patógeno, comienza con la adhesión de esta a la célula hospedera por medio de diferentes mecanismos, entre ellos la producción de fimbrias.

Las fimbriae o pili juegan un importante rol en la virulencia de patógenos tales como *E. coli*, *P. aeuroginosa*, *S. entérica* y *N. gonorrhoeae*. Estos apéndices, se encuentran en la superficie con un tamaño de 1 a 20 micras de longitud anclados en la membrana externa, que a menudo se presentan en grandes números alrededor de todo el perímetro celular y, a veces, de inserción polar en bacterias Gram negativas, además por su naturaleza proteica poseen propiedades antigénicas y hemoaglutinantes (Salgado, 2011).

En el caso de *P. multocida*, se han descrito fimbriae de tipo IV para los serogrupos A, B y E donde se observo que estos apéndices favorecían la adhesión al tejido epitelial y favorecía el proceso infeccioso (Ruffolo, *et al.* 1996)

En este trabajo pudimos observar que todas las muestras de vesículas presentaron reacción cruzada para una proteína de aproximadamente 37 kDa con un anticuerpo policlonal generado a partir de una proteína de 13 kDa de *G. anatis*, la cual mostro reconocimiento contra sueros de una fimbriae de *Salmonella* spp. y otro contra pili BFP tipo IV , concluyendo que correspondía a una pilina. Debido a lo reportado por Ruffolo y colaboradores (1996) y al reconocimiento observado, podemos suponer que los serogrupos empleados en este trabajo presentan fimbriae tipo IV y que

el hecho de encontrar una proteína de 37 kDa y no de 18 kDa como fue reportado, se puede deber a que la proteína encontrada probablemente corresponde a un agregado.

El hecho de encontrar dicho reconocimiento en OMV's puede ser de relevancia ya que señala a las OMV's como candidatas para generar una vacuna, por otra parte la presencia de estas proteínas en las vesículas se puede deber a dos cosas: primero a la simple naturaleza de las OMV's, ya que al originarse de la membrana externa, es normal encontrar componentes de esta, como las fimbriae, en las vesículas; y segundo debido a que la pilina de las fimbriae tipo IV son secretadas al medio, se podría inferir que estas proteínas quedaron atrapadas en las vesículas durante el proceso de secreción.

Existen trabajos que muestran que diversas bacterias secretan OMVs y estas pueden actuar como componentes de vacunas tales como *N. meningitidis* (Drabick et al., 2000), *A. paragallinarum* (Ramón, 2006), *Vibrio cholerae* (Schild, et al. 2008) entre otras.

Hasani, et al (2007) identificaron proteínas localizadas en la membrana externa de *P. multocida* mediante un análisis de bioinformática usando secuencias genómicas las cuales podrían ser candidatas como inmunógenos. Se clonaron los genes que codificaban estas proteínas y obtuvieron proteínas recombinantes. Entre estas se encuentra una proteína de peso muy similar a 35 KD, lo que nos indicaría que de forma natural las vesículas membranales de *P. multocida* la contienen y puede ser candidata como inmunógeno.

9. CONCLUSIONES

- ❖ Se lograron aislar vesículas membranales de un tamaño entre 50 y 250 nm de *P. multocida*
- ❖ Existen diferencias entre los perfiles proteicos, sobre todo en vesículas de membrana.
- ❖ Se comprobó que los diferentes serogrupos de *Pasteurella multocida* conservan proteínas entre si
- ❖ En las muestras de extractos totales, se visualizaron proteínas en el rango de 27 a 154 kDa; en muestras de OMV el rango fue de 15 a 100 kDa, mientras que en el de proteínas secretadas fue de 25 a 177 kDa , todas estas fueron detectadas mediante SDS-PAGE
- ❖ En las muestras de OMV's de Pm 43017 y 12948 se ve enriquecida una banda de aproximadamente 35 kDa
- ❖ Se observó actividad proteolítica en las muestras de 43020 y C-44, en el primero se evidenciaron bandas de 237 y 174 kDa, mientras que en el segundo se vieron tres bandas, una de 237, otra de 110 y la última de 65 kDa. Mientras que *P. multocida* 43017, C-35 y 12948 contienen proteasas en estado inactivo.
- ❖ Se encontraron proteínas inmunogénicas de OMVs que tuvieron reconocimiento con distintos anticuerpos, sobre todo una de 35 kDa.
- ❖ Se pudo observar reconocimiento cruzado de las muestras de OMV's contra un suero generado a partir de una proteína de 13 kDa de *G. anatis*, evidenciando proteínas de 37 y 27 kDa

