BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

CICM-ICUAP-BUAP

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

Evaluación de la ENOLASA RECOMBINANTE DE *Haemophilus influenzae* como un factor de virulencia Y SU POTENCIAL USO PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS MICROBIOLOGÍCAS

CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

M.C. Yesenia Osorio Aguilar

ASESOR DE TESIS:

D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia

COASESOR DE TESIS

D.C. Alejandro Carabarín Lima

PUEBLA, PUE. **MAYO 2023**

Puebla, Pue. a 20 de abril 2023.

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado de la alumna **Yesenia Osorio Aguilar,** les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Evaluaciòn de la enolasa recombinante de *Hemophilus Influenzae* como factor de virulencia y su potencial uso para el desarrollo de una vacuna"

A nuestro juicio, la alumna **Yesenia Osorio Aguilar** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

A t e n t a m e n t e.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. Patricia Lozano Zarain

D.C. Alberto Ramìrez Mata

D.C. Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernàndez

D.C. Cèsar Raùl Gonzàlez Bonilla

D.C. Marìa Lilia Cedillo Ramìrez

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento está dirigido principalmente a quienes han forjado mi camino y me han dirigido por el sendero correcto, estas personas son mis padres y mis hermanos; gracias por el apoyo y el amor incondicional que siempre me han brindado a lo largo de la vida y mi carrera profesional; gracias por estar siempre presentes, por ser una fuente de inspiración y por alentarme día a día a seguir superándome tanto en lo personal como en lo profesional, a pesar de los obstáculos que se me han presentado e inclusive el hecho de llegar a decir “ya no quiero, ya puedo más”, su confianza y su apoyo me han dado la fortaleza para seguir adelante paso, a paso para lograr mis objetivos. Y bueno, he aquí, la prueba fehaciente de que, con esfuerzo, amor, dedicación y el apoyo correcto, todo se puede. Gracias infinitas, Mamá, Papá, Emily, Viol, Pao y Dani; esta tesis es para ustedes.

¡Pao!, prometiste que tú sí leerías mi tesis, aunque no la entendieras porque a diferencia de mis artículos esta sí está en español, te preguntaré más adelante (ja, ja, ja, ntc, es broma hermanita).

También quiero dedicar esta tesis con mucho cariño a todos mis sobrinitos, a mis cuñados (Mario, Fer y Migue) y claro, no podía faltar mi “panterita”; mi gatito negro que siempre está acostadito a lado mío haciendo compañía.

Por otra parte, quiero agradecer de manera especial a mis asesores, la Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia y el Dr. Alejandro Carabarin Lima. Dra. Rosy muchas gracias por confiar en mí y por haberme dado la oportunidad de seguir trabajando con usted y formar parte de este proyecto. Gracias por el tiempo brindado, por su disposición, además de sus palabras de aliento y motivación para seguir adelante; en verdad estoy muy agradecida de haber tenido a una asesora como usted, siempre amable y dispuesta a enseñarme y orientarme de la mejor manera.

Ale, muchas gracias por el apoyo inmenso que me has brindado, valoro mucho todo lo que me has enseñado en este tiempo, gran parte de los conocimientos que hoy poseo y que me guían como profesional, los he adquirido gracias a ti; a la dedicación y al esfuerzo que has realizado para transmitirme tu conocimiento en mis días como estudiante de posgrado. No tengo suficientes palabras para expresarte lo que tus

enseñanzas significan para mí; gracias por confiar en mí y por permitirme formar parte de este proyecto, el cual me llena de orgullo y satisfacción.
Gracias a ambos, son unos excelentes asesores, porque a pesar de las circunstancias que vivimos con lo de la pandemia, supieron guiarme para poder sacar adelante este proyecto.
A la Dra. Patricia Lozano Zarain, por su amable colaboración, por el apoyo y asesoría en este proyecto. Gracias Dra. Paty por siempre cuestionarme de las cosas que decía, porque gracias a ello me alentaban a ir más allá. Al Dr. Alberto Mata, el Dr. Cesar González, la Dra. Lili Cedillo, la Dra. Margarita Arenas, por su orientación y valiosas aportaciones hacia el proyecto.
También quiero agradecer infinitamente a la Dra. María Cristina González Vázquez, ¡Cris!, este logro en gran parte también se debe a ti; ya que siempre estuviste ahí, al lado mío, asesorándome, apoyándome y dándome consejos. Muchas gracias por ser mi compañera y amiga del laboratorio.
De manera especial, dedico esta tesis a Diana Elizabeth Hernández Cerón (mi alumna de laboratorio), que a pesar de que la vida nos la arrebató tempranamente, quiero mencionar que fue parte fundamental en este proyecto, Dianita, en donde quiera que estés, muchas gracias por tu apoyo, y ¡Esta tesis también es tuya!
A todos mis compañeros y amigos de laboratorio por hacer de nuestro lugar de trabajo un lugar lleno de compañerismo y amistad. Ger, Elena, Jesica, María y todos con los que en algún momento conviví.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A CONACYT por la beca que me proporciono (No. de Becario 675961), porque gracias a ello, fue posible la realización de este proyecto y mi estancia en el Laboratorio Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad.
Al CICM-BUAP por la oportunidad de seguir adelante en mi formación académica y por el gran apoyo brindado durante este tiempo.

INDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	**1**
1. *Haemophilus influenzae*	**1**
1.1. Características generales	1
1.2. Clasificación	1
1.3. Epidemiología	2
1.4. *Haemophilus influenzae no tipificable*	2
1.5. Patogénesis	3
2. Proteínas *moonlighting*	**4**
3. Una proteína multifuncional: Enolasa	**5**
4. ANTECEDENTES	**8**
4.1. Antecedentes generales	8
4.2. Antecedentes directos	11
5. JUSTIFICACIÓN	**12**
6. OBJETIVO GENERAL	13
7. DIAGRAMA DE TRABAJO	**14**
8. MATERIALES Y MÉTODOS	**15**
8.1. Material biológico utilizado	15
8.2. Cultivo de cepas	16
8.3. Análisis *In silico*	16
8.3.1. Alineamiento de enolasas	16
8.3.2. Modelado por homología de NTHiENO	17
8.3.3. Obtención de estructura cristalizadas	17
8.3.4. Análisis de acoplamiento molecular	17
8.3.5. Docking molecular de NTHiENO-Plasminógeno	18
8.3.6. Obtención del motivo de unión a Plg (pbmHiENO)	18
8.3.7. Blind Docking pbmHiENO-Plasminógeno	19
8.3.8. Docking molecular de controles positivos	19
8.3.9. Docking molecular de NTHiENO con MEC	20
8.3.10. Predicción de propiedades inmunogénicas de NTHiENO	20
8.4. Purificación de la enolasa recombinante de *H. influenzae*	21

8.5. Obtención de proteínas plasmáticas humanas 22
8.6. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford 22
8.7. Obtención de anticuerpos policlonales anti-Plg 23
8.8. Determinación de la interacción Proteína-Proteína por Far-Western Blot 23
8.9. Detección de la interacción e inhibición de rEnoHi-Plg por ELISA 24
8.10. Detección de la interacción de rEnoHi-MEC por ELISA 25
8.11. Inmunización de rEnoHi con *H. influenzae* en un modelo murino 25
8.12. Identificación de la enolasa de *H. influenzae* por Western Blot 26
8.13. Determinación del isotipo de anticuerpos mediante ELISA 26
8.14. Determinación de anticuerpos opsonizantes por inmunofluorescencia. 27
8.15. Análisis de los datos 27
***9.* RESULTADOS 28**
Objetivo: Determinar del papel de la enolasa como un posible factor de virulencia de *H. influenzae*
9.1. Purificación de rEnoHi 28
9.2. Interacción de rEnoHi con proteínas plasmáticas 29
9.3. Interacción de rEnoHi con Plasminógeno humano 31
9.4. Modelado de la estructura de la enolasa de *H. influenzae* *33*
9.5. Acoplamiento molecular de NTHiENO y Plg 36
9.6. Identificación del dominio putativo de unión al plasminógeno en NTHiENO 37
9.7. Obtención del Péptido pbmHiENO 38
9.8. Acoplamiento molecular de pbmHiENO- Plg 39
9.9. Análisis de acoplamiento en controles positivo 41
9.10. Modelado de la estructura dimérica NTHiENO 42
9.11. Acoplamiento molecular de NTHiENO- Colágeno 45
9.12. Residuos involucrados en la interacción NTHiENO-Cln I 47
9.13. Residuos involucrados en la interacción NTHiENO- Cln III 49
9.14. Interacción de rEnoHi con Colágeno 51
9.15. Acoplamiento molecular de NTHiENO- Fibronectina 54
9.16. Residuos involucrados en la interacción NTHiENO- Fibronectina 54
9.17. Interacción de rEnoHi con Fibronectina 56
Objetivo: Caracterizar la respuesta inmune de la enolasa de *H. influenzae*
9.18. Predicción de epítopos para células B y T y su asociación a los HLA 57

9.19. Predicción de antigenicidad y alergenicidad de NTHiENO 59
9.20. Identificación de sitios de unión a ARN extracelular (exARN) 59
9.21. Obtención de anticuerpos policlonales en modelo murino 60
9.22. Identificación de la enolasa nativa de *H. influenzae* 60
9.23. Identificación del isotipo de anticuerpos generados por rEnoHi 62
9.24. Determinación de Ac opsonizantes 63

10. DISCUSIÓN 66
11. CONCLUSIONES 83
12. PERSPECTIVAS 84
13. BIBLIOGRAFIA 85
14. ANEXOS. 98

Índice de Tablas

Tabla	Título	Página
1	Cepas utilizadas	15
2	Resultados de Blind Docking para residuos de NTHiENO que se unen a los dominios *kringle* de plasminógeno.	41
3	Aminoácidos del plasminógeno que participan en la interacción pbmHiENO-Plg	41
4	Resumen de resultados de acoplamiento de controles positivos.	42
5	Resultados resumidos de las interacciones NTHiENO-Cln I.	46
6	Resultados resumidos de las interacciones NTHiENO-Cln III.	49
7	Resultados resumidos de las interacciones NTHiENO-FN.	56
8	Epítopos de CTL para diferentes supertipos de HLA predichos en NTHiENO	57
9	Motivos putativos de unión a exRNA identificados en NTHiENO	59

Índice de Figura

Figura	Titulo	Página
1	Expresión y purificación de rEnoHi visualizada a través de Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE) al 12%	28
2	SDS-PAGE 7.5 % de las proteínas totales de plasma humano.	30
3	Detección por ELISA de la interacción de rEnoHi con proteínas plasmáticas de humano utilizando anticuerpos policlonales anti rEnoHi.	30
4	SDS-PAGE 10% de la interacción de rEnoHi con Plasminógeno humano.	31
5	Ensayos de unión a plasminógeno.	32
6	Representación tridimensional del modelado por homología de la enolasa de *H. influenzae* obtenido por Phyre2 y visualizado por Chimera.	34
7	Acoplamiento proteína-proteína de NTHiENO y Plg humano por PatchDock.	36
8	Región correspondiente al motivo de unión al plasminógeno en diferentes enolasas.	37
9	Sitios de unión al plasminógeno (PDB ID: 4A5T) con pbmHiENO utilizando AutoDock Vina.	40
10	Estructura dimérica de NTHiENO obtenida por SWISS-MODEL y visualizada por Chimera.	44
11	Modelos de interacción del complejo NTHiENO-Colágeno por HDOCK.	46
12	Modelo de interacción del complejo NTHiENO-Cln I.	48
13	Modelo de interacción del complejo NTHiENO-Cln III.	50
14	Identificación de la interacción de rEnoHi a colágeno mediante Far Western Blot	52
15	Identificación mediante ELISA de la interacción de rEnoHi con colágeno.	53
16	Modelos de interacción del complejo NTHiENO-Fibronectina por HDOCK.	54
17	Modelo de interacción del complejo NTHiENO-FN.	55
18	Identificación de la interacción de rEnoHi a FN mediante ELISA	56
19	Predicción de epítopos de células T y B, en la secuencia de NTHiENO.	58
20	Inmunodetección mediante Western-Blot de rEnoHi (52kDa.) con anticuerpos policlonales anti rEnoHi.	60
21	Identificación de la enolasa nativa de *H. influenzae*	61

22	Isotipo de anticuerpos generados en ratones inmunizados con rEnoHi.	62
23	Determinación de anticuerpos opsonizantes contra HiNTBUAP96 mediante epifluorescencia.	64
24	Determinación de anticuerpos opsonizantes contra HibBUAPNAN mediante epifluorescencia.	65

Abreviatura	Significado
ΔG	Energía de afinidad
2-PGE	Fosfoenolpiruvato
2-PGE	2-fosfoglicerato
ACE	Energía de contacto atómico
Arg	*Arginina*
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
BHI	Agar infusión cerebro-corazón
BSA	Albumina Bovina Sérica
Cln I	Colágeno tipo 1
Cln III	Colágeno tipo 3
CO_2	Dioxido de carbono
CTL	Linfocitos T Citotóxicos
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
Fn	Fibronectina

Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
h	Horas
Hib	*H. influenzae* serotipo b
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HYP	Hidroxiprolina
IgG	Inmunoglobulina G
Kd	Constante de disociación
kDa	kiloDalton
Leu	Leucina
LOS	Lipooligosacáridos
Lys	Lisina
M	Molar
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramos
mL	Mililiitros
mM	milimolar
MP	Marcador de peso

NAD	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina
nm	Nanómetros
ns	No significativo
NTHi	*Haemophilus influenzae* no tipificable
NTHiENO	Enolasa de *Haemophilus influenzae* no tipificable
ºC	Grados centrigrados
OM	Otitis media
Pas	Factores activadores del plasminógeno
PBS	Buffer salino de fosfatos
PDB	Banco de datos de proteínas
Plg	Plasminógeno
Plm	Plasmina
Pp	Proteínas plasmáticas
Pro	Prolina
rEnoHi	Enolasa recombinante de H. influenzae
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Desviación cuadrática media
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estandar

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Ser	Serina
SSI	Solución Salina Isotónica
TA	Temperatura ambiente
Tyr	Tirosina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
Val	Valina
λ	Longitud de onda
µg	Microgramo
µL	Microlitro

RESUMEN

Haemophilus influenzae es un agente causal de enfermedades pediátricas invasivas, como meningitis, epiglotitis, neumonía, artritis séptica, pericarditis, celulitis y bacteriemia (serotipo b). Las cepas de *H. influenzae* no tipificable (NTHi) se asocian con infecciones localizadas, como otitis media, conjuntivitis, sinusitis, bronquitis y neumonía, y pueden causar enfermedades invasivas, como meningitis y sepsis en hospederos inmunocomprometidos.

La enolasa es una metaloenzima que cataliza la conversión reversible de 2-fosfo-D-glicerato (2-PGE) a fosfoenolpiruvato en la vía de la glucólisis, pero también juega un papel importante como proteína multifuncional, ya que puede estar presente en la superficie celular, donde actúa como receptor del plasminógeno (Plg), promoviendo su activación a plasmina activa, lo que favorece la degradación de los componentes de la matriz extracelular y por ende la diseminación sistémica de las bacterias en el hospedero. En este estudio, mediante ensayos de Far-Western Blot y ELISA, demostramos que la enolasa recombinante de *H. influenzae* (rEnoHi) interacciona con Plg de manera dependiente de concentración; además utilizando acoplamiento molecular, se identificaron tres residuos importantes en la enolasa de *H. influenzae*, involucrados en la interacción con los dominios kringle de Plg, correspondientes a enoTYR253-plgGLU1 (K2), enoTYR253-plgGLY310 (K3) y enoLYS255-plgARG471/enoGLU251-plgLYS468 (K5).

Igualmente, la enolasa ha sido reportada como una proteína de adhesión a componentes de la matriz extracelular en una gran variedad de microorganismos,

Mediante pruebas *in vitro*, se demostró que rEnoHi se une fuertemente al colágeno tipo I, y a fibronectina. A su vez, se identificaron los aminoácidos que podrían estar involucrados en la interacción de NTHiENO con colágeno tipo I, tipo III y fibronectina. La interacción de la enolasa de *H. influenzae* con el colágeno, fibronectina y plasminógeno podría tener un papel importante en el proceso de colonización e invasión del hospedero, esto permitiría a *H. influenzae* incrementar sus elementos de virulencia y fortalecer su patogenia.

Por otra parte, actualmente, no se dispone de una vacuna eficaz contra *H. influenzae* no tipificable, por lo que es importante encontrar un antígeno que sea capaz de conferir protección contra la infección por NTHi y por otros serotipos no b.

En este estudio, se identificó en la secuencia de enolasa 10 epítopos lineales para células B y 13 epítopos para CTL y su asociación a algunos HLA presentes en la población. Tanto los ensayos *in silico* como los ensayos experimentales demostraron que rEnoHi es altamente inmunogénica debido a que induce títulos de anticuerpos mayores a 1:80,000 y estimula principalmente la producción de anticuerpos policlonales de la clase IgG1 e IgG2a, en un modelo murino, lo que sugiere podría inducir una respuesta inmune Th1/Th2. Además, estos anticuerpos, reconocen a la enolasa nativa de cepas tipificables y no tipificables, y disminuyen significativamente la interacción de rEnoHi con el Plg, características importantes para ser considerado como un potencial candidato para el desarrollo de una vacuna contra las infecciones asociadas a *H. influenzae.*

Palabras clave: *Haemophilus influenzae,* enolasa, plasminógeno, MEC, virulencia, Docking, inmunógeno, vacuna.

INTRODUCCIÓN

1. Haemophilus influenzae

1.1. Características generales

Haemophilus influenzae pertenece a la familia Pasteurellaceae, es un cocobacilo Gram negativo, aerobio o anaerobio facultativo, pleomórfico y no móvil. Para su crecimiento *in vitro* requiere dos factores de crecimiento accesorios, el factor X (hemina) y el factor V (NAD) (Slack *et al.,* 2021). Crece de manera óptima entre 35 - 37°C y a una concentración atmosférica de CO_2 del 5-10 %(Foxwell *et al.,* 1998).

1.2. Clasificación

La especie *H. influenzae* se subdivide en siete grupos, incluidos seis que expresan distintos tipos de polisacárido capsular y se serotipifican del (a–f) y un grupo no capsulado denominado como *H. influenzae* no tipificable (NTHi) (Langereis & De Jonge, 2015). Existen ocho biotipos diferentes (I, II, III, IV, V, VI, VII y VIII) y se clasifican con base a tres propiedades bioquímicas y enzimáticas que son: la producción de indol, actividad de ureasa y actividad de ornitina descarboxilasa (León *et al*., 2021).

Esta bacteria es un comensal común del tracto respiratorio superior y exclusivo de humanos (Whittaker *et al*., 2017), coloniza de forma natural la nasofaringe sin causar daño; sin embargo, puede actuar como un patógeno oportunista, afectando principalmente a niños menores de cinco años, adultos mayores de 65 años y a individuos inmunocomprometidos. Su transmisión ocurre típicamente de persona a persona a través de la inhalación de gotas de secreciones respiratorias o por inoculación de mano a boca (Foxwell *et al*., 1998).

H. influenzae puede ser responsable de provocar infecciones tanto invasivas como no invasivas; dentro de las infecciones invasivas destacan la meningitis, neumonía, epiglotitis, pericarditis, celulitis, artritis séptica y bacteriemia (principalmente provocadas por *H. influenzae* serotipo b).

1.3. Epidemiología

Durante el año 2009 al 2015, la incidencia anual media estimada de la enfermedad invasiva por *H. influenzae* fue de 1,7 casos por cada100, 000 habitantes. La incidencia fue más alta en adultos mayores de 65 años (6,30) y niños menores de 1 año (8,45) (Soeters *et al*., 2018).

Desde la introducción de la vacuna contra *H. influenzae* serotipo b en la década de 1990, la carga de infecciones relacionadas con *H. influenzae* ha estado cada vez más dominada por NTHi (Duell *et al*., 2016). Por ejemplo, en los Estados Unidos, NTHi es la causa más común de enfermedad invasiva por *H. influenzae*. Durante el año 2008 al 2019, la incidencia anual promedio de NTHi fue de 1,3/100,000 habitantes y en general, 5,8/100,000 en niños menores de 1 año y 10,2/100,000 en adultos mayores de 80 años (Oliver *et al*., 2023).

En México, en 2011, Solórzano-Santos y colaboradores, realizaron un estudio transversal, que incluyó a 573 niños menores de cinco años. En donde se reportó 88 aislamientos de *H. influenzae*: en 7/573 (1.2 %) se aisló a *Hi*b, en 3/573 (0.5 %) a *Hi*a, c, d, f y en mayor porcentaje se aisló a NTHi con 78/573 (13.6 %) (Solórzano-Santos *et al*., 2011).

1.4. *Haemophilus influenzae* no tipificable

Las cepas de NTHi*,* se asocian frecuentemente a infecciones localizadas del tracto respiratorio, tales como otitis media aguda (OM), otitis media crónica con efusión, conjuntivitis, sinusitis, bronquitis, otorrea, neumonía adquirida en la comunidad, además de relacionarse con la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica en adultos (EPOC). Las exacerbaciones de la EPOC y la otitis media son las infecciones más prevalentes causadas por NTHi. Estas infecciones provocan en los pacientes tiempo perdido en el trabajo, visitas a las salas de emergencias y hospitalizaciones por insuficiencia respiratoria (Ahearn *et al*., 2017). Además, recientemente se ha demostrado que NTHi también puede causar enfermedades invasivas como meningitis y sepsis en hospederos inmunocomprometidos (Langereis & De Jonge, 2015).

La enfermedad por NTHi ocurre cuando la bacteria se adhiere y coloniza células epiteliales en el tracto respiratorio o invade tejidos circundantes (Arce *et al*., 2009). No obstante, un daño a la mucosa del tracto respiratorio por otro agente, como un virus o el humo del tabaco, es predisponente para que NTHi se adhiera, invada y provoque la infección. De igual manera, la EPOC, la bronquiectasia y la fibrosis quística, se relacionan con anormalidades en el espacio mucociliar y predisposición a adquirir NTHi (Rao et al., 1999a).

