

IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS INDUCIDAS POR CHOQUE OSMÓTICO EN EXTRACTOS MEMBRANALES DEL *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1.

Hernández Ortega L., Ponce Hernández C., Mendoza Elvira S.E., Romero Rojas A.
Laboratorio 8, Biología Molecular, Coordinación de Estudios de Posgrado Campo 1, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, U.N.A.M., Av. 1o. de Mayo S/N, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, C.P. 54700.

La neumonía en el cerdo representa uno de los más graves problemas infecciosos de esta especie animal. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Ap) es el agente etiológico de la pleuropneumonía contagiosa porcina (PCP). Este es un padecimiento de distribución mundial que impacta negativamente a la economía de las granjas afectadas por la elevada mortalidad de los animales en crecimiento. Los sobrevivientes son portadores asintomáticos que infectan a otros puercos y que tienen una baja conversión alimenticia (1,2). Es difícil controlar la propagación de la PCP, debido a que no hay formas sensibles y específicas para determinar exactamente si hay o no cerdos infectados en una piara, siendo el medio más frecuentemente de propagación de la enfermedad la transmisión directa de un cerdo infectado a uno susceptible a través posiblemente de aerosoles (2,3). Tratando de dilucidar las características antigénicas del Ap se han realizado estudios de la cápsula (4), el lipopolisacárido (5) y la hemolisina (6), no obstante es poco lo que se sabe de las proteínas de membrana. Nicolet (7) realizó por primera vez el estudio de las proteínas que se encuentran en la membrana celular del Ap por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida y encontró que los patrones de estos serotipos eran iguales concluyendo que la diferencia entre los serotipos se encontraba en la cápsula. Rapp y Ross (8) retomaron la técnica para estudiar las membranas de esta misma bacteria pero hicieron modificaciones importantes en la forma de obtener las membranas. Rapp y MacInnes (9, 10) establecieron en trabajos diferentes la presencia de proteínas inmunogénicamente importantes. En 1989, Romero y col., (11) demostraron la presencia de 4 proteínas comunes en preparados de membranas del Ap serotipos 1,2,5 y 7. Estas proteínas se presentaron consistentemente en trabajos recientes que han establecido la presencia de proteínas de estrés (12,13) de las cuales hay poca información. Inmediatamente después de un aumento de temperatura, todas las células incrementan la producción de cierta clase de moléculas que equilibren el daño. Se llamó a esto respuesta al choque térmico, estudios posteriores revelaron que la misma respuesta toma lugar cuando las células son sujetas a una amplia variedad de agresiones ambientales, incluyendo metales tóxicos, alcoholes y muchos venenos metabólicos. (14, 15) debido a que varios estímulos diferentes despiertan el mismo mecanismo de defensa celular ahora se conoce a esto como respuesta al estrés y a las moléculas expresadas como proteínas de estrés o de choque. La concentración osmótica del medio ambiente es uno de los parámetros físicos que determina la habilidad de los organismos de proliferar en un habitat determinado. Por estrés osmótico se entiende el incremento o disminución en la concentración osmótica del medio ambiente de un organismo y osmoregulación se define como el proceso activo llevado a cabo por los organismos para hacer frente al estrés osmótico(16). Se sabe que la *E. coli* se ajusta a una presión osmótica elevada incrementando los niveles citoplasmáticos de prolina, además de otras alteraciones en la composición de porinas de membrana externa(17) y de los niveles de oligosacáridos derivados de membrana.

El OBJETIVO de este trabajo es el determinar la presencia de proteínas de choque osmótico en extractos enriquecidos de membranas de *A. pleuropneumoniae* sometido altas y bajas concentraciones de sales, para su posterior clonación y posible uso como inmunógenos y/o en sistemas de diagnóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Cepas. El Ap1 fue donado por la Dra. Susana Mendoza Elvira del Laboratorio de Virología de la Coordinación de Posgrado de la FES-C., UNAM.

Inducción de la Expresión de Proteínas de Choque Osmótico. Se inocularon cajas de agar BHI + NAD con Ap1 y se incubaron 24h/37°C. se cosecharon con Sol. Amortiguadora de Fosfatos pH=7.4, se centrifugaron y lavaron a 3,000 rpm/15min. Después se preparó una suspensión de bacterias al tubo No.8 McFarland y se agregó 10ml de esta a 3 matraces Erlen Meyer con 40ml de caldo nutritivo con NAD conteniendo diferentes concentraciones de NaCl (0.5%, 0.85% y 1%). Incubándose cada matraz diferentes tiempos (30min, 1 y 2h) a 37°C.

Obtención de Extracto Membranal. Una vez concluido el tiempo de incubación. Las bacterias se centrifugaron 30min/3,000rpm y se sonicaron (3x60Hz/5min). Después de esto las suspensiones fueron primero centrifugadas a 4,000rpm/15min para eliminar cualquier célula completa. Posteriormente los lisados se centrifugaron a 20,000rpm/1h. Se eliminaron los sobrenadantes y se trabajó con las pastillas. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Electroforesis de los Extractos Membranales. Se empleó un sistema de geles discontinuos de acuerdo al procedimiento de Laemmli (18).

Inmuno-electrotransferencia. Se utilizó una modificación de la técnica de Towbin y col. (19) para enfrenar los patrones electroforéticos de los extractos membranales de Ap sujeto a choque osmótico durante diferentes periodos de tiempo.