10. BIBLIOGRAFÍA

- Amano A., H Takeuchi, N Furuta. (2010). Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions. *Microbe. Infect.* 10: 1-8.
- Barrett A. J. (1994). Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods. Enzymol.* 244: 1–15.
- Beher M., C. Schnaitman and A. Pugsley. (1980). Major heat-modifiable Outer Membrane Protein in Gram- Negative Bacteria: Comparison with the OmpA Protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 143: 906-913.
- Benitez, V. (2005). Caracterización estructural de las cápsulas de *Pasteurella multocida* tipos A y D en cepas de referencia. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- Beveridge T.J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 181: 4725–4733.
- Binet R., S. Létoffé, J.M Ghigo, P. Delepelaire and C. Wandersman. (1997). Protein secretion by Gram negative bacterial ABC exporters – a review. *Gen.* 192: 7-11.
- Bowland S.L and P.E Shewen (2000). Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *Can. Vet. J.* 41: 33-48.
- Boyce J.D and B. Adler. (2000). The Capsule is a Virulence Determinant in the Pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B: 2). *Infect. Immun.* 69: 1943-1946.
- Ciofu O., T.J Beveridge, J. Kadurugamuwa, J. Walther-Rasmussen, and N. Hoiby. (2000). Chromosomal betalactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob.Chemother.* 45: 9–13.
- Christie P.J y J.P. Vogel. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends. Microbiol.* 8:354-360.
- Dabo S.M, A.W Confer and G.L Murphy. (1996). Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. *Vet. Microbiol.* 54:167–83.
- Dabo S.M, A.W Confer and R.A Quijano-Blas. (2003). Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microbial. Pathogen.* 35: 147-157.
- De Alwis M.C.L. (1999). Haemorrhagic Septicaemia. ACIAR Monograph. Canberra, Australia. pp 83.

- Drabick J., B. Brandt, E. Moran, N. Saunders, D. Shoemaker and W. Zollinger. (2000). Safety and immunogenicity testing of an intranasal group B meningococcal native outer membrane vesicle vaccine in healthy volunteers. *Vaccine*. 18: 160-172.
- Ellis T.N and M.J Kuehn. (2010). Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 81-94.
- Frosch M., D. Müller, K. Bousset and A. Müller. (1991). Conserved Outer Membrane Protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. *Infect. Immun.* 3: 798-903.
- Goedhart J., H. Rohrig, M.A Hink, A. Van Hoek, A.J Visser, T. Bisseling, and T.W Gadella Jr. (1999). Nod factors integrate spontaneously in biomembranes and transfer rapidly between membranes and to root hairs, but transbilayer flip-flop does not occur. *Biochem.* 38: 10898–10907.
- Gonzalez-Pedrajo B y G. Dreyfus. (2003). Sistemas de Secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia En : Mensaje Bioquímico. Vol 27. 45-63.
- Guadarrama G., L. León, M. Alonso, R. Montes de Oca, P. Fernández. (2009). Evaluación de la capacidad inmunogenica y protectora de antígenos de *Pasteurella multocida* obtenidas de aislados de casos clínicos. *Vet. Méx.* 41: 101-110.
- Henderson I.R., F. Navarro-García, y J.P. Nataro. (1998). The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends. Microbiol* 6: 370-378.
- Henderson I.R, G.F Navarro, M. Desvaux, R.C Fernández, D Ala'Aldeen. (2004). TypeV protein secretion pathway: the auto-transporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 692-74
- Hueck C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mo.l Biol. Rev.* 62: 379-433.
- Kadurugamuwa J.L and T.J Beveridge. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* 177: 3998–4008.
- Kadurugamuwa J.L and T.J Beveridge. (1996). Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J. Bacteriol.* 178: 2767–2774.
- Kadurugamuwa J.L and T.J Beveridge. (1997). Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 615-621.