1.5. Patogénesis

La patogénesis de la enfermedad causada por NTHi involucra múltiples eventos entre los que intervienen: determinantes de virulencia bacterianos, los factores del hospedero y la influencia del medio ambiente. Hay una entrada de los microorganismos al tracto respiratorio superior, seguida de una colonización asintomática de la nasofaringe, que es el lugar donde reside en su único hospedero (el humano). Se presenta una interacción de la bacteria con la mucosa, en donde participan una serie de adhesinas con las que interacciona y se une a las células epiteliales del tracto respiratorio; dentro de estas participan los pili tipo IV, la fimbria P5, el LOS, las proteínas de penetración Hap, las proteínas de alto peso molecular HMW1 y HMW2 y adhesinas adicionales (Hia) (Rao *et al*., 1999b). Las proteínas de membrana externa P2 y P5, y probablemente otros factores, promueven la unión de la bacteria al espacio mucociliar. Posteriormente, varias adhesinas, incluyendo HMW1, HMW2, pili tipo IV, Hia, Hap, entre otras, regulan la adherencia directa a células epiteliales no ciliadas. En presencia del inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI), Hap promueve la adherencia a la superficie epitelial y promueve las interacciones bacterianas que resultan en la formación de agregados bacterianos y microcolonias, facilitando la persistencia bacteriana. Posiblemente, Hap y otros factores promueven la entrada en las células epiteliales, formando un nicho protector para el microorganismo, resguardándolo del sistema inmune. Cuando la concentración de SLPI disminuye, Hap sufre autoproteólisis, favoreciendo la dispersión y diseminación de la bacteria dentro del tracto respiratorio. Ante la presencia de una infección viral previa, enfermedad alérgica o la exposición al humo del cigarro, la bacteria se dirige desde la nasofaringe a otros sitios dentro del tracto

respiratorio y produce una enfermedad sintomática (Foxwell *et al*., 1998);(Rao *et al*., 1999a)

La supervivencia de NTHi en el hospedero es multifacética, debido a varios factores de virulencia involucrados en la resistencia al complemento, la formación de biopelícula, la respuesta de inmunoglobulinas modificadas mediante proteasas y la utilización de las proteínas del hospedero como estrategia secundaria para aumentar la capacidad adhesiva (Duell *et al*., 2016). Las interacciones hospedero-patógeno a través de las adhesinas de NTHi no están completamente investigadas. No obstante, los mecanismos de persistencia de NTHi incluyen la expresión de múltiples adhesinas redundantes que median la unión al hospedero y los componentes de la matriz extracelular (Ahearn *et al*., 2017), por lo tanto, la relación entre las adhesinas y la matriz extracelular (MEC) tiene un papel importante en el éxito de la colonización y virulencia de NTHi (Osman *et al*., 2018).

Actualmente, no se dispone de una vacuna que confiera protección frente a enfermedades causadas por NTHi y/o por otros serotipos diferentes al serotipo b. Por lo que el desafío es encontrar un antígeno común a todas las cepas de *H. influenzae* para comenzar con el desarrollo de una vacuna.

En los últimos años, se han investigado nuevos antígenos para vacunación que incluyen a proteínas denominadas "*moonlighting*".

2. Proteínas *moonlighting*

En años previos, se han identificado un gran número de proteínas capaces de realizar más de una función dentro o fuera de la célula. Hace dos décadas, se acuñó el término en inglés "*moonlighting proteins*" para designar a estas proteínas multifuncionales. Este término excluye a productos de fusión de genes, el denominado "splicing" alternativo, y a eventos de proteólisis (Jeffery, 2016), es decir, se refiere a que una misma secuencia puede realizar funciones muy diversas; funciones bioquímicas o biofísicas fisiológicamente relevantes para la célula (Kainulainen & Korhonen, 2014). La mayor parte de las funciones alternativas de muchas proteínas se han descubierto de manera imprevista, y hasta el momento no hay una manera de predecir la flexibilidad funcional, ya que se desconoce el mecanismo mediante el cual una misma proteína puede cambiar

de una función a otra. Sin embargo, se hipotetiza que esta variabilidad podría depender de varios factores como: cambios en la conformación y/o en el estado de agregación de la proteína, por ejemplo, de monómero a dímero o a tetrámero, si cambia su localización intracelular, si se encuentra dentro o fuera de la célula o si se expresa en tipos celulares diferentes. Adicionalmente, la concentración de algún sustrato o ligando para la proteína podría ser indicativo para realizar una función determinada. Es posible que estos mecanismos no sean mutuamente excluyentes, de modo que una proteína podría usar una combinación de ellos para ejecutar sus diversas tareas (Wojtas *et al*., 1997); (Platt *et al*., 2000); (Jeffery, 2003); (Kainulainen & Korhonen, 2014)

Algunas funciones de proteínas *moonlighting* incluyen la adhesión a células epiteliales del hospedero, la mucosa y los componentes de la MEC (X. Wang *et al*., 2014). Y en general, se postula que las proteínas *moonlighting* apoyan indirectamente la unión de patógenos a las células hospederas, lo que facilita el proceso de colonización y promueve la posterior invasión del organismo hospedero (Satala *et al*., 2020).

3. Una proteína multifuncional: Enolasa

La enolasa (fosfopiruvato hidratasa E.C. 4.2.1.11) tiene un papel destacado como proteína *moonlighting* (Hussain *et al.*, 2022); esta es una metaloenzima que cataliza la conversión reversible de 2-fosfoglicerato (2-PGE) a fosfoenolpiruvato en la vía de la glucólisis y, por lo tanto, es una de las proteínas más abundantemente expresadas en el citoplasma celular de muchos organismos, desde bacterias hasta vertebrados superiores; presenta una secuencia de aminoácidos muy conservada, especialmente en el sitio catalítico y requiere de magnesio para la catálisis y su estabilización (V Pancholi, 2001a); (Antikainen, Kuparinen, *et al*., 2007).

Esta enzima pertenece a la clase de proteínas de superficie que no poseen una maquinaria clásica para su transporte a la superficie celular, debido a la carencia de péptido señal (V. Pancholi, 2001b). Hasta el momento se desconoce el mecanismo preciso por el cual la enolasa se exporta a la superficie (Kainulainen & Korhonen, 2014); sin embargo, se postulan algunas hipótesis; algunos autores han planteado que un dominio central hidrofóbico dentro de la enolasa podría servir como una secuencia señal;

esto se puso de manifiesto en un experimento realizado con la enolasa de *Bacillus subtilis,* ya que al eliminar un dominio α helicoidal hidrofóbico de 19 aminoácidos y sustituirlo por un dominio α helicoidal con características estructurales similares (para no alterar la estructura tridimensional de la enolasa), la translocación de la enolasa de *B.subtilis* a la superficie fue eliminada (Yang *et al*., 2011). Por otra parte, un estudio realizado por Boël en 2004 informó que una pequeña fracción de la enolasa de *Escherichia coli*, así como otras enolasas, son modificadas covalentemente por su sustrato (2-fosfoglicerato), en concreto el aminoácido Lys341que se encuentra en el sitio activo de enolasa en *E. coli*; la unión covalente del 2-fosfoglicerato a Lys341, inhibe la actividad de la enzima, pero es esencial para su exportación al medio extracelular, ya que la sustitución de Lys341 con otros aminoácidos abolió su exportación al entorno extracelular (Boël *et al*., 2004); (Kainulainen & Korhonen, 2014), también se sugiere que la acetilación o fosforilación postraduccional puede controlar la asociación de esta proteína a las membranas celulares de diferentes organismos (Díaz-Ramos *et al*., 2012).

La forma de la enolasa asociada a la superficie tiene múltiples funciones en las interacciones bacteria-hospedero (Antikainen, Kupannen, *et al*., 2007), dentro de estas funciones, una muy frecuentemente reportada es la interacción con el plasminógeno (Plg) (Hussain *et al*., 2022).

El Plg tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la coagulación. Es una proenzima de 92 kDa, contiene cinco dominios *kringle* (K1–K5) los cuales median su unión a la enolasa con residuos de lisina interna y/o carboxilo terminal accesibles (Nogueira *et al*., 2013); la interacción del plasminógeno con la enolasa conduce a un cambio conformacional, que lo hace más susceptible a la escisión por los factores activadores del plasminógeno (Pas) (Lähteenmäki *et al*., 2001). Esta interacción es importante para favorecer la activación del Plg a plasmina (Plm) (P. Jiang *et al*., 2019); una serin proteasa que promueve la degradación de fibrina y de los componentes de la MEC, algunos patógenos han utilizado este sistema de proteasas (Plg/Plm), para infectar e invadir las células hospederas (Ay *et al*., 2018).

Por otra parte, la enolasa también se ha reportado como una adhesina cuando se encuentra en la superficie celular en una gran variedad de microorganismos,

favoreciendo su interacción con las proteínas de la MEC, como laminina (Carneiro *et al*., 2004), fibronectina (Castaldo *et al*., 2009a), colágeno (Antikainen, Kuparinen, *et al*., 2007), entre otras; siendo estas proteínas componentes importantes de las membranas basales y las matrices extracelulares en las barreras tisulares (Hussain *et al*., 2022).

La familia de proteínas más abundante presente en la MEC son los colágenos *(*Gelse *et al*., 2003), hasta la fecha se han identificado 28 tipos diferentes (del I al XXVIII) (Ricard-Blum, 2011); de estos, los colágenos I a V representan los tipos más encontrados (Chagnot *et al*., 2012); sin embargo, los colágenos tipo I y III son los principales constituyentes de la MEC (siendo el colágeno tipo I el más abundante en el cuerpo humano) (Rittié, 2017), ambos pertenecen a la familia de colágenos fibrilares (Bönnemann & Voermans, 2012) y brindan al tejido resistencia a la tracción e influyen en la unión y migración celular (Bode, 2000).

La triple hélice del colágeno tipo I está compuesta por dos cadenas α1 y una cadena α2 (Gao *et al*., 2017), mientras que el colágeno tipo III es un homotrímero de tres cadenas polipeptídicas idénticas α1 superenrolladas una alrededor de la otra formando una triple hélice dextrógira (Risteli *et al*., 2014); (Nielsen & Karsdal, 2016).

Durante la biosíntesis de colágeno, las cadenas polipeptídicas α se autoensamblan en unidades de tropocolágeno; y estas unidades se empaquetan para formar una fibrilla a través de enlaces covalentes cruzados. Las cadenas α en la triple hélice varían en los diferentes tipos de colágenos (Gao *et al*., 2017), algunas características distintivas son la disposición regular de los aminoácidos en cada una de las tres cadenas de las subunidades de colágeno (Gorgieva & Kokol, 2011), los grados de glicosilación y los enlaces cruzados de disulfuro que solo se observan en el colágeno tipo III (*Periarticular Ligamentous Tissue: A Biochemical and Physiologic Assessment* | *Musculoskeletal Key*, n.d.). Independientemente de las diferencias estructurales que presentan los diferentes tipos de colágeno, en múltiples estudios, se ha informado que es uno de los principales blancos de la enolasa para interaccionar con la MEC de muchos patógenos y algunas bacterias prebióticas (Marcos *et al*., 2012); (Muscariello *et al*., 2020); (Hussain *et al*., 2022).

Además, se ha reportado que la enolasa se encuentra involucrada en enfermedades fúngicas sistémicas, enfermedades dentales y el cáncer (V Pancholi, 2001a), e inclusive se ha demostrado que la expresión de la enolasa en la superficie de células cancerígenas de pulmón promueve la migración o metástasis del mismo (Capello *et al*., 2011); (Hsiao *et al*., 2013). Dada su importancia en distintos eventos patológicos, la enolasa se considera como un factor de virulencia asociado a la superficie de múltiples patógenos (Vijay Pancholi & Chhatwal, 2003) y, de manera importante, se utiliza como inmunógeno para el desarrollo de vacunas en varias bacterias como: *Staphylococcus aureus* (Glowalla *et al.,* 2009)*, Vibrio parahaemolyticus* (W. Jiang *et al.,* 2014)*,Streptococcus iniae* (Jun Wang *et al*., 2015), *entre otros;* mostrando especificidad y capacidad para conferir protección en modelos experimentales de animales infectados. Así mismo, hay estudios que reportan su uso como un potencial candidato vacunal tanto en infecciones bacterianas, micóticas, parasitarias y como blancos terapéuticos contra el cáncer (Sundstrom & Aliaga, 1992); (Chen *et al*., 2012).

4. ANTECEDENTES

4.1. Antecedentes generales

En años recientes, diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de investigar el papel de la enolasa como un factor de virulencia, mediante la determinación de la interacción con proteínas del hospedero como el plasminógeno y componentes de la MEC, entre otras proteínas; así como su participación al fungir como un antígeno inmunodominante para el desarrollo de vacunas, esto se ha demostrado mediante herramientas bioinformáticas y/o trabajos experimentales en múltiples estudios reportados por distintos grupos de investigación alrededor del mundo, los cuales se citan más adelante.

La enolasa se encuentra dentro de las proteínas citosólicas más abundantemente expresadas, a pesar de la falta de péptido señal o sistemas de secreción afines para su exportación, se ha localizado en la superficie celular de una variedad de células eucariotas y procariotas, donde actúa como receptor del plasminógeno (S. Bergmann *et al*., 2001); (W. Jiang *et al*., 2014); (Jun Wang *et al*., 2015); (Salazar *et al*., 2017). La activación y transformación del plasminógeno en su forma proteolíticamente activa (la

plasmina), aumenta la capacidad por parte de estos microorganismos para invadir y diseminarse en su hospedero (Toledo *et al*., 2012).

Se ha reportado que el plasminógeno contiene cinco dominios *kringle* (K1–K5) que se unen a lisina o ligandos similares a lisina (Menhart *et al*., 1993); (Bhattacharya *et al*., 2012). Tal es el caso de la enolasa de *Trichinella spiralis* (TsENO), en dónde, a lo largo de su secuencia, se identificaron cuatro residuos de lisina los cuales tienen un papel importante en la unión del Plg, estos aminoácidos son Lys90, Lys289, Lys291 y Lys300 (P. Jiang *et al*., 2019). De igual manera, se ha reportado que la enolasa de *Streptococcus pneumoniae* contiene un motivo interno responsable de la unión a los dominios *kringle* del Plg, el cual ha sido bien caracterizado como 248FYDKERKVY256 (S. Bergmann *et al*., 2001); (Simone Bergmann *et al*., 2003). Este motivo interno, también se ha identificado en otros microorganismos, de los cuales se puede mencionar a *Leishmania mexicana* (Vanegas *et al*., 2007)*, Plasmodium* (Ghosh *et al*., 2011) y *Theileria annulata*, *Bartonella henselae* (Deng *et al*., 2019) entre otros. Más aún, mediante ensayos de acoplamiento molecular entre la enolasa de *B. henselae y T.spiralis* con el plasminógeno, se evidenció que ambas proteínas (Enolasa y Plg) presentan complementariedad de forma y además, el motivo interno de unión a Plg se encuentra en la región de la interfaz del complejo Enolasa-Plg (Deng *et al*., 2019); (P. Jiang *et al*., 2019).

Adicionalmente, también se ha comprobado que la enolasa puede interaccionar con componentes de la MEC. Un estudio realizado en 2007 (Antikainen, Kuparinen, *et al*., 2007), muestra que la enolasa de *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus crispatus* presentan una fuerte unión al colágeno tipo I; interesantemente, Salzillo y colaboradores en 2017 identificaron una región de aminoácidos, correspondiente a los residuos 73-140 en la enolasa de *Lactobacillus plantarum* como un dominio importante para contactar y unirse al colágeno tipo I (Salzillo *et al*., 2017). El papel como adhesina también se ha visto con la colágena tipo IV (Hussain *et al*., 2022), fibronectina (Esgleas *et al*., 2008a); (Donofrio *et al*., 2009); (Bao *et al*., 2014) laminina (Carneiro *et al*., 2004) y vitronectina (Satala *et al*., 2020) en múltiples microorganismos.

De igual manera, se ha demostrado la presencia de sitios de unión a ARN extracelular (exRNA) en la enolasa de *S. pneumoniae*; estos motivos son importantes para la

adhesión y su internalización en diferentes células (Zakrzewicz *et al*., 2016). Por lo tanto, se destaca el papel de la enolasa como un factor importante de virulencia.

Por otra parte, el uso de la enolasa para desencadenar una respuesta inmune protectora se informó en un estudio realizado por (Jun Wang *et al*., 2015). Ellos observaron que, la inmunización de ratones con la enolasa recombinante confiere protección eficaz frente a una infección con *S. iniae*; además de que, esta proteína favorece los procesos de adhesión e invasión a células de cáncer de riñón de hámster (BHK-21) por *S. iniae*. Otro estudio también informó que la enolasa recombinante de *S. sobrinus* actúa como un antígeno altamente inmunogénico en un modelo de rata, observando una correlación entre la inmunización previa de enolasa recombinante y la disminución de la colonización oral por *Streptococcus sobrinus* (Dinis *et al*., 2009). De la misma manera, en *Vibrio parahaemolyticus*, se demostró que la vacunación con enolasa recombinante en un modelo de ratón confiere inmunidad eficaz contra una dosis letal de *V. parahaemolyticus* (W. Jiang *et al*., 2014).

El efecto protector de la enolasa también ha sido reportado en parásitos. Por ejemplo, un estudio realizado en la India en el año 2007, mostró que los anticuerpos anti enolasa recombinante de *Plasmodium falciparum* (r-Pfen) inhiben su crecimiento en un cultivo *in vitro*; adicionalmente, ratones previamente inmunizados con r-Pfen demostraron protección frente a una infección experimental con la cepa letal de *Plasmodium yoelii* 17XL (Pal-Bhowmick *et al*., 2007). Otro estudio mostró que la enolasa recombinante de *T. cruzi* fue reconocida por sueros de pacientes infectados; esto indica que la enolasa es reconocida por el sistema inmunológico de los pacientes y, por lo tanto, es inmunogénica (Carabarín-Lima *et al*., 2014).

Resultados similares se reportaron para la enolasa de *Ascaris suum*, donde se observó una disminución en la recuperación de larvas y huevos del 61.13 y 88.62% respectivamente, esto en ratones previamente inmunizados con enolasa y posteriormente infectados con 2500 larvas de *A. suum*, sugiriendo una vez más que la enolasa puede ser una vacuna candidata contra las infecciones por *A. suum* (Chen *et al*., 2012).

Por otra parte, se debe destacar que se han registrado dos patentes para vacunas cuyo componente es la enolasa; la primera indicada contra la caries dental asociada a *Streptococcus sobrinus y Streptococcus mutans* (Paten. N0.: US 7, 541,041 B12 Date of Patent Jun. 2, 2009); (*US20060029618 Vaccine against dental caries based on virulence-associated immunomodulatory extracellular proteins produced by the cariogenic bacteria Streptococcus sobrinus and Streptococcus mutans*, n.d.) y la segunda publicada más recientemente, indicada en contra de las infecciones provocadas por *Staphylococcus aureus* (Pub.N0.: US 2014/0030287 A1 Pub. Date: Jan. 30, 2014) (WO2012065034 ENOLASE PEPTIDE CONJUGATE VACCINES AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, n.d.). Cabe mencionar que, hasta el momento estas vacunas aún se encuentran en la fase preclínica de su investigación, no obstante; estos informes sugieren de manera alentadora que la enolasa de *H. influenzae* podría tener el mismo efecto inmunoprotector.

4.2. Antecedentes directos

En nuestro grupo de investigación, en el laboratorio de Microbiología Hospitalaria de la Comunidad, Carabarin-Lima en 2015, diseñó oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la enolasa de la cepa *Hi*NTBUAP96, posteriormente lo clonó en el plásmido pCR®2.1-TOPO®, y obtuvo la secuencia completa de dicho gen, el cual se encuentra publicado en la base de datos del GenBank con el número de acceso: MF405339.1.

Adicionalmente en un trabajo previo de nuestro grupo, Osorio-Aguilar en 2018, usando análisis *in silico,* con la secuencia de la enolasa de *H. influenzae* identificó de forma preliminar, un motivo putativo de unión a plasminógeno (252 FYNKENGMY 260), además de epítopos putativos para activar a linfocitos B y T citotóxicos (CTL), indicando que la enolasa de *H. influenzae* podría generar una respuesta inmune tanto humoral como celular, además se identificó una región trans-membranal mediante la cual podría estar anclada a la superficie de la bacteria.

En ese estudio se obtuvo la enolasa recombinante purificada de la cepa HibBUAPNAN (rEnoHi), la cual demostró ser altamente inmunogénica ya que generó títulos de anticuerpos arriba de 1:40,000 en un modelo de conejo. Aunado a esto, se observó a la

enolasa de *H. influenzae* expuesta en la superficie celular de cepas tipificables y no tipificables y los anticuerpos policlonales reconocieron específicamente a la enolasa nativa de las distintas cepas tanto no tipificables como serotipo b (Osorio Aguilar 2018).

5. JUSTIFICACIÓN

H. influenzae tiene importancia médica por ser causa de una amplia variedad de infecciones tanto sistémicas como localizadas, principalmente en niños menores de 5 años, adultos mayores de 65 años y personas inmunocomprometidas.

A pesar de que actualmente existe la vacuna contra *H. influenzae* serotipo b (Hib), no protege a la población que adquiere una infección por otros serotipos o por cepas no tipificables. Aunado a esto, el incremento de la resistencia a múltiples antibióticos por estas cepas, hace cada vez más difícil el tratamiento de las infecciones causadas por las mismas, lo que constituye un problema importante en salud pública.

Por lo que es necesario realizar estudios para el desarrollo de una vacuna que pudiera proteger de las infecciones asociadas a *H. influenzae* serotipificable y no tipificable. Con base a esto, propusimos estudiar algunas propiedades de virulencia e inmunológicas de la enolasa de *H. influenzae*, y obtener información relevante con la finalidad de proponer a esta proteína como un candidato a inmunógeno. Con una vacuna efectiva que genere protección contra todas las cepas, se contribuiría a limitar el uso exagerado de antibióticos y reduciría los costos asociados al cuidado de la salud en estos pacientes.

6. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las propiedades de virulencia e inmunológicas de rEnoHi a través de ensayos experimentales *in vivo e in vitro.*

6.1. Objetivos particulares y específicos

6.2 Determinar del papel de la enolasa como un posible factor de virulencia de *H. influenzae*

6.2.1. Determinar la interacción rEnoHi con proteínas plasmáticas y plasminógeno

6.2.2. Determinar la interacción rEnoHi con componentes de matriz extracelular (Colágeno I y III, fibronectina y laminina)

6.2.3. Identificar en la secuencia de la enolasa posibles sitios de unión a ARN extracelular (exRNA)

6.3. Caracterizar la respuesta inmune de la enolasa de *H. influenzae*

6.3.1. Complementar el análisis bioinformático de las propiedades inmunogénicas de la enolasa de la cepa *Hi*NTBUAP9612540.

