

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO DE *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Camacho J¹, Hernández E¹, Miranda R², Sotres F¹, Alonso R², Lara H³, Serrano L¹, Trujillo D¹, González S¹ Ciprián A¹ y Mendoza S¹

¹Facultad de Estudios Superiores Cuautlán-UNAM; ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM, ³Laboratorios Avi-Mex, SA de CV. México. Grants: PAPIIT ITE218711-3 and CONS-23 jecm_iztla@yahoo.com.mx, Beca CONACYT No. 447624

Introducción.

Mycoplasma hyopneumoniae (M. hyop.) es el agente etiológico de la neumonía enzoótica y se considera patógeno primario del complejo respiratoria de los cerdos; un complejo multifactorial de las enfermedades respiratorias crónicas con muchas fases aún desconocidas, asociados con importantes pérdidas económicas a los productores de cerdos de todo el mundo (1,5). En los últimos tiempos se ha informado de numerosas proteínas de *M. hyop.* con peso molecular variable (p7413, p7048, p6523, p4026, P467, P159, P102, p97, p89, p74, p72, p70, p65, p60, p46 p54, p42, p41, p36 kDa.), en la membrana celular, citosol y se ha demostrado que es capaz de secretar algunas proteínas al medio de cultivo líquido. Estas proteínas tienen diferentes actividades biológicas, algunos son adhesinas, capaces de causar efecto citopático y / o actividad inmunológica (1,7,9). Aún se desconoce diferentes actividades biológicas de las proteínas de membrana y de secreción, por tal motivo es de gran importancia seguir realizando investigación sobre estas proteínas para comprender a este agente etiológico.

Material y Métodos.

La cepa de referencia de *M. hyop* (cepa J, NCTC 10110) se utilizó en este estudio y se cultivó en caldo Friis (6) El número de organismos viables se determinó mediante una serie de diluciones decuples en caldo Friis y el título se expresa en unidades de cambio de color (UCC). Se realizó 800 ml. de caldo Friis el cual se dividió en dos matraces de 400 ml cada uno, uno de ellos se inoculó con 10⁵ UCC / 5 ml. y se tomaron 8 ml. del medio a los 3,5,7,9,11,13,15,17,19 y 21 días de crecimiento tanto del medio inoculado como del no inoculado. Cada muestra se centrifugó a 30.000 g durante 30 minutos para la obtención del sobrenadante y se filtraron en tres ocasiones en sensidisco de .22 µ para la eliminación por completo del Mycoplasma, para la cuantificación de proteínas en el sobrenadante se utilizó el método de Bradford (4), la curva de calibración se realizó con albúmina sérica bovina una concentración de 0.1 mg/ml, utilizando el reactivo de Bradford.

A las muestras se les realizó SDS-PAGE siguiendo la metodología de Laemmli (8) utilizando como agente reductor 2-mercaptoetanol, las muestras se corrieron en los geles a las concentraciones de 7.5%, 10%, 12%, 12.5%, 15% y 20% de acrilamida, cada gel se realizó por

duplicado, un gel de cada concentración fue teñido con solución de azul de Coomassie R-250 en agitación constante, y los geles de cada concentración restantes fueron utilizados para WESTERN BLOT (8,13) en donde las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (inmobilon-P Millipore) y utilizando como solución reveladora 4-cloro-1-Naphtol.

Al detectar las proteínas de interés se realiza un semipurificación mediante tubos con filtro para centrifuga, concentrando proteínas con un peso molecular menor a 100 kDa. con las cuales se desafiaron cultivos celulares de MDCK, de igual manera se desafiaron células mononucleares aisladas de sangre periférica mediante gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque y marcadas con Carboxy-Fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester fueron (CFSE), el análisis se realizó mediante el citofluorómetro FACScan que utiliza el Programa Cell Quest.

Resultados.

Mediante SDS-PAGE no se logró evidenciar alguna diferencia en los patrones electroforéticos, por lo que se realizó WESTERN BLOT, demostrándose dos proteínas de secreción inmunogénicas con un peso aproximado de 80 y 42 kDa. Con las cuales se desafiaron cultivos celulares de MDCK evidenciando efecto citotóxico en la primera y segunda dilución, en células mononucleares no lograron provocar una estimulación clonal por lo que se descarta la actividad mitogénica.

Conclusiones y discusión.

Estos resultado son similares a lo reportado por Assuncao en el 2005, solo que ellos trabajaron con células completas de *M. hyop.* Okada (11) demostró mediante SDS-PAGE Y WESTERN BLOT que este agente secreta proteínas al medio de un peso molecular similar. El efecto citopático demostrado con las proteínas de secreción concuerda con lo reportado por Geary (7) en donde demostraron que *M. hyop.* presenta una proteína de membrana con efecto citotóxico demostrado en fibroblastos de pulmón de cerdo y en fibroblastos de pulmón humano.

Cole (5) reporta que *Mycoplasma arthritis* secreta un potente mitógeno de células T, esto lo demostraron mediante marcaje metabólico, evidenciando el aumento en la captación de [³H] timidina en células estimuladas mediante autoradiografía. Atkin (3) y Messier (10)

reportan que las membranas de *Mycoplasma hyopneumoniae*, presentan un factor estimulador inespecífico de linfocitos en cerdo, lo que podría justificar las lesiones que genera este agente, por lo que se decidió realizar el desafío de células mononucleares de sangre periférica de cerdo con el filtrado, con el objetivo de poder demostrar actividad mitogénica en estas proteínas inmunogénicas. En este proyecto no detecto alguna proteína mitogénica. Sin embargo este estudio fue preliminar y existen varias metodologías de purificación para obtener más proteínas de sobrenadante y seguir en la búsqueda de una proteína mitogénica

Referencias.

1. Andrada *et al.*, (2002). Porci, ISSN 1130-8451, N°. 74, 2003 P. 31-45
2. Assuncao *et al.*, (2005). Vet Res. Communications 29 563-574
3. Atkin *et al.*, (1986). Journal Immunology. 137(5):1581-1589.
4. Bradford M. M. (1976) Analytical Biochemistry. 72:248-254
5. Cole *et al.*, (1996). Journal Experimental Medicine. 183:1105-1110.
6. Friis, N.F. (1975) Nordisk veterinaer medicine 27, 337-339.
7. Geary *et al.*, (1983). Inf. And Imm. 48(2): 576-578.
8. Laemmli (1970). Nature (London) 227, 680±685.
9. Maglennon *et al.*, (2013). Vet Res. 21;44(1):124.
10. Messier *et al.*, (1991). American Journal Research. 52:1497-1502
11. Okada *et al.*, (2000).. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. Sep;47(7):527-33.
12. Raymond *et al.*, (2013). J Proteome 6;12(12):5891-903. doi: 10.1021/pr400903s.
13. Towbin *et al.*, (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4350±4354.
14. Zhang *et al.*, (1994). Infect. Immun 62 (10): 4367-4373.