- Koneman E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, W.C. Winn. (2001). Diagnóstico Microbiológico. 5 ed. Panamericana. Madrid, España. pp 1432.
- Koster M., W. Bitter and J. Tommassen. (2000). Protein secretion mechanisms in Gram negative bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 325-331.
- Kuehn M.J. and N.C Kesty. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 19: 645-265.
- Lee V.T. and O. Schneewind. (2001). Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev.* 15: 1725-1752.
- Li Z., A.J Clarke and T.J Beveridge. (1996). A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: subcellular distribution, potential role in cell growth and division and secretion in surface membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 178: 2479–2488.
- Luna, R.M.J. 2003. Clonación del gen y caracterización parcial de una proteasa de *Pasteurella multocida*. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
- MacDonald K.L and T.J Beveridge. (2002). Bactericidal effect of gentamicin-induced membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on Gram-positive bacteria. *Canadian J. Microbiol.* 48: 810–820.
- Macnab R.M. (1999). The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *J. Bacteriol.* 181: 7149-7153.
- Mahasreshti P, G. Murphy, J. Wyckoff III, S. Farmer, R. Hancock and A. Confer. (1997). Purification and Partial Characterization of the OmpA Family of Proteins of *Pasteurella haemolytica*. *Infect. Immun.* 65: 211-218.
- Mashburn-Warren L.M and M. Whiteley. (2006). Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 61: 839-846.
- Mashburn-Warren L.M, R.J.C Mclean and M. Whiteley. (2008). Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. *Geobiol.* 6: 214-219.
- Negrete-Abascal E, V.R Tenorio, A.L Guerrero, R.M García, M.E Reyes and M De la Garza. (1998). Purification and Characterization of a Proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1, An antigen Common to All the Serotypes. *Can. J. Vet. Res.* 62: 183-190.
- Negrete-Abascal E, V.R Tenorio and M. De la Garza (1999) Secretion of Proteases from *Pasteurella multocida* Isolates. *Curr. Microbiol.* 38: 64-67.
- Negrete-Abascal E, R.M Garcia, M.E Reyes, D. Godínez y M. De la Garza. (2000). Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 191: 109-113.

- Parsek M.R, and E.P Greenberg. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 8789–8793.
- Patriarca, E.J, R. Tate, and M. Laccarino. (2002). Key role of bacterial NH₄(+) metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 203–222.
- Ramón, R.M.O. (2005). Obtención y caracterización de vesículas de membrana de *Haemophilus paragallinarum*. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Ramón M.O., O. García-González, A. Pérez-Méndez, J. Ibarra-Caballero, V. Pérez-Márquez, S. Vaca, E. Negrete-Abascal. (2006). Membrane vesicles released by *Avibacterium paragallinarum* contain putative virulence factors. *FEMS Microbiol. Lett.* 257: 63-68.
- Rao M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge and V.V. Desaphande. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. And Mol. Bio. Rev.* 62: 597-635.
- Ruffolo C.G., J.M. Tennent, P. Wojtek and B. Adler. (1997). Identification, Purification, and Characterization of the Type 4 Fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 65: 339-343.
- Salgado, L. M. (2011). Identificación de fimbrias de *Gallibacterium anatis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala
- Schild S., E.J. Nelson and A. Camilli. (2008). Immunization with *Vibrio cholerae* Outer Membrane Vesicles Induce Protective Immunity in Mice. *Infect. Immun.* 76: 4554-4563.
- Simeone R., D.Bottai, R.Brosch. (2009). ESX/typeVII secretion systems and their role in hoste pathogen interaction. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:4-10.
- Sonntag I., H. Schwarz, Y. Hirota and U. Henning. (1978). Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* 136: 280-285.
- Taylor D.J. (1995). Progressive Atrophic Rinitis. In: Pigs Diseases. Sixth edition. 179-185
- Thanassi D.G. and S.J. Hultgren. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Op. Cell. Biol.* 12: 420-430.
- Verma R. and T.N Jaiswal. (1998). Haemorrhagic septicaemia. *Vaccine.* 16: 1184-1192.
- Wai S.N, B. Lindmark, T. Soderblom, A. Takade, M. Westermark, J. Oscarsson, J. Jass, A. Richter-Dahlfors, Y. Mizunoe, and B. E. Uhlin. (2003). Vesicle-mediated export and

assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*. 115: 25–35.

- Weiser, J.N. and E.C Gotschlich. (1991). Outer membrane A OmpA contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect. Immun.* 59: 2252-2258.