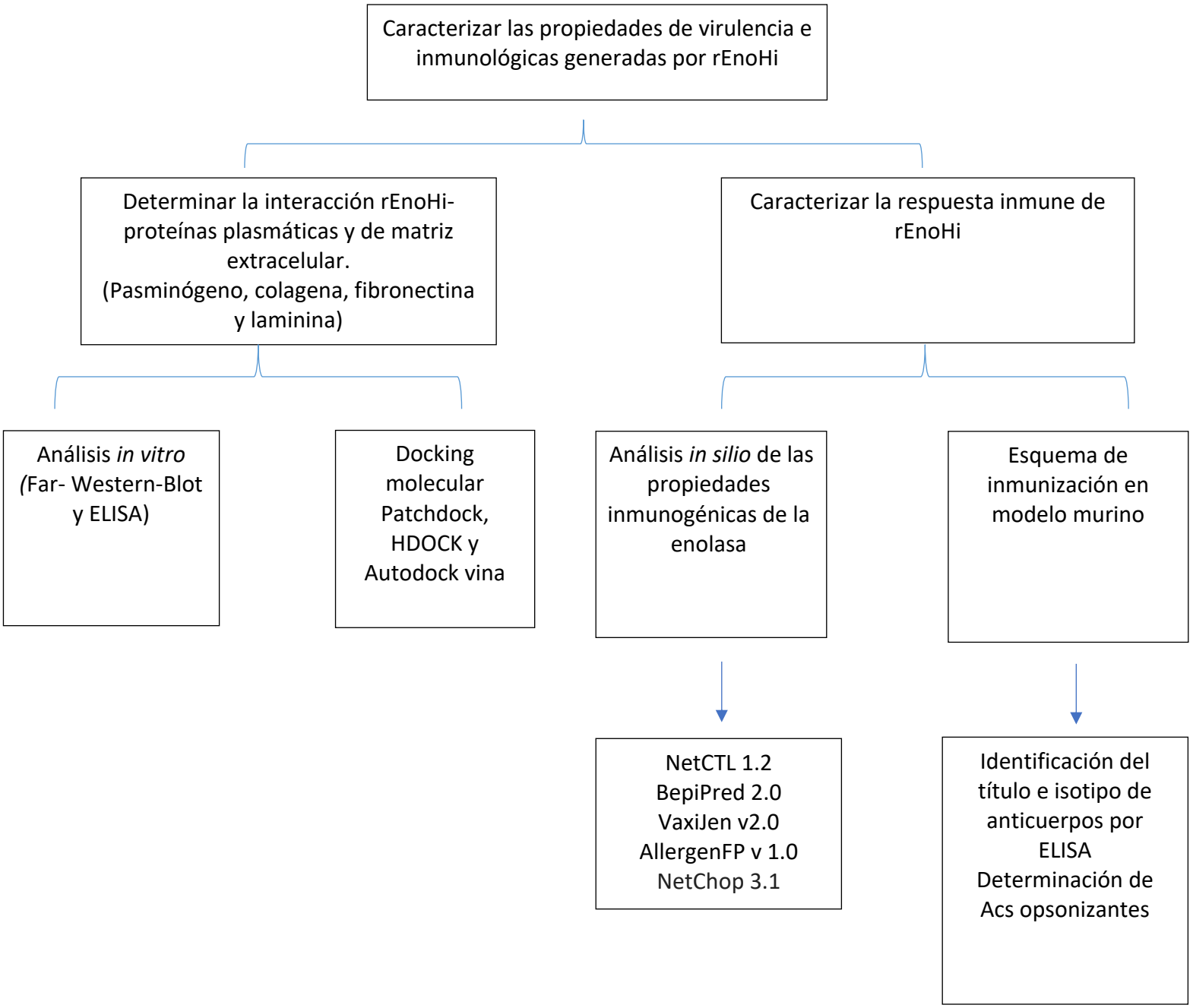
6.3.2. Purificar mediante cromatografía de afinidad la rEnoHi a homogeneidad.

6.3.3. Desarrollar un protocolo de inmunización en un modelo murino.

6.3.4. Determinar el título e isotipo de anticuerpos policlonales generados contra rEnoHi.

6.3.5. Realizar ensayos para identificar anticuerpos opsonizantes

7. DIAGRAMA DE TRABAJO



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Material biológico utilizado

En el presente estudio se incluyeron dos cepas de *H. influenzae*: la cepa tipificable *Hi*bBUAPNAN (serotipo b), que fue aislada de una niña menor de 2 años con un cuadro clínico de meningitis; y la cepa no tipificable *Hi*NTBUAP96 aislada de un niño menor de cinco años con un cuadro clínico de otitis media con secreción.

También se trabajó con *E. coli* BL21(DE3) pLysS, conteniendo la construcción pRSETA::EnoHibBUAPNAN (Derivado del plásmido pRSETA con inserción del gen eno de *Hi*bBUAPNAN obtenida por Osorio-Aguilar, en un trabajo previo (Osorio Aguilar, 2018). Las características de las cepas se enumeran en la tabla 1.

Todas las cepas utilizadas en este estudio forman parte de la colección del cepario del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, del Instituto de Ciencias de la BUAP (ICUAP).

Tabla 1. Cepas utilizadas

Cepa	Características	Origen
*Hi*NTBUAP96	Cepa no tipificable aislada de un cuadro clínico de otitis media con secreción.	Oído
*Hi*bBUAPNAN	Cepa serotipo b aislada de un cuadro clínico de meningitis.	LCR
E. coli BL21(DE3) pLysS	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3) pLysS (CamR)	Invitrogen

8.2. Cultivo de cepas

Las cepas de *H. influenzae* se cultivaron en medio agar infusión cerebro-corazón (BHI), suplementado con Fildes al 5%, el cual es un digerido de sangre de carnero, que aporta el factor X (hemina) y el factor V (nicotinamida adenina dinucleótido, NAD), factores necesarios para el adecuado crecimiento de *H. influenzae*. Las cepas se incubaron por 24 h a 37 °C y a una atmósfera de CO_2 del 5-10%

Por otra parte, la cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS trasformada con el plásmido pRSETA::EnoHibBUAPNAN se cultivó en medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 34 µg/ml e incubó a 37 ºC.

8.3. Análisis *in silico*

Para los diferentes análisis *in silico*, se trabajó con la secuencia de la enolasa de la cepa *Hi*NTBUAP96 (NTHiENO), que ya se encuentra disponible en la base de datos del GenBank, con número de acceso MF405339.1.

8.3.1. Alineamiento de enolasas

A partir de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), se obtuvieron las secuencias de la enolasa de varios microorganismos en los que ya se ha demostrado que la enzima tiene un motivo interno implicado en la unión al plasminógeno, el cual ha sido caracterizado por ensayos *in vitro* y por acoplamiento molecular. Estos microorganismos fueron: *Streptococcus pneumoniae* (GenBank: VDG78305.1), *Leishmania mexicana* (GenBank: ABA64522.1) y *Bartonella henselae* (GenBank: ATP12173.1). Estas secuencias y la de NTHiENO, se alinearon usando CLUSTAL OMEGA (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) con la finalidad de evaluar el porcentaje de identidad entre todas las cepas, enfocándonos principalmente en el motivo interno de unión a Plg.

8.3.2. Modelado por homología de NTHiENO

El modelado por homología de la enolasa de *H. influenzae* no tipificable (NTHiENO) (GenBank: MF405339.1) se realizó inicialmente con la obtención de la estructura en 3D de la enolasa por medio de Pryre2 (monómero de la enolasa) (Kelley *et al*., 2015) y la plataforma SWISS-MODEL (dímero de la enolasa) (Waterhouse *et al.*, 2018), posteriormente la calidad y la estereoquímica de los modelos obtenidos (monómero y dímero) se evaluaron mediante el programa PROCHECK (R.A. Laskowski *et al*., 1993). El programa QMEAN (Qualitative Model Energy Analysis) de SWISS-MODEL se utilizó para la estimación de la mejor calidad fiable del modelo (Benkert *et al.*, 2008), y la herramienta ProSA (Protein Structure Assessment) para comprobar la calidad general del modelo (Wiederstein & Sippl, 2007).

8.3.3. Obtención de estructuras cristalizadas

Las estructuras cristalizadas de las diferentes proteínas que se utilizaron para realizar los ensayos de acoplamiento molecular, fueron descargados del Protein Data Bank (PDB), y corresponden a: plasminógeno humano (PDB ID 4A5T) (Y. Xue *et al*., 2012), colágeno humano tipo I (PDB ID 7CWK) (*RCSB PDB - 7CWK: Structure of a triple-helix region of human collagen type I*, n.d.), colágeno humano tipo III (PDB ID 6A0A) (Hua *et al*., 2019) y fibronectina (PDB ID 3M7P)(Graille *et al*., 2010). Todas las estructuras fueron limpiadas de residuos y/o ligandos experimentales en el software Chimera (Pettersen *et al*., 2004).

8.3.4. Análisis de acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (Docking molecular) es un método bioinformático que permite predecir y calcular computacionalmente la posición más favorable de interacción entre un ligando y un blanco (usualmente proteico) a partir de sus representaciones tridimensionales (Ballón Paucara & Grados Torrez, 2019) generando un modelo de unión y energías de enlace entre el ligando y el receptor (Prieto-Martínez *et al*., 2018),

Es decir, el acoplamiento se realiza generando poses de unión con estructuras 3D conocidas (proteína-ligando o proteína-proteína), tomando en cuenta métodos de

búsqueda y grados de libertad; usualmente la mejor pose es considerada como aquella que reporta la mejor energía de afinidad (∆G) y en ocasiones también se considera el modelo que presenta el menor valor de la desviación cuadrática media (por sus siglas en inglés RMSD) con respecto a una estructura de referencia. (Velasquez *et al*., 2013), así como la que presenta el mejor puntaje de energía de acoplamiento y la energía de contacto atómico más baja (ACE), esto depende del tipo de software que se utilice para realizar el acoplamiento molecular; sin embargo, la finalidad es identificar la mejor pose de interacción entre ambas moléculas.

Actualmente, existen dos enfoques, en los cuales nos basamos para realizar este estudio; el primero se basa en la complementariedad de superficie que se presentan entre ambas moléculas, por ejemplo, proteína-proteína (PatchDock y HDOCK); y el segundo enfoque en dónde se calculan y miden las energías de interacción del emparejamiento entre proteína-ligando (AutoDock Vina).

8.3.5. Docking molecular NTHiENO-Plasminógeno

Para este análisis se utilizó la estructura de NTHiENO obtenida por Phyre2. El acoplamiento molecular de las interacciones proteína-proteína entre NTHiENO y el plasminógeno humano (ID 4A5T) se realizó mediante PatchDock (Schneidman-Duhovny *et al*., 2005). Se analizaron los primeros 10 mejores resultados de acoplamiento, en función de la mejor puntuación y energía de contacto atómica (ACE); quedándonos con el modelo que presentó el valor más bajo de ACE y que presentaba el motivo putativo de unión a plasminógeno en la región de la interfaz. El modo de unión fue visualizado por el software Chimera.

8.3.6. Obtención del motivo de unión a Plg (pbmHiENO)

A partir del modelo tridimensional de NTHiENO descrito anteriormente, con el programa GaussView 5.0 (*Nielsen, A.B. and Holder, A.J. (2009) Gauss View 5.0, User's Reference. GAUSSIAN Inc., Pittsburgh. - References - Scientific Research Publishing*, n.d.), se cortó el péptido de 11 aminoácidos correspondiente al motivo putativo de unión a Plg: 251EFYNKENGMYE261 (pbmHiENO); agregando un aminoácido adicional en ambos extremos para mantener la estructura tridimensional. Posteriormente, para neutralizar las

cargas de los aminoácidos en los extremos que fueron cortados, se agregaron los "capping groups" CT3 (N-metilo) y ACE (acetilo) a las regiones N- y C-terminal, respectivamente, mediante el software VMD(Humphrey *et al.*, 1996). Este péptido se usó como ligando para realizar los ensayos de "Blind Docking".

8.3.7. Blind Docking pbmHiENO-Plasminógeno

Cuando se realiza el acoplamiento molecular entre un ligando pequeño (por ejemplo un péptido) y su receptor (proteína), generalmente el sitio de interacción se restringe a sitios de unión de tamaño pequeño "pockets" y a una cantidad pequeña de residuos que puedan interactuar; sin embargo, cuando no se conoce el sitio destino en específico, se le denomina "Blind Docking" o acoplamiento ciego *(Hassan et al*., 2017).

Por otra parte, tanto el ligado (pbmHiENO) como la proteína Plg, fueron preparados con el software Autodock Tools, para convertir los archivos del formato PDB a formato PDBQT, posteriormente el "Blind Docking" se ejecutó con el programa AutoDock Vina (Trott & Olson, 2009), utilizando como objetivo toda la superficie de cada una de las regiones de los cinco dominios *kringle* (K1–K5) del plasminógeno humano. La búsqueda de dominios conservados se realizó a través de la plataforma de búsqueda de dominios conservados del NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi). Se realizaron varios acoplamientos y se seleccionaron los mejores modelos en función de la mejor afinidad de unión (Kcal/mol) y formación de puentes de hidrógeno.

8.3.8. Docking molecular de controles positivos

Para validar la confiabilidad del programa AutoDock Vina, con relación a la predicción del modo interacción entre dos moléculas, se decidió hacer la prueba de "Re-docking" (la cual consiste en eliminar la molécula del ligando de su receptor y luego volver a acoplarlas).

Para esta prueba se seleccionaron 3 proteínas co-cristalizadas con sus ligandos experimentales. Las moléculas seleccionadas que sirvieron como controles positivos fueron la plasmina (forma activa del plasminógeno) EC 3.4.21.7 (PDB ID 5UGG) con su ligando (PDB ID 89M) (Law *et al*., 2017), alfa-trombina EC 3.4.21.5 (PDB ID 1HDT) con

su ligando (PDB ID 0E7) (Tabernero *et al*., 1995), y factor de coagulación sanguínea Xa EC 3.4. 21.5 (PDB ID 1LPG) con su ligando (PDB ID IMA) (Matter *et al*., 2002). Estas proteínas comparten características similares al plasminógeno en cuanto a su función biológica y también a la naturaleza química del ligando (pbmHiENO). Todas las moléculas se prepararon utilizando el programa Chimera y AutoDock Tools (como se mencionó anteriormente), posteriormente los acoplamientos fueron ejecutados en la extensión Vina (Trott & Olson, 2009). Se evaluó la afinidad de unión (Kcal/mol) entre el ligando y el receptor y, finalmente, mediante el software SPDV (Guex & Peitsch, 1997) se calculó la desviación cuadrática media (RMSD) de la pose del ligando acoplado, con respecto a la pose del ligando experimental.

8.3.9. Docking molecular de NTHiENO con MEC

Para este análisis se utilizó el dímero de NTHiENO obtenida por SWISS-MODEL. El acoplamiento molecular se realizó con cada uno de los 3 principales componentes de la MEC [colágeno tipo I (Cln I), colágeno tipo III (Cln III) y fibronectina (Fn)], utilizando una versión en línea del servidor HDOCK (Yan *et al.*, 2020). Para cada caso se analizaron los primeros 10 mejores resultados de acoplamiento, y se seleccionó el que obtuvo la mejor puntuación de energía de acoplamiento para todos los casos. El modo de unión fue visualizado por Chimera y el análisis y visualización del tipo de interacción proteína-proteína se realizó mediante PDBsum (Roman A. Laskowski *et al*., 2018)

Finalmente, tanto el modelo de interacción proteína-proteína, obtenido por PatchDock (NTHiENO-Plg) y los obtenidos por HDOCK (NTHiENO-Cln I/ Cln III/ Fn), fueron sometidos a un análisis para evaluar la afinidad de unión (ΔG) y la constante de disociación (Kd) mediante la plataforma PRODIGY (L. C. Xue *et al*., 2016).

8.3.10. Predicción de propiedades inmunogénicas de NTHiENO

La secuencia de NTHiENO se analizó con diferentes programas bioinformáticos con la finalidad de identificar epítopos para activar a Linfocitos T citotóxicos (CTL), tal como lo describe Osorio-Aguilar en un trabajo previo; sin embargo, en este caso se realizó un análisis más riguroso en donde se incluyeron todos los supertipos de HLA disponibles en el servidor NetCTL 1.2 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/). Por otra parte, también

se corroboró la predicción de los epítopos identificados para la activación de linfocitos B, mediante el servido BepiPred (http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred /). Adicionalmente, se identificaron los sitos de escisiones proteosomales mediante NetChop - 3.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/).

La predicción de antigenicidad de NTHiENO se realizó utilizando el servidor VaxiJen v.2.0 (http://www.ddgpharmfac.net/vaxijen/scripts/VaxiJen_scripts/VaxiJen3.pl) y la de alergenicidad se realizó mediante AllergenFP v.1.0 (https://ddg-pharmfac.net/AllergenFP/feedback.py).

8.4. Purificación de la enolasa recombinante de *H. influenzae*

El porcentaje de identidad que presenta la enolasa de las cepas *Hi*NTBUAP96 y *Hi*bBUAPNAN es del 99,54%, por lo tanto, se podría considerar que la secuencia es prácticamente la misma, ya que no presenta diferencia significativa (Osorio Aguilar, 2018).

Para obtener la enolasa recombinante purificada de la cepa *Hi*bBUAPNAN (rEnoHi) se siguió el protocolo de Osorio Aguilar, 2018, el cual se describe a continuación.

Se tomaron 5 mL de un precultivo de células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, que contenían el plásmido pRSETA::EnoHibBUAPNAN y se inoculó un matraz que contenía 50 mL de LB suplementado con cloranfenicol y ampicilina, el matraz se mantuvo en agitación constante a 37 ºC hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600})=0.4-0.6.

Posteriormente, para inducir la sobrexpresión de rEnoHi se adicionó Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a una concentración final de 1mM, el cultivo se mantuvo durante 1h a 37ºC en agitación constante, pasado ese tiempo, las células se recolectaron mediante centrifugación a 8,000 rpm/5 min, y el sedimento se resuspendió en 20 mL de buffer de lisis (0,5 M de NaCl, Tris-HCl 20 mM PH 8, 0,5 mM de imidazol y 0,1 X de inhibidores de proteasas).

La suspensión resultante se sonicó a 10 pulsos y 50 de amplitud por 40 min, en el equipo Ultrasonic processor, posteriormente el contenido celular se centrifugó a 8,000 rpm/10

min y la enolasa recombinante que está fusionada a una etiqueta de histidinas se purificó mediante cromatografía de afinidad a Níquel como se indica a continuación.

Primeramente, la columna con 500 µL de resina (Ni-NTA Agarose Invitrogen), se cargó con 5 volúmenes de buffer de carga y se dejó interaccionando por 30 min, posteriormente se pasaron 3 volúmenes de buffer de unión. Una vez equilibrada la columna, se hizo pasar el extracto lentamente, y se procedió a hacer los lavados con 10 vol. de buffer de unión, seguido de 12 vol. de buffer de lavado.

La proteína recombinante se eluyó con 6 vol. de buffer de elución, seguido de 10 vol. de buffer *strip* (el contenido y concentraciones de las soluciones se describen en Anexo 1). Finalmente, la purificación de la proteína se visualizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), (Anexo 2), y la proteína purificada se cuantificó mediante el método de Bradford.

8.5. Obtención de proteínas plasmáticas humanas

Mediante punción venosa se obtuvo sangre total de 3 voluntarios clínicamente sanos usando un sistema Vacutainer, las muestras se centrifugaron a 4,000 rpm/5 min para obtener el plasma sanguíneo, posteriormente a 200 µL de suero se le agregaron 3 volúmenes de acetona fría y la muestra se incubó toda la noche a -20 ºC. Al día siguiente se centrifugó a 13,000 rpm/ 30 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en solución salina isotónica (SSI), las muestras se almacenaron a -20 ºC, hasta su uso.

8.6. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se realizó una curva de calibración con albumina bovina sérica (BSA) a partir de un stock de 0,1 mg/1 mL. En una placa de ELISA de 96 pozos, por duplicado, se agregaron los volúmenes equivalentes a las siguientes concentraciones: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 µg, el volumen se llevó a 160 µL con agua destilada, posteriormente se agregaron 40 µl del reactivo de Bradford obteniendo un volumen final de 200 µL, la placa se incubó por 5 min a temperatura ambiente, la absorbancia se midió a λ= 595 nm, en un lector de microplacas de ELISA (Multiskan MS, Labsystems, Finlandia). Para las muestras

problema se agregaron 10 µL de la solución que contenían las proteínas, se midió la absorbancia y la concentración se determinó basándonos en la ecuación de la recta $Y = mx + b$ y despejando "x".

8.7. Obtención de anticuerpos policlonales anti-Plg

Para el esquema de inmunización, cuatro ratones hembra BALB/C, fueron sangrados por la cola para recolectar suero preinmune; posteriormente, se inmunizaron con 20 µg de plasminógeno humano (Sigma-Aldrich, EE. UU.) emulsificado con el adyuvante TiterMax ® (Sigma-Aldrich) por vía intramuscular, seguido de tres refuerzos con las mismas concentraciones, en un período de ocho días entre cada uno. Al final del esquema de inmunización, los ratones fueron sangrados para obtener el suero hiperinmune. Los anticuerpos policlonales fueron usados en Western Blot y en Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima (ELISA), donde mostraron reconocimiento por el plasminógeno humano purificado (Anexo 3)

8.8. Determinación de la interacción Proteína-Proteína por Far-Western Blot

Para detectar interacciones enolasa-plasminógeno, se realizaron ensayos de Far-Western Blot como lo describe (Hall, 2015). Brevemente, 5 y 10 µg del plasminógeno humano (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.) y 3 µg de rEnoHi, se migraron en un SDS-PAGE (10%) y luego se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 15 Volts/40 min. La membrana se bloqueó con buffer de bloqueo (leche descremada en polvo al 2 %, Tween-20 al 0,1 % en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, la membrana se incubó toda la noche a 4 °C con una solución de buffer de bloqueo que contenía 10 µg/mL de rEnoHi o con albumina bovina sérica (BSA) a la misma concentración (control negativo). Se dieron 3 lavados con buffer de bloqueo por 5 min. La unión de rEnoHi-Plg se detectó incubando la membrana con anticuerpos policlonales anti-rEnoHi como primer anticuerpo (1:5,000 /2h/TA), seguido de tres lavados y como segundo anticuerpo, un anti-ratón IgG conjugado a fosfatasa alcalina producido en cabra (Novex ®por Life Technologies, Van Allen Way Carlsbad, CA, EE. UU.) (1:5,000 / 2h/TA), se dieron tres lavados más y los anticuerpos unidos se revelaron

usando NBT (nitro azul de tetrazolio) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (Thermo Fisher Scientific).