RESULTADOS. En el patrón electroforético del extracto membranal del Ap1 incubado por 30min a las diferentes concentraciones de NaCl se observa la presencia de bandas comunes en cada uno de los carriles los cuales tienen un peso molecular aproximado de 99.38, 93.17, 71.97, 40.26, 30.12, 16.85 y 11.81 kDa. Aparentemente no se observan cambios entre cada extracto. sin

embargo es común el incremento en todos con excepción del carril sin NaCl. de las proteínas con PM de 93.17, 69.7, 57.42, 55.60, 52.12, 47.31, 44.39, 16.85, 13.44, 11.81 y 11.44 kDa. Además de esto se observa que por el contrario otras de las bandas tienden a disminuir en intensidad, dichas bandas corresponden a proteínas de PM aproximados de 65.33 y 37.75. En el patrón electroforético del extracto membranal del Ap1 expuesto 1 hr a las diferentes condiciones de NaCl, se observa también bandas comunes en cada carril con PM aproximado de 99.38, 93.17, 71.97, 40.26, 30.12, 16.85 y 11.88kD. En este tiempo de exposición se observa el incremento en la intensidad de todos los carriles con excepción del 0% de las proteínas de PM de 57.42, 52.12, 40.26, 37.75 y 28.23. Además de estas, se observan las siguientes bandas de PM 65.33, 40.26, 13.88, 13.44 y 11.44 que por presentarse más intensamente en las condiciones de choque son candidatas a ser consideradas proteínas de choque osmótico. Al tiempo de exposición de 2hr se observa la igual que en los anteriores casos la presencia de bandas comunes a todos los carriles con PM aproximado de 99.38, 93.17, 71.97, 40.29, 30.12, 16.31 y 11.44. Sin embargo a este tiempo de exposición no se observa el incremento o disminución en la intensidad de las bandas observadas en los diferentes carriles y si la falta de algunas de ellas. Esto es posiblemente debido a que a este tiempo de exposición varias de las proteínas comienzan a desnaturalizarse.

La siguiente tabla resume los pesos moleculares de las proteínas que fueron reconocidas por sueros de cerdo en las inmuno-electrotransferencias.

PATRON ANTIGENICO DE PROTEINAS [] EXTRACTOS MEMBRANALES OBTENIDOS DE CÉLULAS CON CHOQUE OSMÓTICO								
30 MIN			1hr			2hr		
0.5%	0.8%	1%	0.5%	0.8%	1%	0.5%	0.8%	1%
99.38	99.38	99.38	99.38	99.38	99.38	99.38	93.17	99.38
40.26	93.17	93.17	93.17	65.33	40.26	93.17	71.97	93.17
37.75	71.97	87.34	87.34	40.26	30.12	71.97	69.7	71.97
30.12	69.7	71.97	71.97	30.12	26.47	55.6	30.12	69.7
28.23	40.26	69.7	57.42	26.47	24.03	13.88	28.23	40.26
16.85	37.75	55.6	40.26	24.03	16.85		26.47	37.75
13.88	30.12	52.12	30.12	16.85	13.87		24.03	30.12
	28.23	40.26	16.85	13.88			16.31	28.23
	16.85	37.75					11.81	
	13.88	30.12					11.44	
		28.23						
		16.85						
		13.44						
		11.81						
		11.44						

CONCLUSIONES. 1) Los patrones electroforéticos de extractos membranales se intensificaron cuando las bacterias se mantuvieron en condiciones de choque. 2) Se encontraron proteínas que son candidatas a ser consideradas como proteínas de choque de 65.33,40.26, 13.88, 13.44 y 11.44. 3) Las proteínas de choque fueron reconocidas en casi todos los sueros de cerdos positivos a *A. pleuropneumoniae* probados.

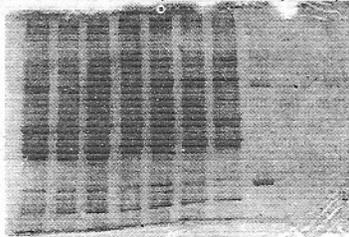


Figura 1. Patrón electroforético de extractos membranales de Ap1 sometido a choque osmótico:

carril 1: 1%NaCl/1h
carril 2: 0.85%NaCl/1h
carril 3: 0.5%NaCl/1h
carril 4: 1%NaCl/30min
carril 5: 0.85%NaCl/30min
carril 6: 0.5%NaCl/30min
carril 7: 0%NaCl
carril 8: Marcadores de PM

BIBLIOGRAFIA.

- Herrera G. y col., (1995). Rev. Lat-Amer. Microbiol., 37:147-152.
- Negrete E. y col., (1994). Arch. Med. Res. 25:229-233
- Willson P. y col., (1987). Can. Vet.J. 28:111-116
- Altman E. y col., (1987). Eur. J. Biochem. 170:185-192
- Maudsley J. y col., (1986). Inf.Imm. 51:501-506
- Kume K. y col., (1986). Inf.Imm. 51:563-579
- Nicolet J. y col., (1980). Int.J.Sys.Bact. 30:1
- Rapp V., y col., (1986). Inf.Imm. 52:414-420
- MacInnes J. (1987). Inf.Imm. 55:1626-1634
- Rapp V. y Ross R. (1986) Inf.Imm. 54:751-760
- Romero R.A. (1989). Tesis de Maestría, FES-C, UNAM.
- Gutierrez R. (1995). Tesis de Licenciatura, FES-C, UNAM.
- Ramirez R.E. (1996). Tesis de Licenciatura, FES-C, UNAM
- Lucassen y col. (1994). SignalImmunes No.12 p1-3.
- Welch W.J. (1993). Sci. Am. p. 56-64.
- Csonka L.N., (1989) Microb. Rev. 53:121-147
- Le Rudulier D., y col., (1984) Science 224:1064-1066
- Laemmli U.K. (1970). Nature 227:680-685
- Towbin H. y col., (1979). Proc.Natl.Acad.Sci. 76:4350-4353