Nota: Para el caso de la interacción de rEnoHi-MEC, se siguió el mismo protocolo, solo se modificó la concentración de proteínas cargadas en los pozos, se agregaron 3 µg de Cln I y Cln III, y para la interacción con proteínas plasmáticas totales se cargaron 20 µg. Se migraron en un SDS-PAGE al 7,5%. Los volúmenes y cantidades utilizadas para realizar el gel se describen en el anexo 2.

8.9. Detección de la interacción e inhibición de rEnoHi-Plg por ELISA

Brevemente, se recubrió una placa de 96 pocillos con 1 µg/pocillo de rEnoHi diluido en 100 µL de PBS (Buffer salino de fosfatos) y se incubó durante la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween al 0,5 % (PBS-T). Los pocillos se bloquearon con BSA al 2 % durante 2 h a 37 °C. La placa se volvió a lavar tres veces y se incubó toda la noche a 4ºC, con 0,01-10 µg/pozo de plasminógeno humano diluido en 100 µL de PBS o con BSA como control negativo a las mismas concentraciones. La proteína unida se detectó con anticuerpos policlonales anti-Plg (1:5,000 /2h/TA) como primer anticuerpo y como anticuerpo secundario se agregó un anti-ratón IgG-HRP producido en cabra (1:5,000 /30 min/TA).

La interacción se visualizó utilizando el sustrato TMB, la reacción se detuvo con la adición de 50 µL de ácido sulfúrico 0,5 M y, finalmente, se leyó la DO a 450 nm. Todos los experimentos se repitieron en tres ocasiones de forma independiente.

Los experimentos de inhibición se realizaron mediante la adición de anticuerpos policlonales anti-rEnoHi producidos en conejo (diluidos en serie de 1/100 a 1/40,000) antes de la adición del Plg (1µg/pozo). La inhibición de la interacción se visualizó utilizando 100 µL de 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB; Sigma-Aldrich), se detuvo la reacción con la adición de 50 µL de ácido sulfúrico 0,5 M y, finalmente, se leyó la DO a 450 nm. Todos los experimentos fueron repetidos en tres ocasiones de forma independiente.

Nota: Los anticuerpos anti-rEnoHi producidos en conejo se obtuvieron en el trabajo previo de maestría (Osorio Aguilar, 2018).

8.10. Detección de la interacción de rEnoHi-MEC por ELISA

Brevemente, los pocillos individuales de placas de ELISA se cubrieron con 1,0 µg/pozo de Cln I, Cln III o FN diluidos en 100 µL de PBS y se incubaron a 4°C durante la noche, como control negativo se utilizó caseína a la misma concentración. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T/5 min. Después, los pozos se bloquearon con caseína al 3 % durante 2 h a 37 °C, se lavaron tres veces nuevamente y se incubaron con 0,01-1 µg/pocillo de rEnoHi, diluido en 100 µL de PBS y se incubaron a 4 °C durante la noche. La proteína unida se detectó con anticuerpos policlonales anti-rEnoHi producidos en ratón, como primer anticuerpo (1:5,000 /2h/TA) y como anticuerpo secundario se utilizó un anti-ratón IgG-HRP producido en cabra (1:5,000 /30 min/TA).

La interacción se visualizó utilizando el sustrato TMB, la reacción se detuvo con la adición de 50 µL de ácido sulfúrico 0,5 M y, finalmente, se leyó la DO a 450 nm. Todos los experimentos se repitieron en tres ocasiones de forma independiente.

8.11. Inmunización de rEnoHi con *H. influenzae* en un modelo murino

Ratones hembra BALB/C de 20 días de edad se sangraron de la cola para obtener el suero preinmune, posteriormente se realizó la inmunización con 20 µg de rEnoHi emulsificada 1:1 con adyuvante completo de Freund vía IP, seguida de tres refuerzos cada 7 días, con la misma concentración de proteína recombinante, pero con adyuvante incompleto de Freund. Como control negativo se administró PBS en las mismas condiciones. Al día 45 los ratones fueron sangrados nuevamente para obtener el suero hiperinmune que contenía los anticuerpos policlonales anti rEnoHi. Se determinó el título e isotipo de anticuerpos policlonales generados contra rEnoHi, mediante ensayos de Western-Blot y ELISA.

El cuidado y mantenimiento de los animales se realizó en el bioterio Claude Bernard de la BUAP acorde a su reglamento y a los descritos en la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

8.12. Identificación de la enolasa de *H. influenzae* por Western Blot

Para demostrar el reconocimiento de los anticuerpos policlonales por rEnoHi y la enolasa nativa de diferentes cepas tipificables y no tipificables de *H. influenzae,* 10 *µ*g de rEnoHi y extractos de proteínas totales de cepas de *H. influenzae* fueron migradas en un SDS-PAGE al 12%, posteriormente la proteína se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa a 15 Volts durante 40 min. Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (leche descremada en polvo al 5 % en PBS) durante 1h /37 °C con agitación suave, seguido de tres lavados con PBS-Tween-20 al 0,05 %, y luego se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos policlonales anti-rEnoHi en una dilución 1:5,000 en PBS. Después del procedimiento de lavado, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG conjugado a fosfatasa alcalina (Novex® de Life Technologies) en una dilución 1:5,000 durante 1 hora a 37 °C. Finalmente la señal se reveló con NBT/ BCIP

8.13. Determinación del isotipo de anticuerpos mediante ELISA

Para la determinación del isotipo de anticuerpos se adicionaron 0,4 µg de rEnoHi diluida en 40 µL de PBS en cada pozo de una microplaca de ELISA, y se incubó toda la noche a 4ºC, seguido de tres lavados con PBS-T al 0.05 %. Posteriormente, se agregaron 100 *µ*L del suero hiperinmune a una dilución 1:5,000 en PBS y se incubó por 2h /TA; (como control negativo se utilizó el suero preinmune). Se realizaron tres lavados y se adicionó 50 *µ*L de una dilución 1:1,000 de anticuerpo anti-isotipo (30 min/TA) (ISO2-1KT Mouse Monoclonal Antibody Isotiping, Sigma). Los anticuerpos unidos se detectaron con el tercer anticuerpo, un anti-cabra IgG-HRP producido en conejo (1:5,000 /30 min/TA) (A5420, Sigma).

Finalmente, la interacción se visualizó utilizando 100 *µ*L de TMB, la reacción se detuvo con la adición de 50 µL de ácido sulfúrico 0,5 M y, finalmente, se leyó la DO a 450 nm. Todos los experimentos se repitieron en tres ocasiones de manera independiente.

8.14. Determinación de anticuerpos opsonizantes por inmunofluorescencia.

Previamente, el suero hiperinmune que contenía los anticuerpos anti-rEnoHi, fue tratado con calor durante 30 min a 56 °C, para inactivar a las proteínas del complemento.

Posteriormente, 5 × 10^7 UFC de las cepas *Hi*NTBUAP96*,* *Hi*bBUAPNAN*,* fueron resuspendidas en PBS estéril y centrifugadas a 2,800 rpm/5min, el sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 50 µL, posteriormente se tomo una alícuota equivalente 1 x 10^6 UFC y fueron fijadas por 30min/TA en un portaobjetos con solución fijadora al 4% de paraformaldehído, seguido de dos lavados con PBS, se adicionó solución *Quenching* (glicina 0.1M en PBS), durante 15 min, seguida de 3 lavados con PBS, y se incubó con solución de bloqueo (1 % de BSA en PBS) durante 1 h/TA. Se lavó una vez y se incubó a 4ºC toda la noche con el anticuerpo primario (suero inactivado por calor en PBS, 1:50).

Al día siguiente se realizaron 4 lavados con PBS-Tween, las muestras se incubaron por 1h a 37ºC, con una dilución (1:250) con el anticuerpo anti-ratón IgG(H+L) hecho en cabra acoplado a FITC y se mantuvo en una cámara húmeda, protegida de la luz; trascurrido el tiempo se realizaron 4 lavados con PBS-Tween, además de un lavado con agua destilada, se eliminó el exceso de agua; se agregaron 8µl de VECTASHIELD ® y se colocó un cubreobjetos, procurando que quedara extendido en toda la muestra.

Finalmente, con una resina acrílica se selló toda la periferia, las muestras se mantuvieron a 4ºC protegidas de la luz, hasta su observación con microscopio de epifluorescencia

Nota: Como controles positivos se utilizaron anticuerpos anti-rEnoHi sin tratamiento de calor, anticuerpos totales contra NTHi y *Hi*b, proporcionados por el LMHyC y como control negativo suero preinmune.

8.15. Análisis de los datos.

Toda la información recopilada se comparó usando pruebas de ANOVA y T de student no pareado. La prueba de Tukey se utilizó para hacer comparaciones pareadas.

9. RESULTADOS

DETERMINACIÓN DEL PAPEL DE LA ENOLASA COMO UN POSIBLE FACTOR DE VIRULENCIA DE *H. influenzae.*

9.1. Purificación de rEnoHi

Inicialmente, como ya se tenía clonado el gen de la enolasa de *H. influenzae* en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, conteniendo el plásmido pRSETA::EnoHibBUAPNAN, proseguimos con la sobreexpresión y purificación de rEnoHi. Se realizaron múltiples purificaciones de rEnoHi por cromatografía de afinidad a níquel hasta obtener la cantidad necesaria de proteína que se requería para realizar los siguientes experimentos programados. La proteína recombinante purificada se obtuvo a homogeneidad, la cual fue visualizada en un gel SDS-PAGE al 12%; rEnoHi se observa como una única banda con tamaño aproximado de 52 kDa, (Figura 1 A, B), del cual aproximadamente 6 kDa corresponden a la fusión de etiquetas de histidina, como se describe en un trabajo previo (Osorio Aguilar, 2018).

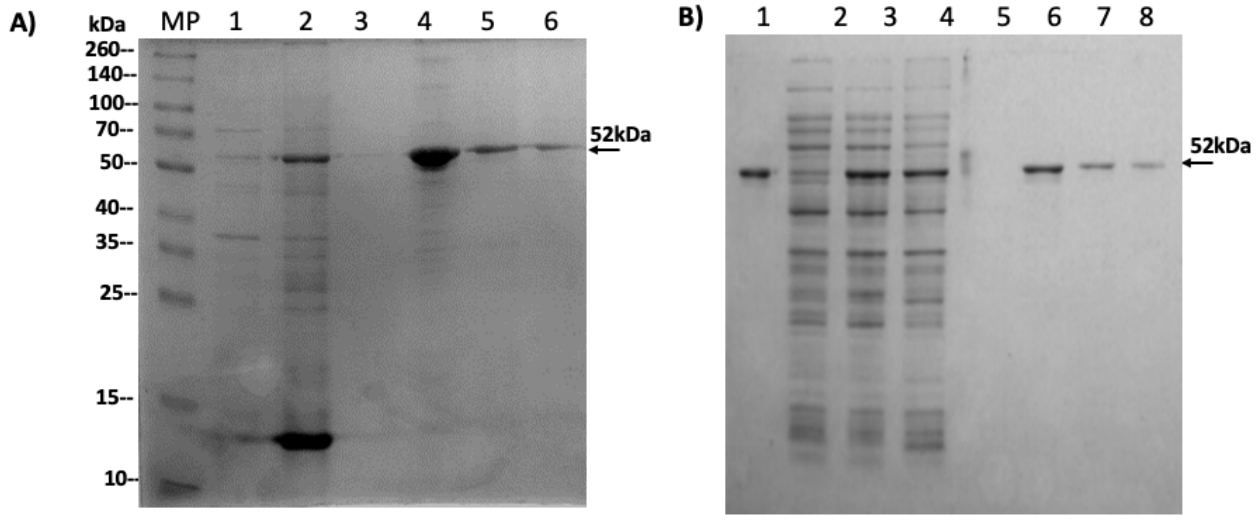


Figura 1. A) Expresión y purificación de rEnoHi visualizada a través de Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE) al 12%. MP: marcador de peso molecular; Carril 1: No inducido; Carril 2: Inducido; Carril 3: Solución de lavado; Carriles 4-6: rEnoHi purificada 52 kDa**. B)** Carril 1: C+; Carril 2: No inducido; Carril 3: Inducido; Carril 4: pastilla; Carril 5: Solución de lavado; Carriles 6-8: rEnoHi purificada.

9.2. Interacción de rEnoHi con proteínas plasmáticas

Como se ha mencionado anteriormente uno de los principales objetivos era identificar el papel de la enolasa como proteína de unión a plasminógeno humano, una forma indirecta de evaluar esta interacción fue utilizando plasma sanguíneo. Por tal motivo, se obtuvo plasma sanguíneo de 3 voluntarios clínicamente sanos, se separaron las proteínas plasmáticas totales en donde el plasminógeno se encuentra a una concentración de 200 mg/L y se sometieron a ensayos de Far Western Blot y ELISA, para evaluar la interacción proteína-proteína

Las proteínas plasmáticas (Pp) de los 3 voluntarios clínicamente sanos y rEnoHi fueron migradas en un gel SDS-PAGE al 7,5%, en donde se observa el patrón electroforético esperado y una sola banda para rEnoHi purificado, con un peso aproximado de 52 kDa (Figura 2 A). Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó y posteriormente se incubó con rEnoHi. La interacción rEnoHi-Proteínas plasmáticas (Pp) se identificó utilizando anticuerpos policlonales anti-rEnoHi. En la membrana se observa una banda con un peso aproximado de 92 kDa, la cual podría corresponder al plasminógeno humano; además de la banda de 52 kDa correspondiente a rEnoHi (control positivo). Se visualizaron bandas adicionales por debajo de 92 kDa, sin embargo, desconocemos a qué proteínas podrían corresponder (Figura 2 A, B). No se detectó señal de unión cuando la membrana se incubó con BSA como control negativo, ya que solo se observa la banda del control positivo (Figura 2 C). Por otra parte, los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA mostraron que rEnoHi se unió significativamente a Pp, en comparación con el control negativo (Figura 3).

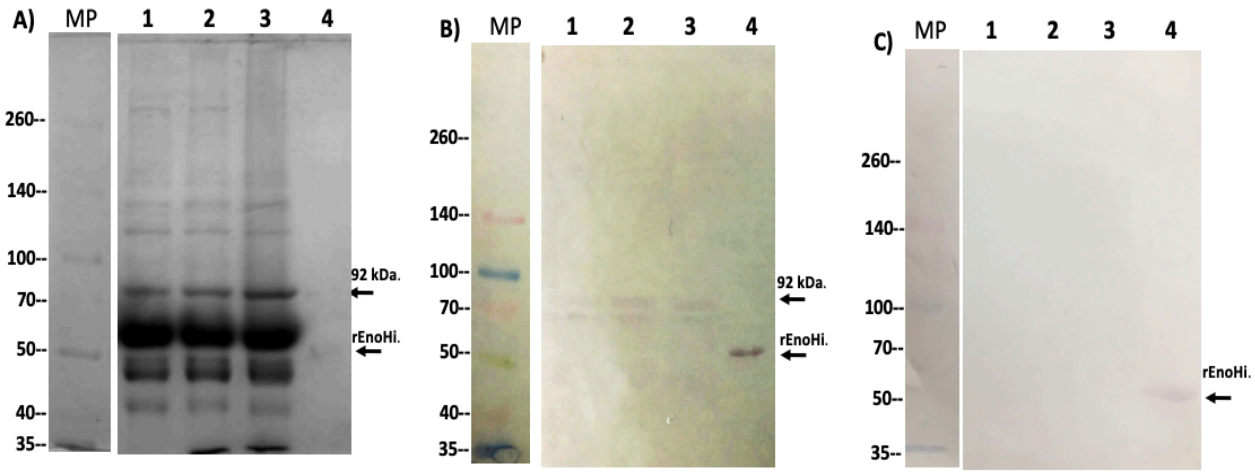


Figura 2. A) SDS-PAGE 7,5 % de las proteínas totales de plasma humano. MP: marcador de peso; carril 1: Muestra voluntario clínicamente sano 1; carril 2: Muestra voluntario clínicamente sano 2; carril 3: Muestra voluntario clínicamente sano 3; carril 4: rEnoHi. **B) Inmunodetección de la interacción rEnoHi-Proteínas plasmáticas de humano, mediante Far-Western Blot** con anticuerpos policlonales anti rEnoHi. MP: marcador de peso; carril 1: M1 carril 2: M2; carril 3: M3; carril 4: rEnoHi. Flecha indica probable interacción rEnoHi-plasminógeno (92 kDa). **C)** Control negativo (Membrana no se incubó con rEnoHi).

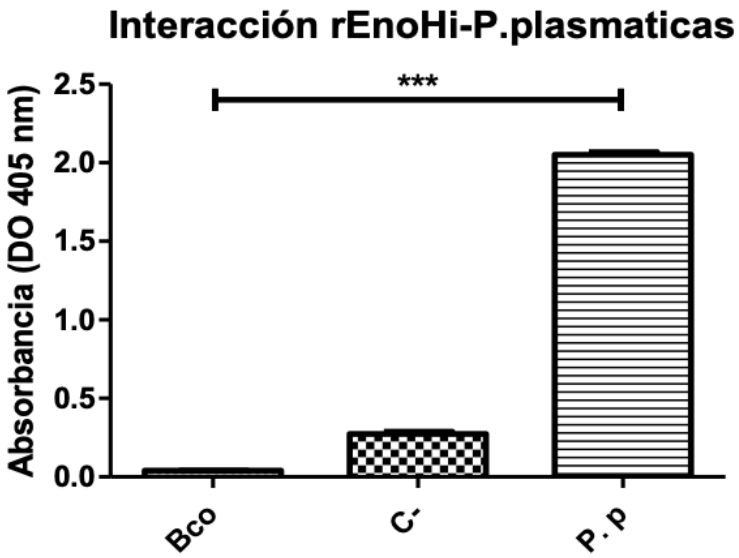


Figura 3. Detección por ELISA de la interacción de rEnoHi con proteínas plasmáticas de humano utilizando anticuerpos policlonales anti rEnoHi. Bco: blanco; C-: Control negativo (albumina); P.p: proteínas plasmáticas. Los datos representan la desviación estándar promedio ± SD, de tres experimentos independientes, (*p<0.001): C- VS P. plasma.

9.3. Interacción de rEnoHi con Plasminógeno humano

Se realizaron ensayos de Far Western Blot, con plasminógeno humano comercial. Inicialmente, el Plg humano (5 y 10 µg) o rEnoHi (3 µg), fueron migradas en un SDS-PAGE al 10%, en donde visualizamos las bandas correspondientes a cada proteína (Figura 4 A), dichas proteínas fueron electrotranferidas a una membrana de nitrocelulosa y se prosiguió con la técnica de Far Western Blot descrita anteriormente. La interacción rEnoHi-Plg se identificó con anticuerpos policlonales de ratón anti-rEnoHi, se visualizó una señal correspondiente al peso de plasminógeno, así como la señal correspondiente al peso de rEnoHi (control positivo) (Figura 4 B), lo que indica que rEnoHi se une a Plg. No se detectó señal positiva cuando la membrana se incubó con BSA como control negativo (Figura C).

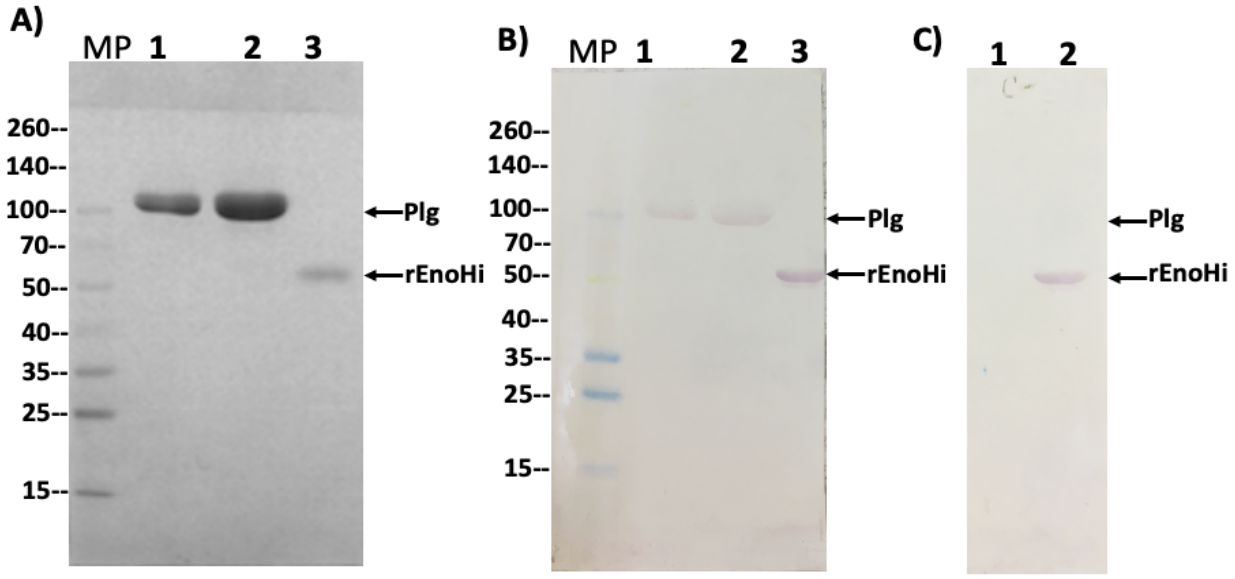


Figura. 4 A) SDS-PAGE 10% de la interacción de rEnoHi con Plasminógeno humano. MP: marcador de peso molecular; Carril 1: Plg 5 µg; Carril 2: Plg 10 µg; Carril 3: rEnoHi **B) Inmunodetección mediante FAR-Western Blot de la interacción rEnoHi-Plg** revelada con Ac policlonales anti rEnoHi. MP: marcador de peso molecular; Carril 1-2: interacción rEnoHi-Plg; Carril 3: rEnoHi **C)** Control negativo [Membrana incubada con Albumina Bovina Sérica (BSA)]: Carril 1: Plg; Carril 2: rEnoHi.

Los resultados observados en los ensayos Far Western-Blot fueron consistentes con los resultados obtenidos en los ensayos por ELISA, en donde observamos que rEnoHi se une de manera significativa al Plg, en comparación con el control negativo (BSA) y esta

interacción es dependiente de la concentración del Plg (Figura 5 A). Adicionalmente, al realizar los experimentos de inhibición mediante la adición de diferentes diluciones de anticuerpos policlonales anti-rEnoHi (1/100–1/40,000), los resultados mostraron que la adición de concentraciones crecientes de anticuerpos anti-rEnoHi, condujo a una disminución en la interacción de rEnoHi a Plg, y esta disminución es dependiente de la concentración de anticuerpos en la solución, además se observa una diferencia estadísticamente significativa con el suero preinmune (control negativo) (Figura 5 B).

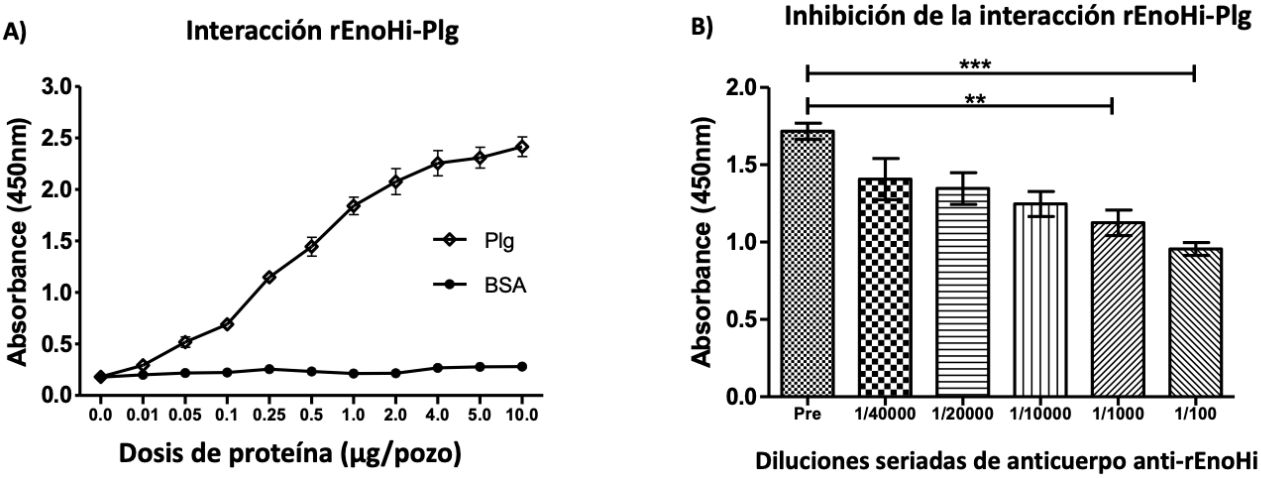


Figura 5. A) Ensayos de unión a plasminógeno. Los resultados por ELISA indican que el plasminógeno (Plg) se une a la enolasa recombinante purificada (rEnoHi) de una manera dependiente de la concentración de Plg (0.01- 10 µg/pozo); se usó Albumina Bovina Sérica (BSA) como control negativo. **B) Detección por ELISA de la inhibición de la interacción de rEnoHi-Plg**, con anticuerpos policlonales anti rEnoHi a diferentes diluciones (1/40,000-1/100). Los datos representan la desviación estándar promedio ± SD, de tres experimentos independientes (*P<0.001): Dilución 1/100 VS Preinmune; (*P<0.01): Dilución 1/1000 VS Preinmune.

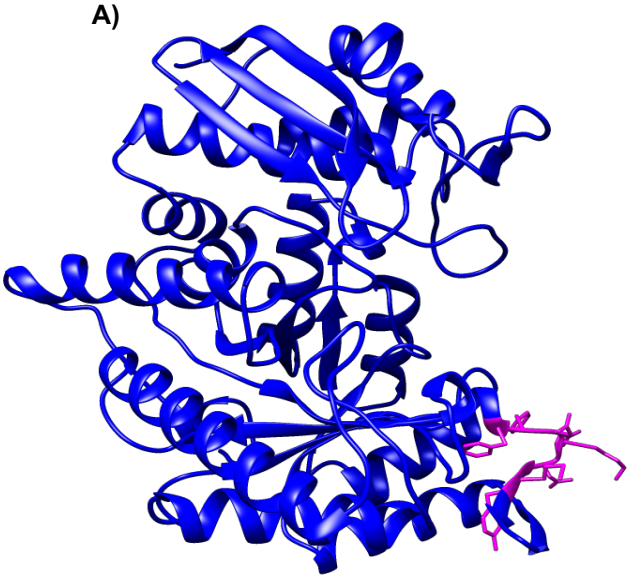
Por otra parte, una vez que se confirmó de manera *in vitro* que rEnoHi interacciona con el plasminógeno humano, el siguiente objetivo era identificar de manera *in silico,* como se podría estar llevando a cabo esta interacción y cuáles eran los principales residuos involucrados.

9.4. Modelado de la estructura de la enolasa de *H. influenzae*

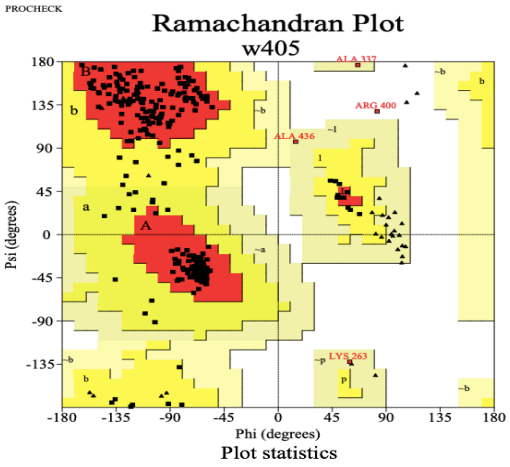
Hasta el momento, la estructura cristalizada de la enolasa de *H. influenzae* no se encuentra disponible en las bases de datos, por lo tanto; se procedió a realizar el modelado por homología de la enolasa de *H. influenzae* no tipificable (NTHiENO) (GenBank: MF405339.1) mediante Pryre2 (Kelley *et al*., 2015) utilizando como plantilla, la enolasa de *E. coli* (PDB: ID 2FYM)*(Chandran & Luisi, 2006), la cual tiene un valor de resolución de 1,60 Å.*

La estructura obtenida, mejor resuelta, fue el monómero de la enolasa y se visualizó con el programa Chimera (Pettersen *et al*., 2004) (Figura 6 A). Debido a la alta identidad de la plantilla utilizada con NTHiENO que fue del 85%, indica que es una plantilla adecuada para el modelado. La evaluación del modelo de NTHiENO mediante PROCHECK muestra valores en el diagrama de Ramachandran del 99,7% (Figura 6 B), lo que indica que las conformaciones de los residuos de aminoácidos se encuentran dentro de las regiones más favorecidas o permitidas. A su vez, el diagrama de Ramachandran indica que el parámetro estereoquímico Phi-Psi es ideal para el modelo propuesto. El valor QMEAN (grado de natividad o autenticidad) fue -0,10, *Z-score <1* y los valores del puntaje de la calidad global, como son las interacciones de Cβ (-0,67), interacciones entre todos los átomos (-1,39), potencial de solvatación (0,77) y ángulo de torsión (-0,16), fueron muy cercanos al valor de 0 (Figura 6 C). Estos valores muestran la buena calidad del modelo. El resultado del modelo por ProSA obtuvo un valor de *Z-score* de −8,74, lo que indica que se encuentra dentro del rango de puntuaciones normales para proteínas nativas de estructuras de tamaño similar obtenidas por rayos X y RMN (Figura 6 D). El conjunto de estos datos sugiere que este modelo puede considerarse válido para el ensayo de acoplamiento molecular.

A)



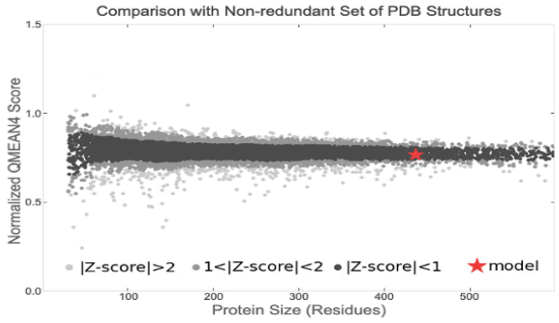
B)

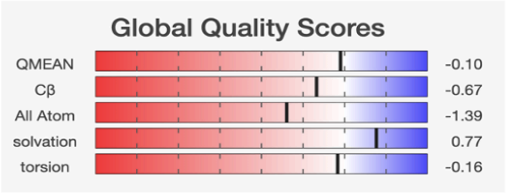


Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	341	89.5%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	36	9.4%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	3	0.8%
Residues in disallowed regions	1	0.3%
Number of non-glycine and non-proline residues	381	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	44	
Number of proline residues	10	
Total number of residues	437	

C) QMEAN4 Value: -0.10





D) Overall model quality
Z-Score: -8.74

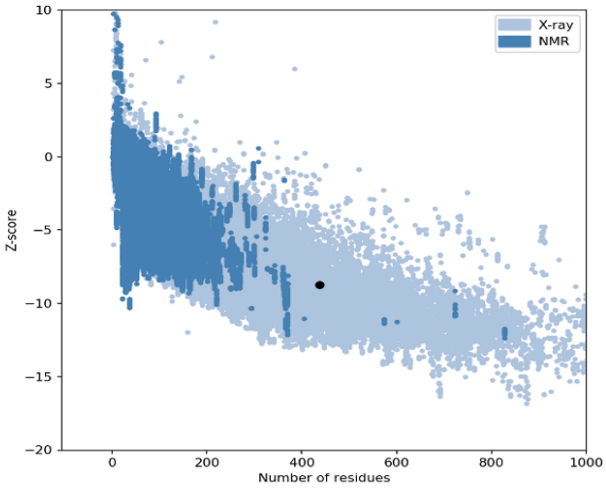


Figura 6. A) Representación tridimensional del modelado por homología de la enolasa de *H. influenzae* obtenido por Phyre2 y visualizado por Chimera. La estructura secundaria, las hélices alfa y las laminas beta están coloreadas en azul y el motivo putativo de unión al plasminógeno se muestra en rosa. **B) Análisis del diagrama de Ramachandran del modelo teórico de la enolasa de *H. influenzae***. Todos los residuos, excepto Gly y Pro, se muestran como puntos cuadrados ubicados en las regiones más favorecidas (89,5% en el área roja), regiones adicionales permitidas (9,4% en el área amarillo intenso), regiones generosamente permitidas (0,8% en el área amarillo claro) y regiones no permitidas (0,3% en el área blanca). **C) Gráfico de puntuación QMEAN** normalizada que muestra el valor de *Z-score* < 1, y la posición del modelo de NTHiENO (estrella roja) en el conjunto de estructuras cristalizadas utilizadas para la evaluación. Los puntajes de la calidad global: rojo (peor) y azul (mejor) **D) Análisis de ProSA** (el punto negro representa el *Z-score* del modelo de NTHiENO.

9.5. Acoplamiento molecular de NTHiENO y Plg

El resultado obtenido con PatchDock para el acoplamiento proteína-proteína indicó que NTHiENO y Plg (4A5T) exhibieron complementariedad de superficie y que el supuesto motivo de unión al plasminógeno está presente en el área de la interfaz, lo que sugiere que podría participar en la interacción (Figura 7). El valor ACE (energía de contacto atómico) del modelo fue de -101,53, la afinidad de unión (Kcal/mol) de -21,3 y Kd (M) a 37.0 ℃ de 1.0×10^{-15}.

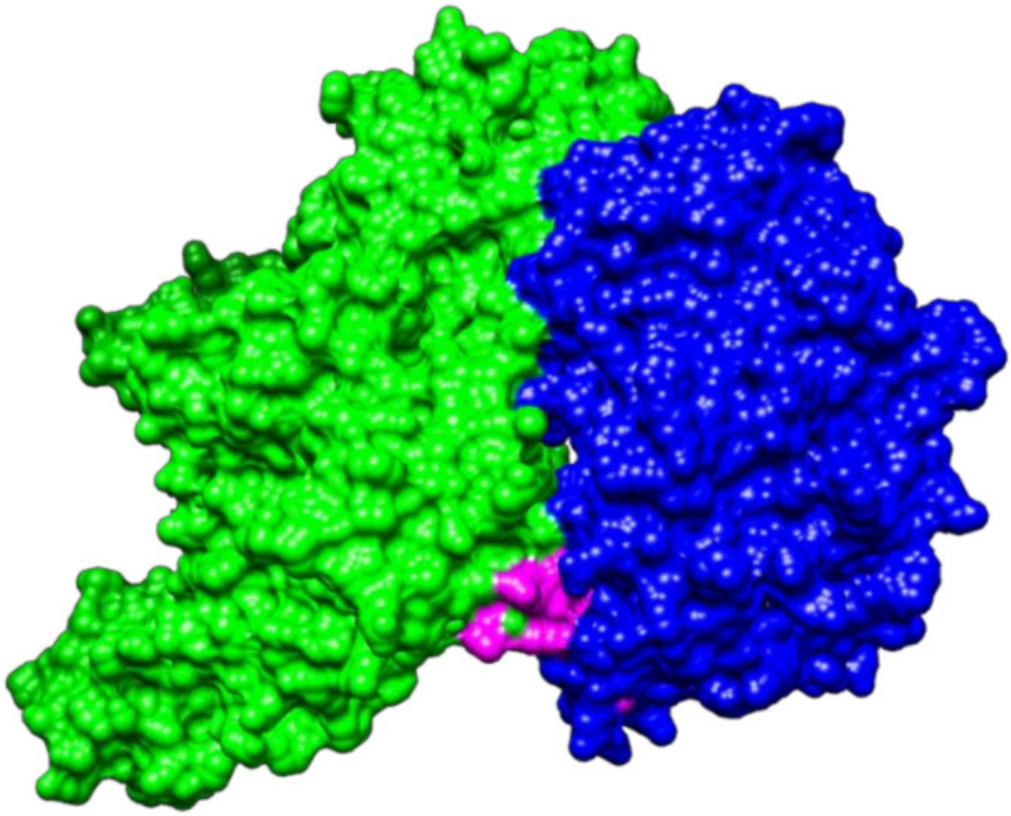


Figura 7. Acoplamiento proteína-proteína de NTHiENO y Plg humano por PatchDock. Las interacciones se muestran como representaciones de superficie. NTHiENO se muestra en azul, el motivo putativo de unión al plasminógeno se muestra en rosa y Plg humano (ID de PDB: 4A5T) se muestra en verde.

9.6. Identificación del dominio putativo de unión al plasminógeno en NTHiENO

El alineamiento por CLUSTAL O, de las enolasas en las cuales el motivo de unión a Plg ya ha sido bien caracterizado y el motivo putativo presente en NTHiENO correspondiente a (252 FYNKENGMY 260), mostró un porcentaje de identidad del 53,85% con *S. pneumoniae*, seguida de *L. mexicana* con 46,5 % y un menor porcentaje con *B. henselae* de 38,36 %. Aunque el motivo de unión a plasminógeno de NTHiENO presenta algunas diferencias en la secuencia de aminoácidos con respecto al motivo de las otras enolasas, los principales residuos responsables de la interacción mantienen tanto las cargas positivas como las cargas negativas (Figura 8 A). Solo la región correspondiente al motivo de unión al plasminógeno se muestra en todas las enolasas alineadas.

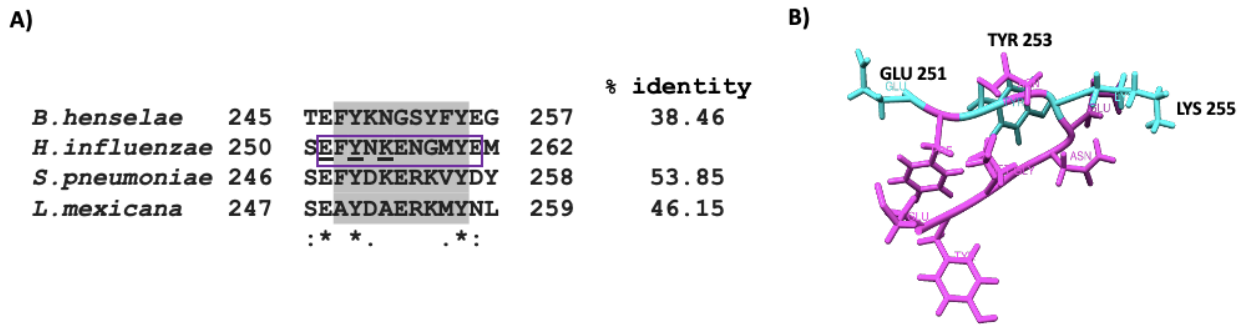


Figura 8. Región correspondiente al motivo de unión al plasminógeno en diferentes enolasas. A) Alineamiento por CLUSTAL O, del motivo de unión al plasminógeno de las enolasas de *S. pneumonia, L. mexicana, B. henselae*, y el motivo putativo de unión al plasminógeno de NTHiENO (resaltado en gris); el alineamiento mostró un porcentaje de identidad del 53,85, 46,15 y 38,46%, respectivamente. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias están marcados con asteriscos; las sustituciones conservativas y semiconservativas se etiquetan con dos puntos o uno respectivamente; pbmHiENO (recuadro morado) y los residuos de unión de Plg propuestos están subrayados. **B)** muestra el péptido de 11 aminoácidos (1EFYNKENGMYE 11) (pbmHiENO) obtenido con el software Gauss View 5.0, visualizado por Chimera, equivalente a la posición 251-261 de NTHiENO. Los residuos de unión a Plg se resaltan en color cian (GLU 251, TYR 253 y LYS 255).

9.7. Obtención del Péptido pbmHiENO

El sitio de unión al plasminógeno de las enolasas estudiadas, en la mayoría de los organismos patógenos, es la lisina C-terminal(Vanegas *et al*., 2007); sin embargo, para el caso la enolasa de *H. influenzae* de cepas tipificables y no tipificables no se identificó el residuo de lisina C-terminal, no obstante, sí presenta el motivo putativo para la unión al plasminógeno (Osorio Aguilar, 2018). Además, de acuerdo con los análisis realizados por PatchDock, este motivo se encuentra expuesto en la estructura de la enolasa, y se observa en la región de interfaz de la interacción proteína-proteína; por lo que podría actuar como un sitio de unión al plasminógeno. Por tal motivo, y para hacer el análisis más sensible y específico, decidimos realizar un análisis de acoplamiento molecular proteína-ligando, para predecir si este motivo (252FYNKENGMY 260) tiene un papel en la interacción con el plasminógeno humano e identificar los residuos importantes para esta interacción.

Así qué, se trabajó la estructura 3D de NTHiENO utilizando el software Gauss View 5.0 y se obtuvo solamente el péptido de 11 aminoácidos: (1EFYNKENGMYE 11) (pbmHiENO), equivalente a la posición 251-261 en la secuencia de NTHiENO, este péptido contiene un aminoácido adicional en los extremos amino y carboxilo-terminal, para mantener la estructura tridimensional nativa (Figura 8 B), y se utilizó como ligando para realizar ensayos de Blind Docking.

9.8. Acoplamiento molecular de pbmHiENO- Plg

Los sitios de unión de pbmHiENO con Plg se evaluaron mediante Blind Docking, para lo cual se utilizó la estructura cristalizada del plasminógeno humano disponible en la base de datos del Protein Data Bank (PDB ID 4A5T). La búsqueda de dominios conservados *kringle* en el plasminógeno humano proporcionaron los siguientes datos: K1 (82–164), K2 (166–243), K3 (256–333), K4 (356–437) y K5 (460–541). Estas regiones se utilizaron como objetivos del ligando (pbmHiENO), para realizar el Blind Docking mediante el programa AutoDock Vina.

Los resultados del acoplamiento proteína-ligando mostraron que pbmHiENO y el plasminógeno humano presentan complementariedad de superficie en los dominios K2, K3 y K5 (Figura 9 A-C). Se obtuvieron múltiples modelos; sin embargo, solo se eligieron aquellos que mostraron las mejores poses, con la mejor afinidad de unión (kcal/mol), así como los modelos con interacciones caracterizadas por la formación de puentes de hidrógeno.

Según los resultados del acoplamiento molecular, pbmHiENO mostró una mayor afinidad por los dominios K2, K3 y K5, con una afinidad de unión kcal/mol de -3,9, -4,4 y -4,8, respectivamente. La interacción pbmHiENO-Plg presentó estabilidad conformacional generada por puentes de hidrógeno y otras fuerzas intermoleculares ejercidas por múltiples residuos de plasminógeno (Figura 9 D–F).

En estos análisis se identificaron tres residuos importantes en NTHiENO, esenciales para la interacción con Plg a través de la formación de cuatro enlaces de hidrógeno correspondientes a enoTYR253 -plgGLU1 (K2), enoTYR253 -plgGLY310 (K3), y enoLYS255 -plgARG471 / enoGLU251 -plgLYS468 (K5), equivalentes a TYR 3, LYS 5 y GLU 1 en pbmHiENO (Figura 9 G-I). El resumen de los datos se muestra en la tabla 2, y el resto de los aminoácidos del plasminógeno que participan en la interacción se muestran en la tabla 3.

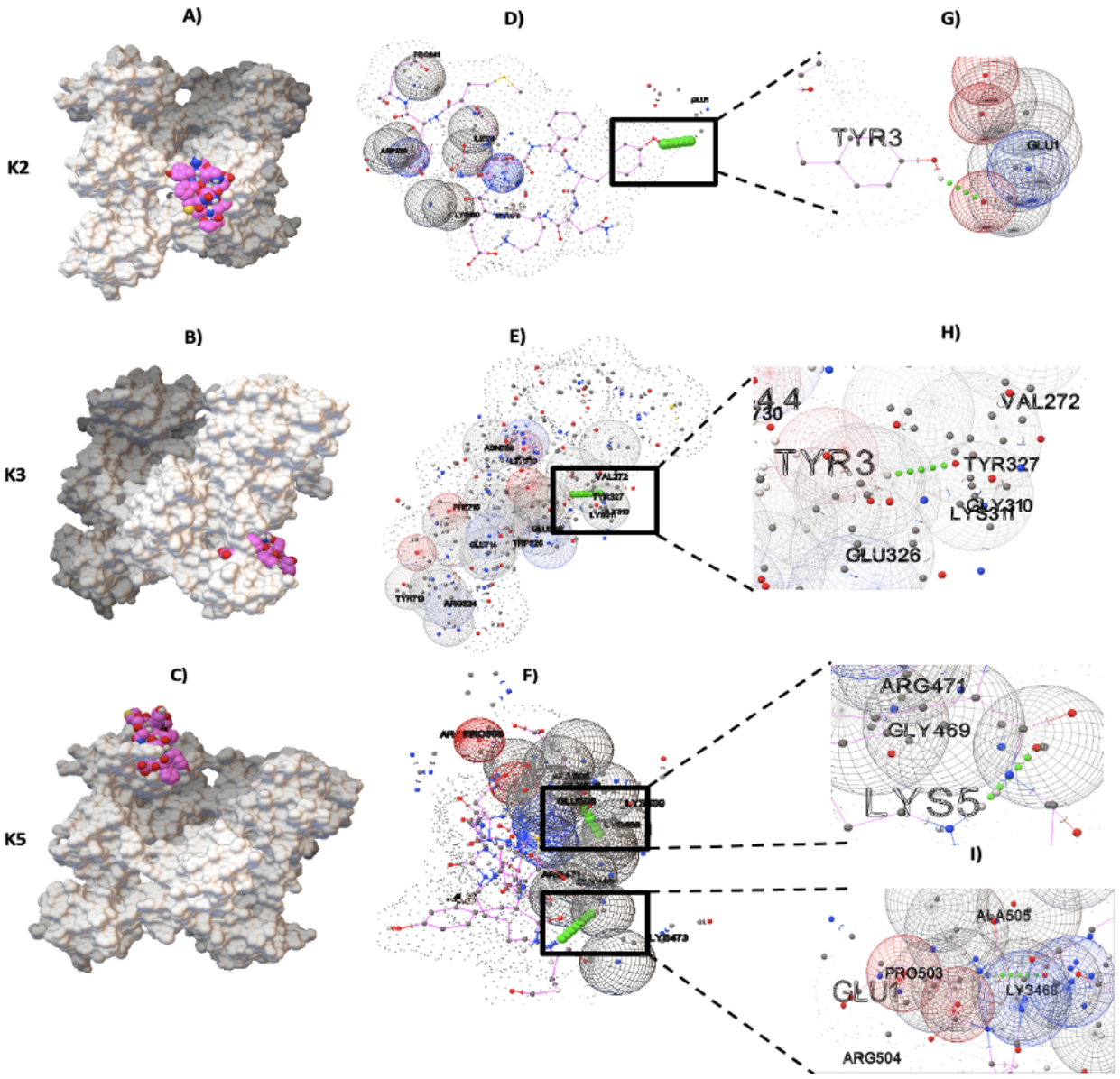


Figura 9. Sitios de unión al plasminógeno (PDB ID: 4A5T) con pbmHiENO utilizando AutoDock Vina. A-C) La interacción proteína-ligando se muestra en una representación de superficie, con pbmHiENO (mostrado en rosa; las esferas azul, roja y amarilla correspondientes a los átomos de N, O y S, respectivamente) unidos a los dominios *kringle* de Plg (K2, K3 y K5) mostrados en gris**. D-F)** La interacción de pbmHiENO (cadena punteada) con los dominios *kringle* de Plg, se muestra mediante la formación de cuatro puentes de hidrógeno (esferas verdes pequeñas en un recuadrado), junto con otros residuos de plasminógeno involucrados en la interacción (esferas grandes). **G-I)** Los residuos importantes para la interacción corresponden a K2: enoTYR253-plgGLU1, K3: enoTYR253-plgGLY310 y K5: enoLYS255-plgARG471/enoGLU251-plgLYS468. (Estos residuos son equivalentes a TYR3, LYS5 y GLU1 en pbmHiENO).

Tabla 2. Resultados de Blind Docking para residuos de NTHiENO que se unen a los dominios *kringle* de plasminógeno.

Dominio *Kringle* de Plg(4A5T)	Residuos en NTHiENO	Residuos en pbmHiENO	Residuos en Plg	Puentes de Hidrogeno	Energía de afinidad (Kcal/mol)
K2	TYR 253	TYR 3	GLU 1	1	-3.9
K3	TYR 253	TYR 3	GLY 310	1	-4.4
K5	LYS 255 GLU 251	LYS 5 GLU 1	ARG 471 LYS 468	2	-4.8

Tabla 3. Aminoácidos del plasminógeno que participan en la interacción pbmHiENO-Plg

Dominio *Kringle*	Residuos de aminoácidos de Plg
K2	GLU1, ILE178, SER179, LYS180, ASP39 y PRO241
K3	VAL 272, GLY 310, LYS 311, ARG 324, TRP 325, GLU 326, TYR 327, TYR 713, GLU 714, PHE 715, LEU 730 y ASN 769.
K5	LYS 468, GLY 469, ARG 471, LYS 473, PRO 503, ARG 504, ALA 505, GLY 506, GLU 508, y LYS 509.

9.9. Análisis de acoplamiento en controles positivo

La optimización de los ensayos realizados por AutoDock Vina, se midió calculando la desviación cuadrática media (RMSD) de las coordenadas de los átomos de la estructura del ligando cristalizado con respecto a la pose acoplada, mediante el software SPDV. AutoDock Vina acopló con éxito los complejos ligando-proteína que se utilizaron como controles positivos. La conformación acoplada con los valores de las poses mejor puntuadas mostró un RMSD de 89M/pose acoplada (0,61 Å), 0E7/pose acoplada (0,65 Å) e IMA/pose acoplada (0,68 Å). Estos valores bajos de RMSD <2,0 Å, así como la afinidad de unión que presentaron los controles positivos (tabla 4), aportan información sobre la confiabilidad del software en la predicción de interacciones observadas para pbmHiENO y plasminógeno humano.

Tabla 4. Resumen de resultados de acoplamiento de controles positivos.

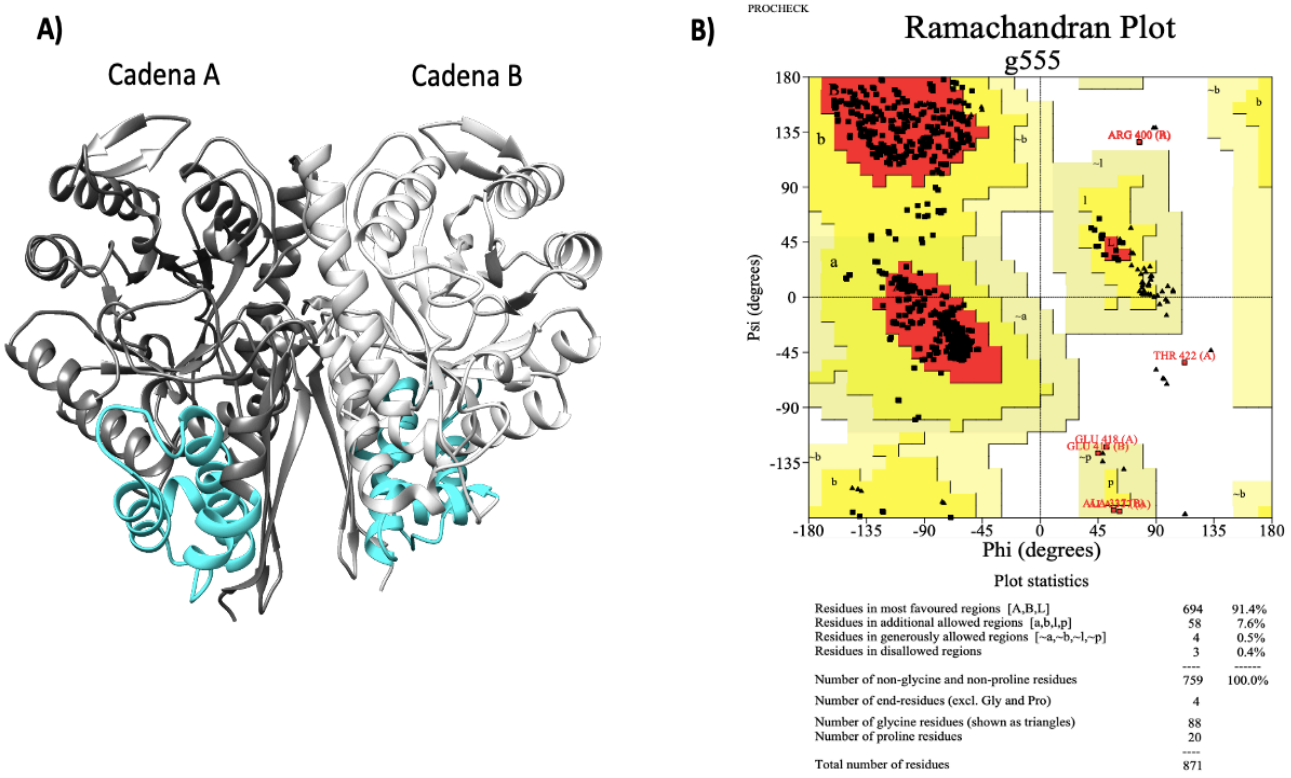
Receptor (PDB ID)	Ligando cristalizado (PDB ID)	Energía de afinidad (Kcal/mol)	RMSD Ligando cristalizado/pose acoplada
Plasmina (5UGG)	89M	-7.8	0.61 Å
Alpha-trombina (1HDT)	0E7	-7.2	0.65 Å
Factor Xa (1LPG)	IMA	-9.1	0.68 Å

Una vez que se confirmó la interacción de NTHiENO con el plasminógeno, el siguiente objetivo fue evaluar la interacción de NTHiENO con algunos componentes de la MEC, al igual que con el plasminógeno, la interacción con las otras proteínas se realizó mediante ensayos *in vitro* e *in silico.*

9.10. Modelado de la estructura dimérica NTHiENO

El modelado por homología del dímero de NTHiENO (GenBank: MF405339) se construyó mediante la plataforma SWISS-MODEL, y la estructura obtenida se visualizó con el programa Chimera (Figura 10 A). Como plantilla se utilizó el homo dímero cristalizado de la enolasa de *E. coli* (PDB ID 6BFY), el cual presenta un valor de resolución de 1,81 Å (Krucinska *et al*., 2019) y mostró un 85,61 % de identidad con NTHiENO. La estructura del modelo se analizó mediante PROCHECK; el diagrama de Ramachandran muestra valores de 91,4 % para las regiones más favorecidas, 7,6 % para regiones adicionales permitidas, 0,5 % para regiones generosamente permitidas y 0,4 % para regiones no permitidas (Figura 10 B), por lo que los valores indican que las conformaciones principales de los residuos de aminoácidos se encuentran dentro de las regiones más favorecidas o permitidas y que el parámetro estereoquímico Phi-Psi es ideal para el modelo propuesto. El resultado del modelo por ProSA obtuvo un valor *Z-score* de -9,05, que se encuentra dentro del rango de puntajes típicos para proteínas nativas de un tamaño similar en estructuras obtenidas por rayos X y RMN (Figura 10 C). Además, el valor QMEAN fue 0,34, *Z-score <1* valores del puntaje de la calidad global y como las interacciones Cβ

(0,99), interacciones entre todos los átomos (0,46), potencial de solvatación (0,59) y ángulos de torsión (-0,02), fueron muy cerca del valor de 0 (Figura 10 D). Estos datos confirman la validez del modelo NTHiENO como dímero.



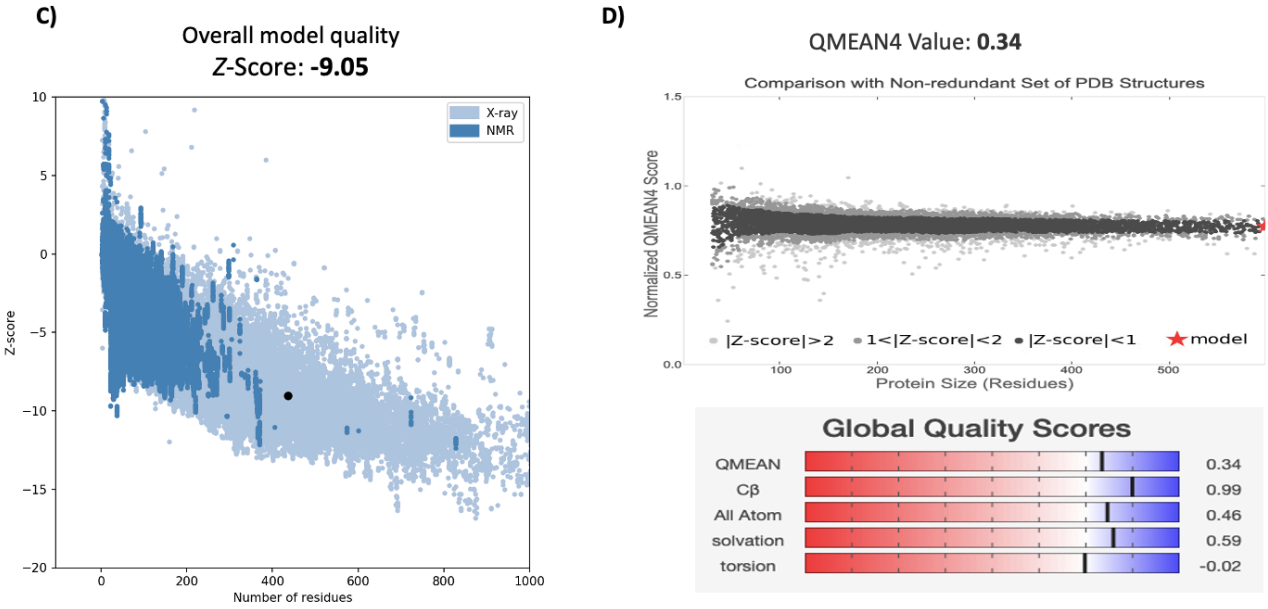


Figura 10. A) Estructura dimérica de NTHiENO obtenida por SWISS-MODEL y visualizada por Chimera. La representación de la estructura 3D se muestran en hélices alfa y laminas beta. Los colores gris oscuro y gris claro representan la cadena A y la cadena B respectivamente (ambos tienen la misma secuencia); mientras que el color cian representa la región de unión putativa al colágeno (72-139), que es equivalente a los residuos de aminoácidos 73-140 de la enolasa de *Lactobacillus plantarum*, identificada como región de unión al colágeno tipo I. **B)** Análisis gráfico de Ramachandran del modelo teórico del dímero de NTHiENO. Todos los residuos, excepto Gly y Pro, se muestran como puntos cuadrados ubicados en las regiones más favorecidas (91,4 % en el área roja), regiones adicionales permitidas (7,6 % en el área amarilla oscura), regiones generosamente permitidas (0,5 % en el área amarilla clara), y regiones no permitidas (0,4% en el área blanca). **C)** Análisis por ProSA (el punto negro representa el *Z-score* del modelo (-9,05) para NTHiENO. **D)** Gráfico de puntaje QMEAN normalizado que muestra el valor *Z- score* >1 y la posición del modelo de NTHiENO (estrella roja) en el conjunto de estructuras PDB utilizadas para la evaluación. Los puntajes de la calidad global: rojo (peor) y azul (mejor).

9.11. Acoplamiento molecular de NTHiENO- Colágeno

Los colágenos se componen de tres cadenas polipeptídicas, llamadas cadenas α, enrolladas en una triple hélice (Ricard-Blum, 2011) el colágeno tipo I se compone típicamente de dos cadenas α1 y una cadena α2 (Rossert & de Crombrugghe, 2002), mientras que el colágeno tipo III es un homotrímero que contiene tres cadenas α1 (Nielsen & Karsdal, 2016). En la base de datos PDB, las tres cadenas α de ambos colágenos se identifican como cadenas A, B y C. Sin embargo, en este estudio, para diferenciarlas de las cadenas A y B de NTHiENO, así como diferenciarlas entre ellas, se decidió renombrarlas como: cadena D (α 1), cadena E (α 1´) y cadena F (α 2) para Cln I y cadena D (α 1), cadena E (α 1´) y cadena F (α 1´´) para Cln III.

El programa HDOCK se utilizó para buscar y analizar las posibles poses de unión entre NTHiENO y colágeno en el espacio 3D. Para NTHiENO-Cln I, se consideraron los primeros 10 mejores resultados de acoplamiento, y observamos que las posiciones de unión entre ambas proteínas eran muy similares entre sí; es decir, se mantuvieron los residuos presentes en la región de la interfaz en la mayoría de los casos, tanto para NTHiENO como para Cln I; solo que en algunas predicciones, en la región de la interfaz participaron principalmente los residuos de la cadena A, y en otras predicciones, se identificaron los mismos residuos, pero de la cadena B del homodímero NTHiENO; es decir, la zona de contacto permaneció en la misma región para ambas proteínas en al menos el 50% de los modelos analizados. El modelo más optimizado se seleccionó en función de la mejor puntuación de energía de acoplamiento, que fue de -249,7. En el caso de las poses de unión entre el complejo NTHiENO-Cln III, también se consideraron los primeros 10 mejores resultados de acoplamiento. La mejor puntuación de energía de acoplamiento fue −213,22, por lo que se seleccionó este modelo.

Estos modelos se visualizaron en Chimera, en ambos modelamientos las proteínas exhibieron complementariedad de superficie y el motivo putativo de unión a colágeno de NTHiENO está presente en el área de la interfaz (Figuras 11 A y 11 B). El área de interfaz en $Å^2$ fue mayor con Cln I que con Cln III, los resultados se muestran en la tabla 5.

Además, los resultados obtenidos por Prodigy mostraron una afinidad de unión (Kcal/mol) de -10.0 y -5.2, y una Kd (M) a 37.0 ℃, de 8.7×10^{-8} y 2.3×10^{-4}, para Cln I y Cln III respectivamente.

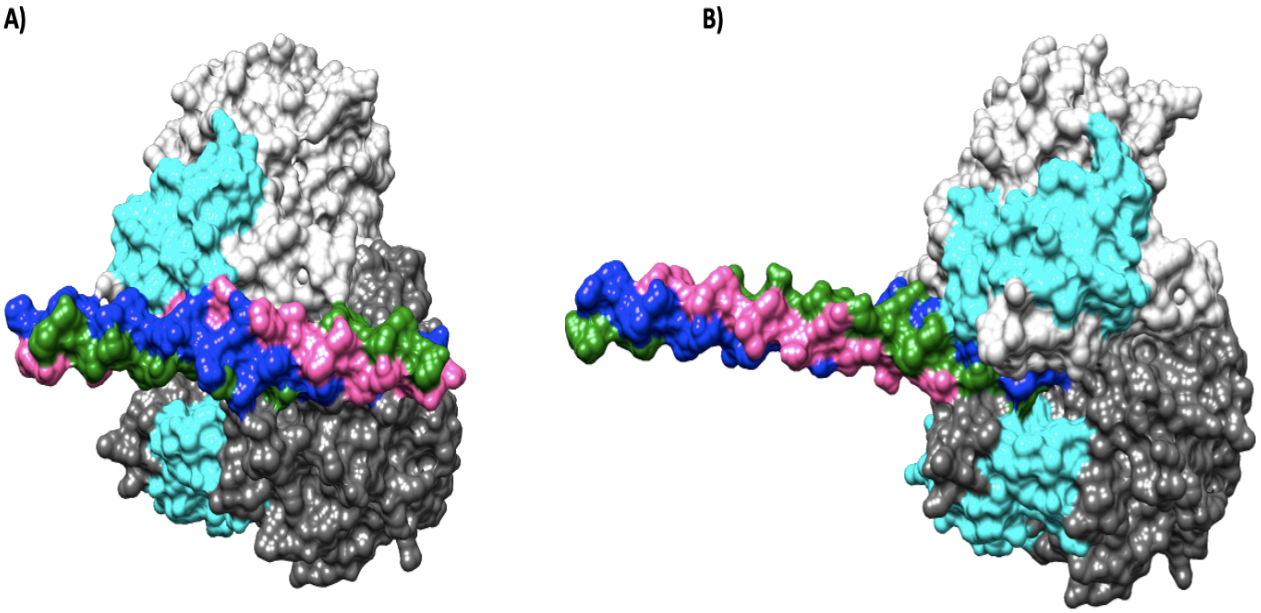


Figura 11. Modelos de interacción del complejo NTHiENO-Colágeno por HDOCK. Las interacciones entre proteínas se muestran como representaciones de superficie. **A)** NTHiENO-Cln I; el homo dímero de NTHiENO se muestra en gris oscuro (cadena A), gris claro (cadena B); la región putativa de unión al colágeno para ambas cadenas se muestra en color cian, y la triple hélice de Cln I (7CWK) se muestra en rosa (cadena α 1), azul (cadena α 1´) y verde (cadena α 2). **B)** Las interacciones de NTHiENO-Cln III se muestran como representaciones de superficie. El homo dímero de NTHiENO en el mismo orden que "A" y la triple hélice de Cln III (6A0A) se muestra en rosa (cadena α 1), azul (cadena α 1´) y verde (cadena α 1´´).

Tabla 5. Resultados resumidos de las interacciones NTHiENO-Cln I.

Cadenas NTHiENO-Cln I	No. de Residuos en la Interfaz	Área de interfaz ($Å^2$)	No. de Puentes salinos	No. de Puentes Disulfuro	No. de Puentes de Hidrógeno	No. de Enlaces Débiles
A-D (α I)	2:2	142:164	1	-	-	5
A-E (α I´)	10:9	423:476	-	-	-	73
A-F (α 2)	6:5	364:394	-	-	1	36
B-D (αI)	10:6	408:511	-	-	1	37
B-E (αI´)	3:1	105:146	-	-	2	18
B-F (α2)	6:3	212:294	-	-	-	25

9.12. Residuos involucrados en la interacción NTHiENO- Cln I

Con la finalidad de evaluar el tipo de interacciones y los principales residuos involucrados en la unión de NTHiENO y Cln I, se analizó el modelo de acoplamiento utilizando la plataforma PDBsum. Los resultados mostraron que NTHiENO y Cln I presentaron estabilidad conformacional generada por puentes de hidrógeno, puentes salinos y otras fuerzas intermoleculares ejercidas por múltiples residuos de ambas proteínas. En los análisis, tres residuos importantes en el homodímero de NTHiENO fueron identificados como esenciales para la interacción a través de la formación de cuatro puentes de hidrógeno correspondientes a TYR235 (cadena A), ASN72 y ASN73 (cadena B) y tres residuos de Cln I GLN10 (cadena α1), ARG11 (cadena α1´) y HYP20 (cadena α2), estos residuos se muestran en la estructura 3D del acoplamiento NTHiENO-Cln I, donde se identificó que los residuos ASN72 y ASN73 de la cadena B pertenecen al motivo putativo de unión al colágeno (Figura 12 A). Además de los cuatro puentes de hidrógeno, se identificó la presencia de un puente salino y 194 enlaces débiles que estabilizan la interacción entre ambas proteínas (Figura 12 B, C). El resumen de los datos se muestra en la Tabla 5.

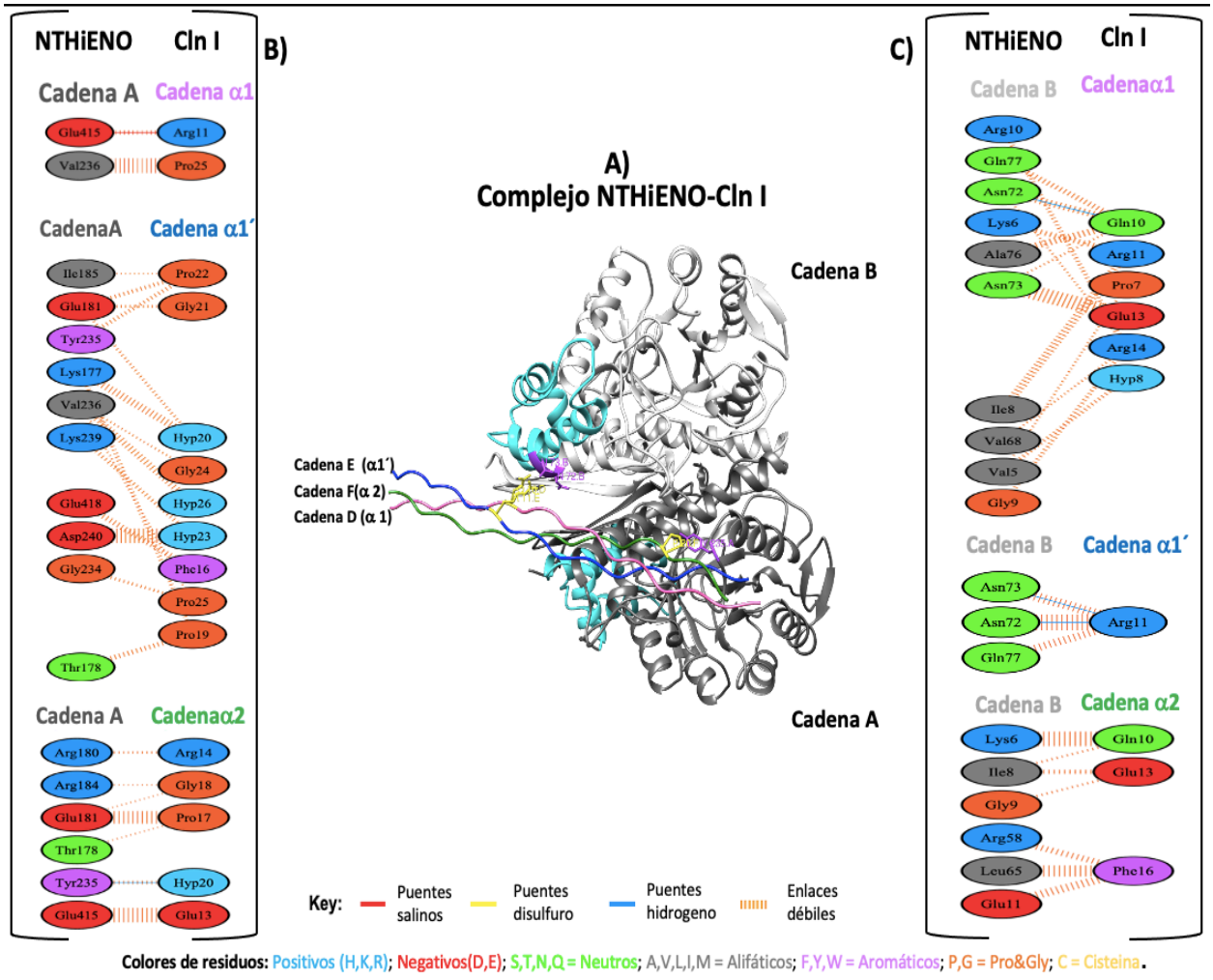


Figura 12. Modelo de interacción del complejo NTHiENO-Cln I. A) NTHiENO se muestra en gris oscuro (cadena A) y gris claro (cadena B), mientras que el color cian representa el motivo de unión a colágeno (72-139). La triple hélice de Cln I (7CWK) se muestra en rosa (cadena D), azul (cadena E) y verde (cadena F), equivalentes a las cadenas α1, α1´ y α2, respectivamente. Los residuos involucrados en la formación de puentes de hidrógeno se representan como barras de color púrpura (enolasa) y amarillo (Cln I). **B)** A la izquierda, gráfico de interacción en PDBsum para el complejo NTHiENO (cadena A)-Cln I (cadenas α1, α1´ y α2). **C)** A la derecha, gráfico de interacción en PDBsum para el complejo NTHiENO (cadena B)-Cln I (cadenas α1, α1´ y α2). Los residuos se muestran en diferentes colores según sus propiedades, y las líneas de colores que unen estos residuos representan el tipo de interacción entre ellos. Para enlaces débiles, el ancho de la línea rayada es proporcional al número de contactos atómicos. El detalle de cada tipo se muestra en la parte inferior de la figura.

9.13. Residuos involucrados en la interacción NTHiENO- Cln III

Para la interacción de NTHiENO y Cln III, el análisis mostró que la unión de ambas proteínas está mediada por tres puentes de hidrógeno y 186 enlaces débiles (Figura 13 B, C), los resultados resumidos se muestran en la tabla 6. En este análisis también se identificaron tres residuos importantes de NTHiENO, para la formación de tres puentes de hidrógeno correspondientes a LEU130, TYR131 y VAL32 de la cadena B y tres residuos de Cln III correspondientes a HYP23, HYP26 y HYP29 de la cadena α1´. Estos residuos se localizan en la estructura 3D del acoplamiento NTHiENO-Cln III, donde se observa que los residuos LEU130 y TYR131 de la cadena B pertenecen al motivo putativo de unión al colágeno (Figura 13 A).

Tabla 6. Resultados resumidos de las interacciones NTHiENO-Cln III.

Cadenas NTHiENO-Cln III	No. de Residuos en la Interfaz	Área de la Interfaz (Å^2)	No. de Puentes Salinos	No. de Puentes Disulfuro	No. de Puentes de Hidrógeno	No. de Enlaces Débiles
A-D (α I)	4:2	145:190	-	-	-	17
A-E (α I´)	2:1	67:91	-	-	-	9
A-F (α I´´)	5:5	228:285	-	-	-	30
B-D(αI)	9:4	292:430	-	-	-	61
B-E(αI´)	10:6	325:412	-	-	3	68
B-F(αI´´)	1:1	38:37	-	-	-	1

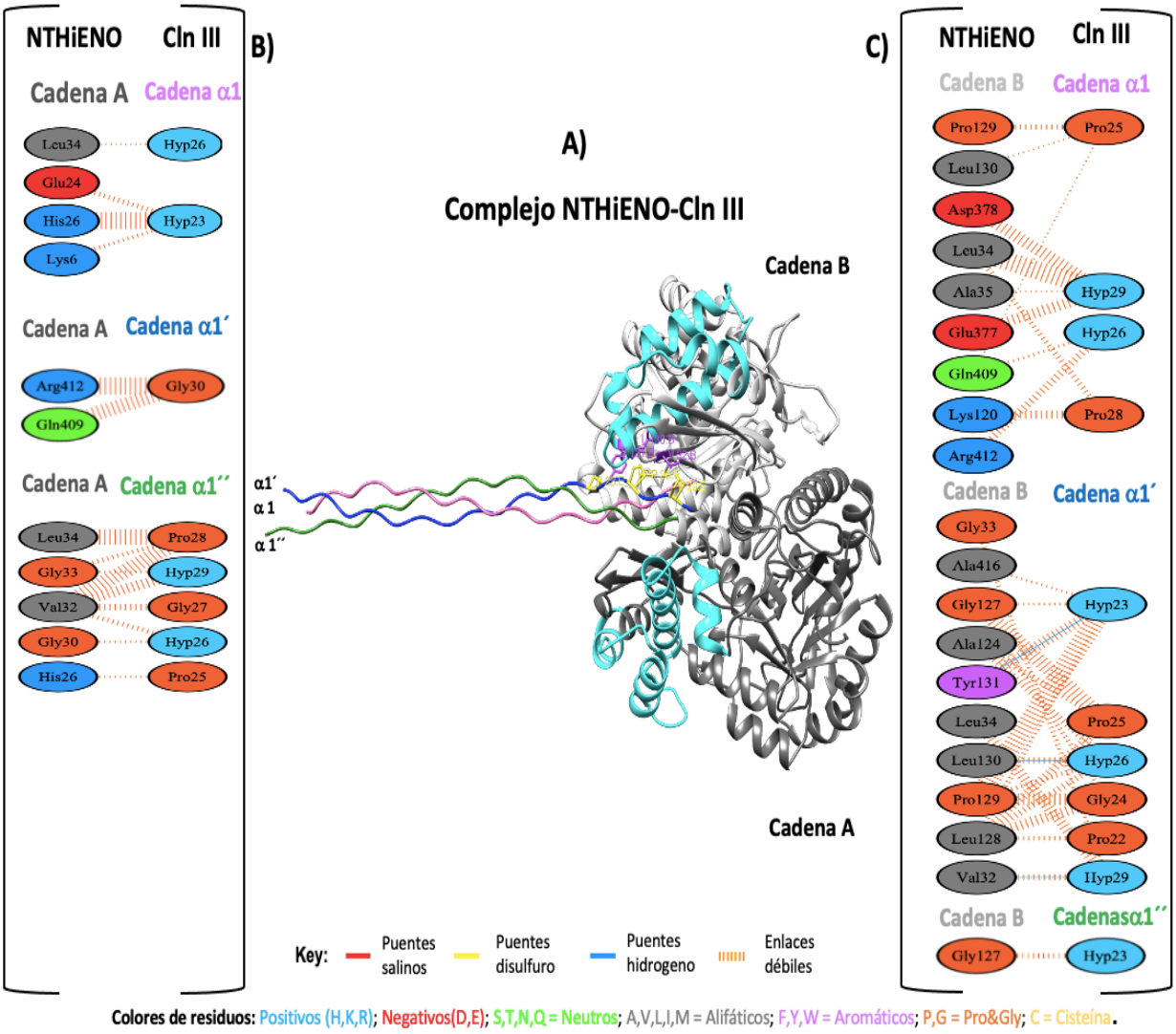


Figura 13. Modelo de interacción del complejo NTHiENO-Cln III. A) NTHiENO se muestra en gris oscuro (cadena A) y gris claro (cadena B), mientras que el color cian representa el motivo de unión a colágeno (72-139), la triple hélice de Cln III (6A0A) se muestra en rosa (cadena D), azul (cadena E) y verde (cadena F), equivalentes a las cadenas α1, α1´ y α1´´ respectivamente. Los residuos involucrados en la formación de puentes de hidrógeno se representan en color púrpura (enolasa) y amarillo (Cln III). **B)** A la izquierda, gráfico de interacción por PDBsum para el complejo NTHiENO (cadena A)-Cln III (cadenas α1, α1´ y α1´´). **C)** A la derecha, gráfico de interacción por PDBsum para el complejo NTHiENO (cadena B)-Cln III (cadenas α1, α1´ y α1´´). Los residuos se muestran en diferentes colores según sus propiedades, y las líneas de colores que unen estos residuos representan el tipo de interacción entre ellos. Para enlaces débiles, el ancho de la línea rayada es proporcional al número de contactos atómicos. El detalle de cada tipo se muestra en la parte inferior de la figura.

9.14. Interacción de rEnoHi- Colágeno

Una vez que identificamos el tipo de interacciones y los posibles residuos de NTHiENO que podrían participar en la unión al colágeno humano tipo I y tipo III, el siguiente objetivo era demostrar si tales interacciones podían observarse en ensayos *in vitro*. Para realizar estos ensayos se utilizó colágeno tipo I purificado de cola de ratón y colágeno tipo III de riñón bovino, los cuales fueron donados por el Dr. José Luis Rosales Encina, adscrito al Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN.

Se utilizó el análisis de transferencia Far-Western para estudiar la unión proteína-proteína. Cln I (cola de ratón), Cln III (riñón bovino) y rEnoHi se migraron en un SDS-PAGE al 7,5 %. Se observó el patrón esperado en cada una de las cadenas polipeptídicas individuales de colágeno, y una sola banda para rEnoHi purificada, con un peso aproximado de 52 kDa (Figura 14 A). Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó y posteriormente se incubó con rEnoHi. La interacción rEnoHi-Cln I y Cln III se identificó utilizando anticuerpos policlonales de ratón anti-rEnoHi. Los resultados mostraron dos señales, una correspondiente al peso de la cadena α1 de Cln I, y otra banda correspondiente al peso de rEnoHi, que se utilizó como control positivo. Para Cln III no se visualizó señal de unión (Figura 14 B), esto indica que rEnoHi se une principalmente al colágeno tipo I y que la interacción puede ser mediada principalmente por la cadena α I; este ensayo se replicó en experimentos independientes y la señal de interacción permanece constante con la cadena α1 de Cln I (Figura 14 C). No se detectó señal de unión a Cln I cuando la membrana se incubó con BSA como control negativo (Figura 14 D)

Finalmente, los resultados obtenidos en los ensayos ELISA, mostraron que rEnoHi se unió significativamente a Cln I de manera dependiente de la concentración, en comparación con el control negativo (caseína), mientras que la interacción con Cln III no tuvo diferencia significativa con respecto al control negativo (Figura 15).

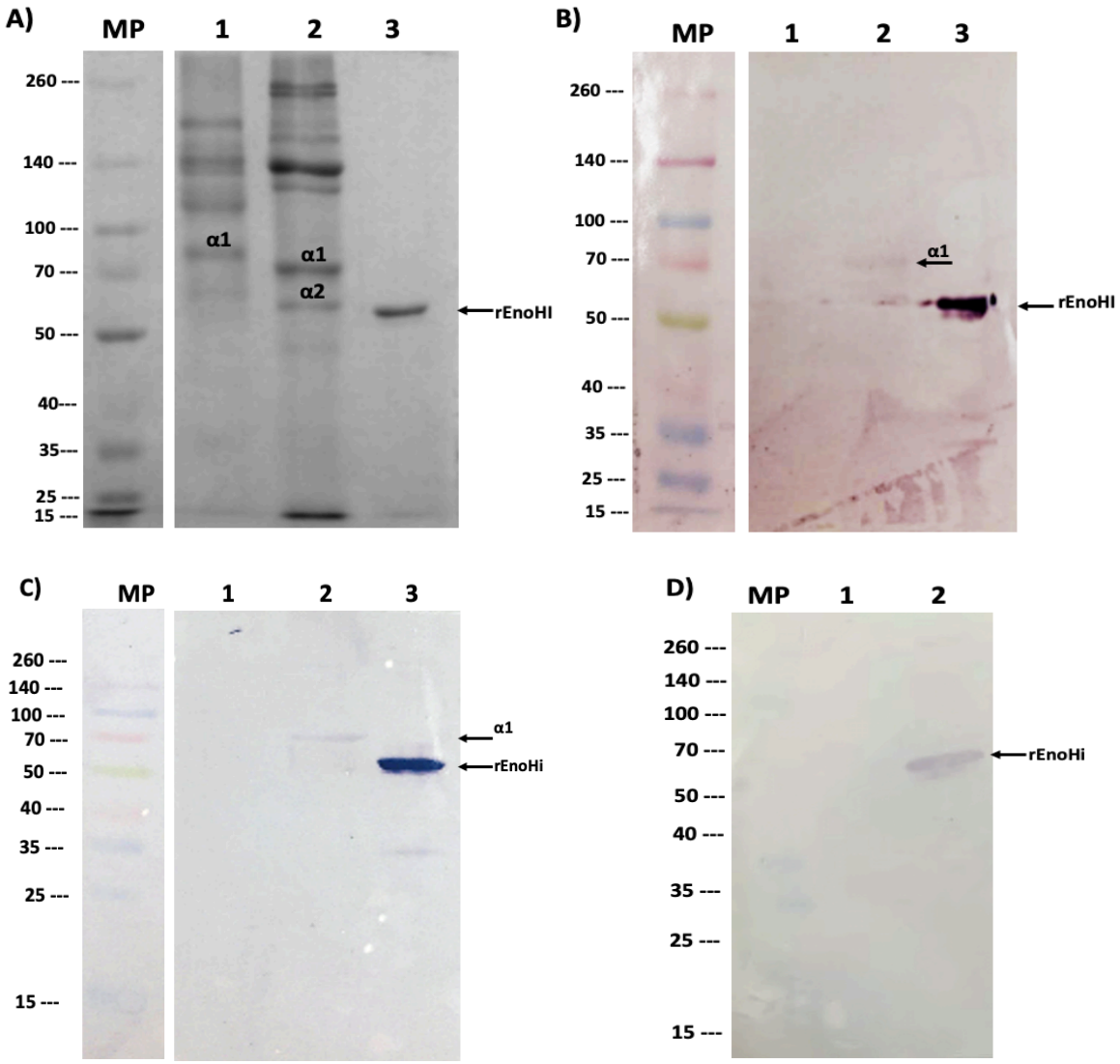


Figura 14. Identificación de la interacción de rEnoHi a colágeno mediante Far Western Blot. **A)** Migración de proteínas en SDS-PAGE 7,5%. MP: marcador de peso; Carril 1: Cln III; Carril 2: Cln I; Carril 3: rEnoHi. En la imagen, las bandas correspondientes a las diferentes cadenas α se identifican en Cln III y Cln I, las bandas no marcadas representan oligómeros de las cadenas α (patrón característico de las colágenas I y III). **B)** Inmunodetección de la interacción rEnoHi-colágeno utilizando anticuerpos policlonales anti-rEnoHi como primer anticuerpo, y como segundo anticuerpo un anti-ratón IgG acoplado a fosfatasa alcalina. MP: marcador de peso; Carriles 1: Cln III; Carril 2: interacción rEnoHi-Cln I (α1); Carril 3: rEnoHi (control positivo) **C)** Identificación de la interacción de rEnoHi a colágeno. Las proteínas se migraron en SDS-PAGE (12%) y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (mismo orden que la figura A. **D)** Control negativo, la membrana solo se incubó con BSA. MP: marcador de peso; Carril 1: Cln I; Carril 2: rEnoHi. La única señal observada corresponde a rEnoHi (52,0 kDa).

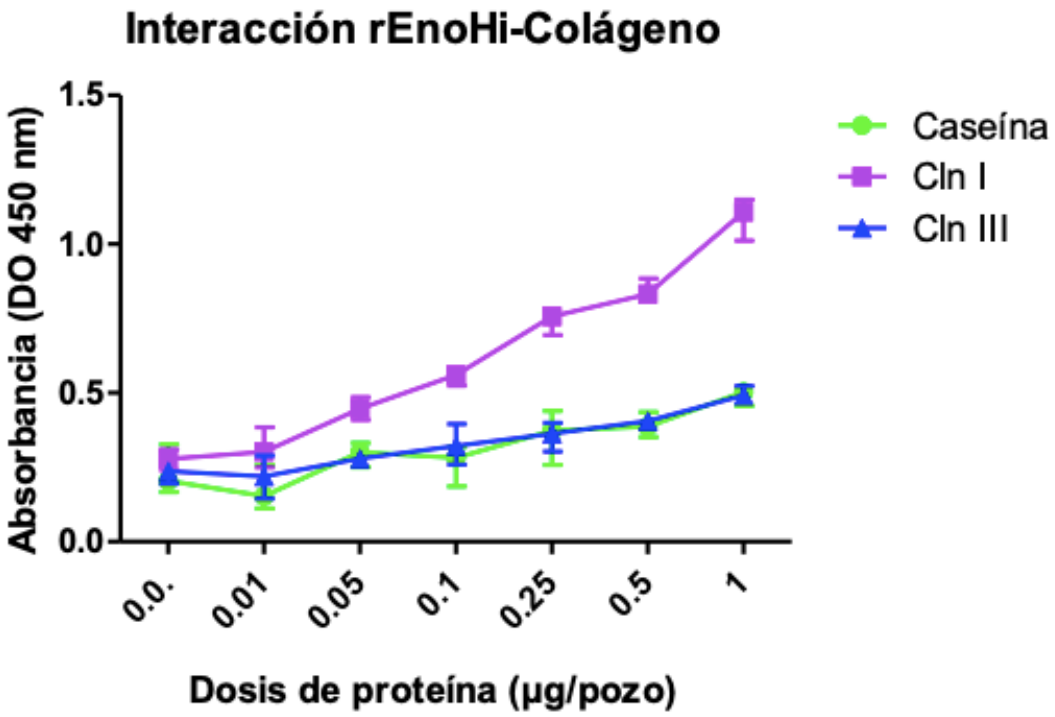


Figura 15. **Identificación mediante ELISA de la interacción de rEnoHi con colágeno.** Las placas ELISA se recubrieron con 1,0 µg/pozo de Cln I, Cln III o caseína (control negativo) diluida en 100 µL de PBS. Se utilizaron concentraciones crecientes de rEnoHi (0,01–1,0 µg/pozo) como se indica en el gráfico. La interacción se cuantificó usando anticuerpos policlonales anti-rEnoHi como primer anticuerpo y anti-ratón IgG conjugado con a HRP como anticuerpo secundario. Los resultados muestran que la interacción entre rEnoHi y Cln I es dependiente de la concentración, mientras que la interacción con Cln III no tuvo diferencia significativa (ns) con respecto al control negativo. Los datos representan la desviación estándar media ± SD de tres experimentos independientes. (* $p < 0,1$): Cln I VS Caseína y Cln III; (ns): Cln III VS Caseína.

9.15. Acoplamiento molecular de NTHiENO- Fibronectina

Se utilizó HDOCK para buscar y analizar las posibles poses de unión entre NTHiENO y fibronectina (PDB ID 3M7P) en el espacio 3D. Para NTHiENO-FN, se consideraron los primeros 10 mejores resultados de acoplamiento. El modelo más optimó se seleccionó en función de la mejor puntuación de energía de acoplamiento, que fue de -222,5.

El modelo se visualizó en Chimera (Figura 16), ambas proteínas exhibieron complementariedad de superficie. Además, los resultados obtenidos por Prodigy mostraron una afinidad de unión (Kcal/mol) de -12,5 y una Kd (M) a 37.0 ℃, de 1.9×10^{-9}

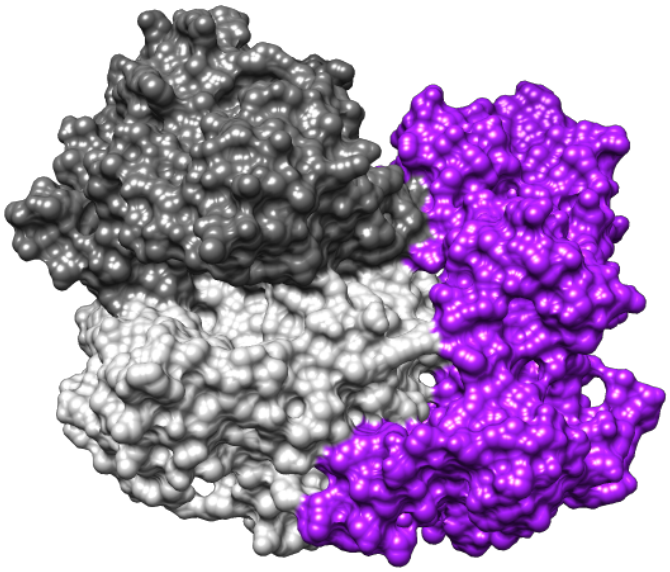


Figura 16. M**odelos de interacción del complejo NTHiENO-Fibronectina por HDOCK.** Las interacciones entre proteínas se muestran como representaciones de superficie. El homo dímero de NTHiENO se muestra en gris oscuro (cadena A), gris claro (cadena B) y Fibronectina (3M7P) en morado.

9.16. Residuos involucrados en la interacción NTHiENO- Fibronectina

Para la interacción de NTHiENO y FN el análisis mostró que la unión de ambas proteínas está mediada por seis puentes de hidrógeno, un puente salino y 147 enlaces débiles. En este análisis también se identificaron los residuos importantes de NTHiENO, para la formación de seis puentes de hidrógeno correspondientes a SER57, LYS56 (cadena A)

y ARG419, LYS195, ASP311, GLY364 (cadena B) y los residuos de FN correspondientes a ASP107, ASP137, GLN84, ASN146, GLN187, GLN252 (Figura 17 A, B). Los resultados resumidos se muestran en la tabla 7.

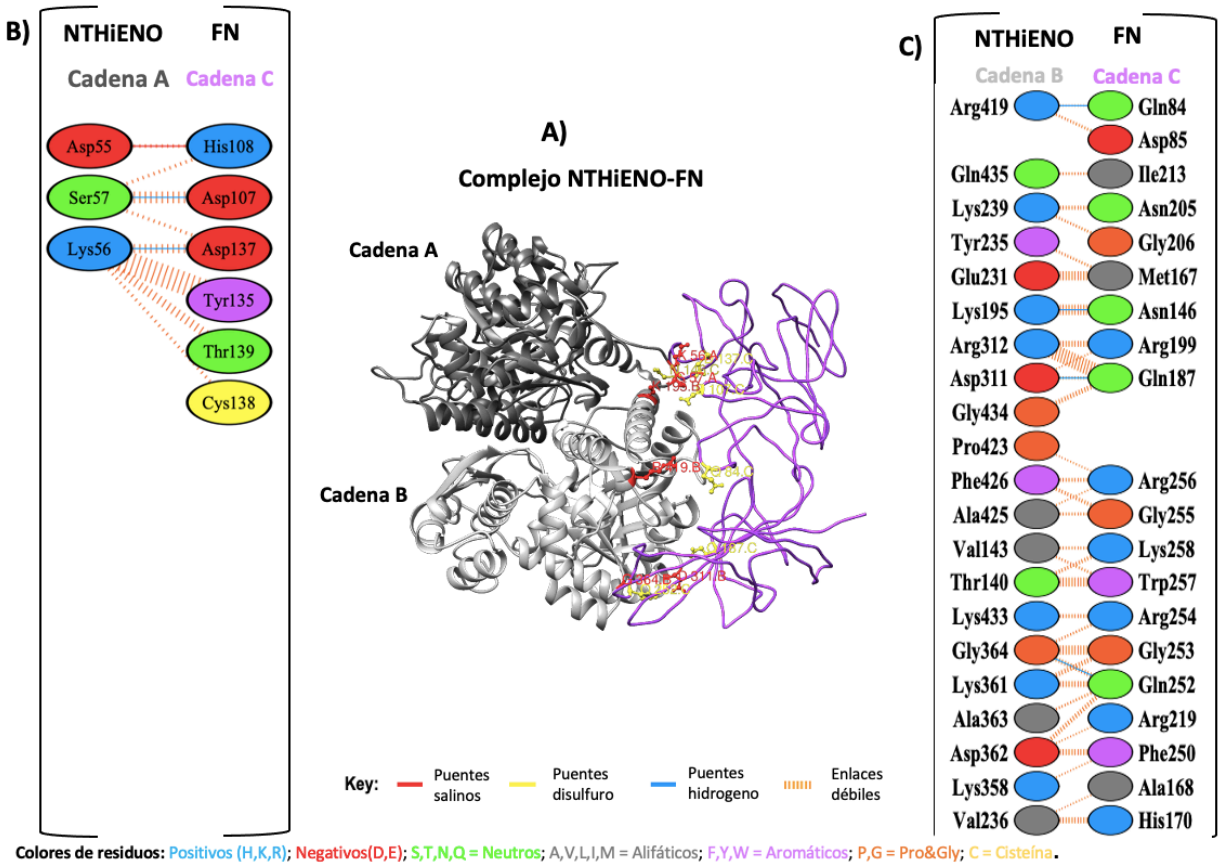


Figura 17. Modelo de interacción del complejo NTHiENO-FN. A) NTHiENO se muestra en gris oscuro (cadena A) y gris claro (cadena B), mientras que el color morado representa a fibronectina (3M7P). Los residuos involucrados en la formación de puentes de hidrógeno se representan en color rojo (enolasa) y amarillo (FN). **B)** A la izquierda, gráfico de interacción por PDBsum para el complejo NTHiENO (cadena A)-FN (cadena C). **C)** A la derecha, gráfico de interacción por PDBsum para el complejo NTHiENO (cadena B)-FN (cadena C). Los residuos se muestran en diferentes colores según sus propiedades, y las líneas de colores que unen estos residuos representan el tipo de interacción entre ellos. Para enlaces débiles, el ancho de la línea rayada es proporcional al número de contactos atómicos. El detalle de cada tipo se muestra en la parte inferior de la figura.

Tabla 7. Resultados resumidos de las interacciones NTHiENO-FN.

Cadenas NTHiENO-FN	No. de Residuos en la Interfaz	Área de la Interfaz (Å^2)	No. de Puentes Salinos	No. de Puentes Disulfuro	No. de Puentes de Hidrógeno	No. de Enlaces Débiles
A-C	3:6	234:165	1	-	2	22
B-C	21:20	1242:1284	-	-	4	125

9.17. Interacción de rEnoHi con Fibronectina

Una vez que identificamos el tipo de interacciones y los posibles residuos de NTHiENO que podrían participar en la unión con la fibronectina se prosiguió a realizar los ensayos *in vitro*. En este caso no se realizaron los ensayos de Far Western Blot debido a que teníamos muy poca concentración de fibronectina, pero sí se logró evaluar la interacción mediante ELISA. Los resultados obtenidos mostraron que rEnoHi se une significativamente a FN y esta interacción mostró ser dependiente de la concentración de FN en comparación con el control negativo (Figura 18).

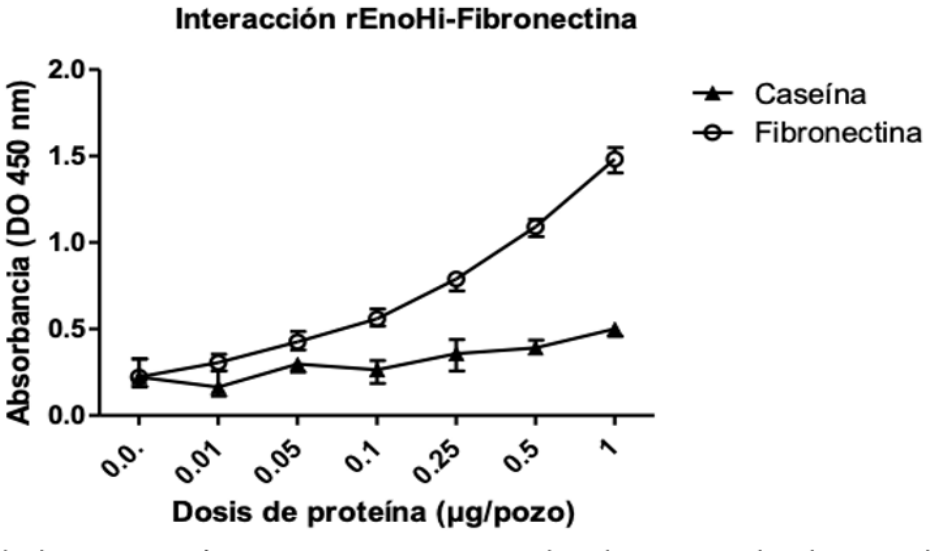


Figura 18. Identificación de la interacción de rEnoHi a FN mediante ELISA. Las placas ELISA se recubrieron con 1,0 µg/pozo FN o caseína (control negativo) diluida en 100 µL de PBS. Se utilizó rEnoHi con varias concentraciones crecientes (0,01–1,0 µg/pozo) como se indica en el gráfico. Los resultados muestran que la interacción entre rEnoHi y FN es dependiente de la concentración. Los datos representan la desviación estándar media ± SD de tres experimentos independientes. (* $p < 0,001$): FN VS Caseína.

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE LA ENOLASA DE *H. influenzae*

9.18. Predicción de epítopos para células B y T y su asociación a los HLA

La secuencia de NTHiENO se analizó con diferentes programas bioinformáticos con la finalidad de identificar epítopos para activar a linfocitos B y linfocitos T citotóxicos (CTL), tal como se describe en el trabajo previo de maestría (Osorio Aguilar 2018), sin embargo, en este caso se realizó un análisis más riguroso en donde se incluyeron todos los supertipos de HLA disponibles en el servidor NetCTL 1.2. Los ensayos bioinformáticos predijeron la presencia de 10 epítopos lineales de células B y 13 epítopos de CTL que se conservan en varios alelos de los supertipos del HLA (Figura 19). Adicionalmente, los 13 epítopos de CTL se examinaron para determinar la presencia de sitios de escisión proteasomal utilizando el programa NetChop 3.1. Todos los epítopos mostraron varios sitios de escisión para ser procesados por el proteosoma. Por otra parte, también se observó que cuatro epítopos de células B se sobrelapan con epítopos de CTL (tabla 8).

Tabla 8. Epítopos de CTL para diferentes supertipos de HLA predichos en NTHiENO

No. De péptido	Secuencia peptídica	Súpertipo HLA	Superposición con el epítopo B	Sitios de escisión proteosomal
1	HLEGGFVGL	A26, B39, B44	No	Sí (2 sitios)
2	ASTGSREAL	B7, B39	Sí	Sí (4 sitios)
3	RFLGKGVLK	A3, B27, B29	Sí	Sí (4 sitios)
4	SNFGANAIL	A2, B39, B58	No	Sí (2 sitios)
5	PREGUNTAR	A1, A3, A26, B7, B58, B62	No	Sí (3 sitios)
6	ELNGTAGVY	A1, A26, B44, B62	No	Sí (3 sitios)
7	GAKTLREAL	B7, B8, B58	No	Sí (3 sitios)
8	EVFHNLAKV	A26, B8, B44	No	Sí (4 sitios)
9	EAVEKAGYV	A26, B7, B39	No	Sí (3 sitios)
10	YVLGKDUTL	A2, B8, B39, B62	No	Sí (5 sitios)
11	FTSQEFTHY	A1, A26, B39, B44, B58, B62	Sí	Sí (4 sitios)
12	ESDWEGFAY	A1, A26, B44, B58	Sí	Sí (2 sitios)
13	LTETLAAIK	A1, A2, A3, B44	No	Sí (4 sitios)

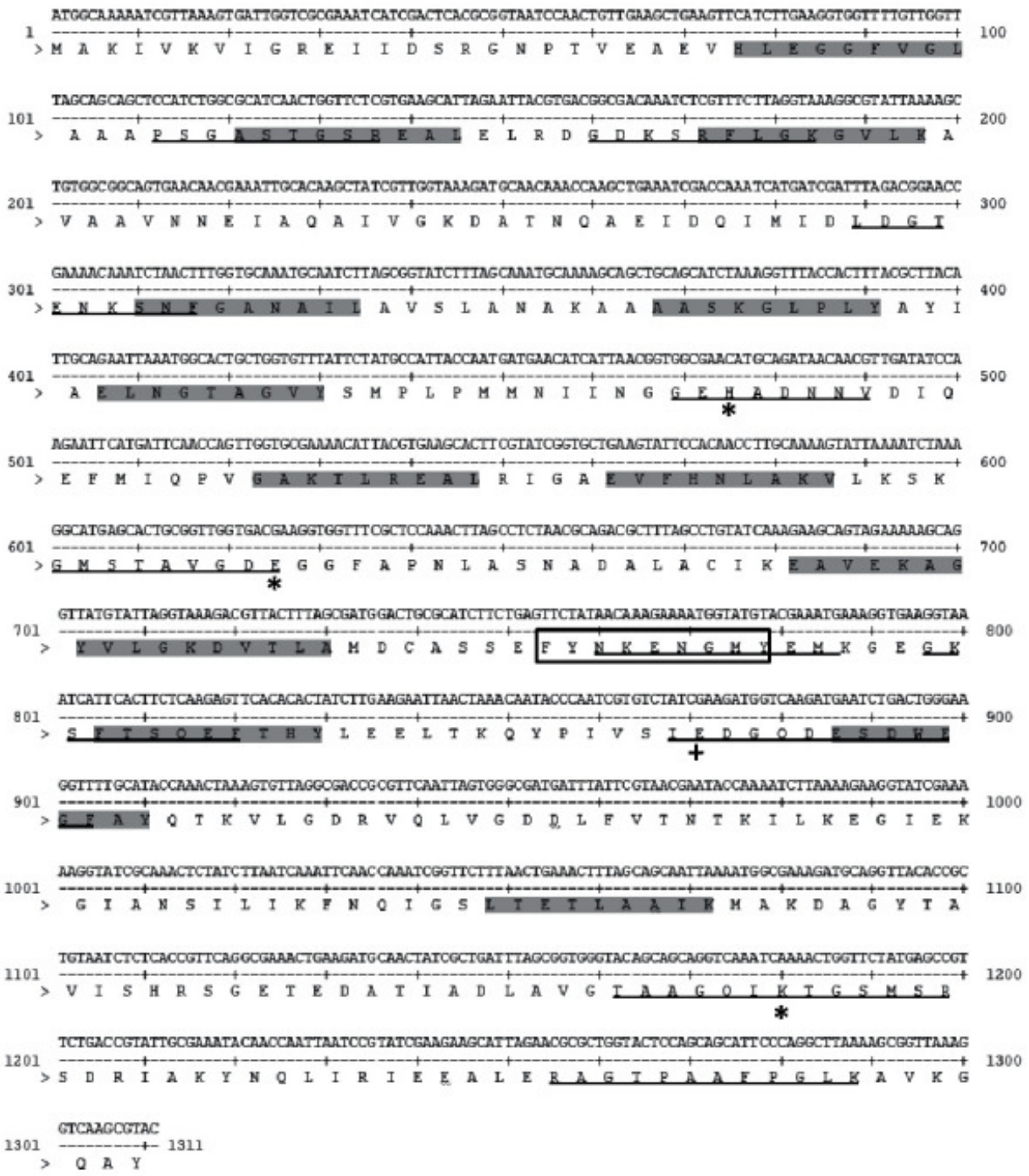


Figura 19. Predicción de epítopos de células T y B, en la secuencia de NTHiENO. Se muestran la región del gen codificante para NTHiENO y su traducción a proteína; los epítopos lineales para células B, se encuentran subrayados; los epítopos para CTL se muestran sombreados en color gris. Un asterisco indica los aminoácidos involucrados en el sitio catalítico de la enolasa (H 159, E 209 y K 394), con un signo "+" el aminoácido involucrado en la unión a Mg^{2+}, y el motivo putativo de unión a Plg se muestra en un recuadro.

9.19. Predicción de antigenicidad y alergenicidad de NTHiENO

Los resultados de predicción de antigenicidad de NTHiENO por VaxiJen v.2,0, mostraron un valor de 0,4828, categorizándolo como un probable antígeno; a su vez, AllergenFP v.1,0, la clasifica como una proteína no alergénica.

9.20. Identificación de sitios de unión a ARN extracelular (exARN)

Recientemente, se ha demostrado en la enolasa de *S. pneumoniae* la presencia de seis sitios de unión a exRNA; además, estos motivos son importantes para la adhesión y su internalización en diferentes células (Zakrzewicz *et al*., 2016). Por lo tanto, en este estudio, en la secuencia de NTHiENO se identificaron los sitios putativos de unión a exRNA. NTHiENO muestra cinco de los seis sitios de unión hacia exRNA con una identidad entre 44 y 85% (tabla 9); lo que es más importante, conservaron aminoácidos con carga positiva (lisina y arginina) presuntamente implicados en la interacción con exRNA. Solamente un motivo no estaba presente en NTHiENO correspondiente al motivo 432 LKK 434, ubicado en la región C-terminal de la enolasa de *S. pneumoniae.* Aunque se desconoce si *H. influenzae* interactúa con el exRNA, existe la posibilidad de que la enolasa de *H. influenzae* pueda interactuar con el exRNA derivado del hospedero, favoreciendo la adhesión a las células del mismo. Sin embargo, se requieren estudios experimentales para verificar esto.

Tabla 9. Motivos putativos de unión a exRNA identificados en NTHiENO

No. de motivo	% de identidad	*H influenzae*	*S. pneumoniae*
1	44%	58 RFLGKGVLK 66	58 RIGGGLGTQK 66
2	50%	103 KSNFGA 108	103 KGKLGA 108
3	60%	191 HNLAKVLKSKGMSTA 205	187 HALKKILKSRGLETA 201
4	66.67%	310 GDRVQL 315	310 GKKVQL 315
5	85.71%	400 RSDRIAK 406	400 RTDRIAK 406
6	----	----	432 LKK 434

(%) porcentaje de homología con respecto a los sitios de unión a exRNA en *S. pneumoniae*

9.21. Obtención de anticuerpos policlonales en modelo murino

Con la finalidad de obtener anticuerpos policlonales contra rEnoHi ratones BALB/C fueron inmunizados con 20 μg de rEnoHi emulsificada con adyuvante completo de Freund, seguida de tres refuerzos cada 7 días con la misma dosis emulsificada con adyuvante incompleto de Freund, en relación 1:1. Al día 45 los ratones fueron sangrados para obtener el suero hiperinmune. La inmunización con rEnoHi, generó títulos de anticuerpos mayor a 1:80,000, tanto en ensayos de Western-Blot como en ensayos de ELISA (Figura 20 A, B), lo que indica una fuerte reactividad y antigenicidad de rEnoHi.

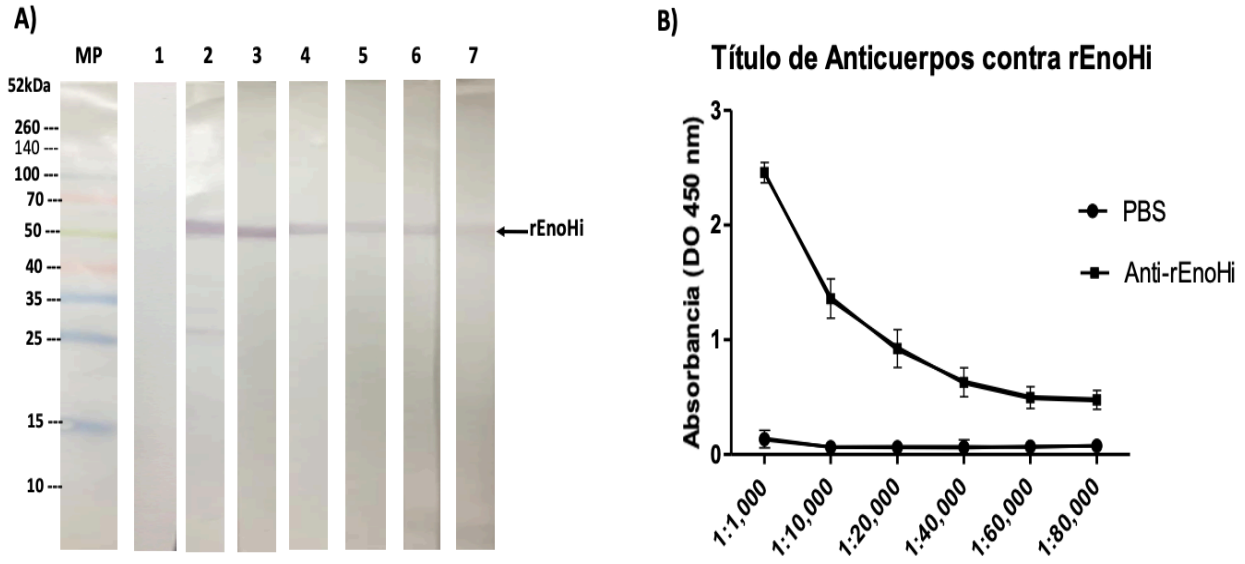


Figura 20 A) Inmunodetección mediante Western-Blot de rEnoHi (52 kDa.) con anticuerpos policlonales anti rEnoHi. Carril 1: Suero pre inmune; Carril 2: dilución 1:1,000; Carril 3: dilución 1:10,000; Carril 4: dilución 1:20,000; Carril 5: dilución 1:40,000; Carril 6: dilución 1:60,000; Carril 7: dilución 1:80,000, la detección de rEnoHi con las diferentes concentraciones de Acs policlonales está indicada con una flecha. **B)** Detección por ELISA del título de anticuerpos en ratones inmunizados con rEnoHi. Los datos representan el valor promedio de tres experimentos independientes ($p < 0,001$): PBS VS Anti-rEnoHi.

9.22. Identificación de la enolasa nativa de *H. influenzae*

Una vez que confirmamos el reconocimiento de los anticuerpos policlonales por la enolasa recombinante, ahora teniamos que identificar si los Ac reconocían a la enolasa nativa de *H. influenzae* . De tal manera que, extractos de proteínas totales, así como enriquecidos de proteínas de membrana de diferentes aislados clínicos de *H. influenzae*

(serotipo b y cepas no tipificables), fueron migradas en un SDS-PAGE al 12% (Figura 21 A), posteriormente se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa y la detección se realizó con el uso de los anticuerpos policlonales anti-rEnoHi generados; estos Ac mostraron alta especificidad al reconocer a la enolasa nativa, de las diferentes cepas de *H.influenzae*, la cual se identificó con un peso aproximado de 46 kDa, peso correspondiente a lo reportado en la bibliografía y a la recombinante con un peso de 52 kDa (Figura 21 B); el aumento de peso de aproximadamente 6 kDa en rEnoHi, corresponde a la etiqueta de histidinas fusionada al extremo N-terminal, una secuencia estabilizadora de transcripción del gen 10 del fago T7, el epítopo Xpress™ y la secuencia de reconocimiento de escisión de la enteroquinasa, las cuales se encuentran rio arriba del inserto de ADN y son codificadas por el plásmido (Osorio Aguilar, 2018).

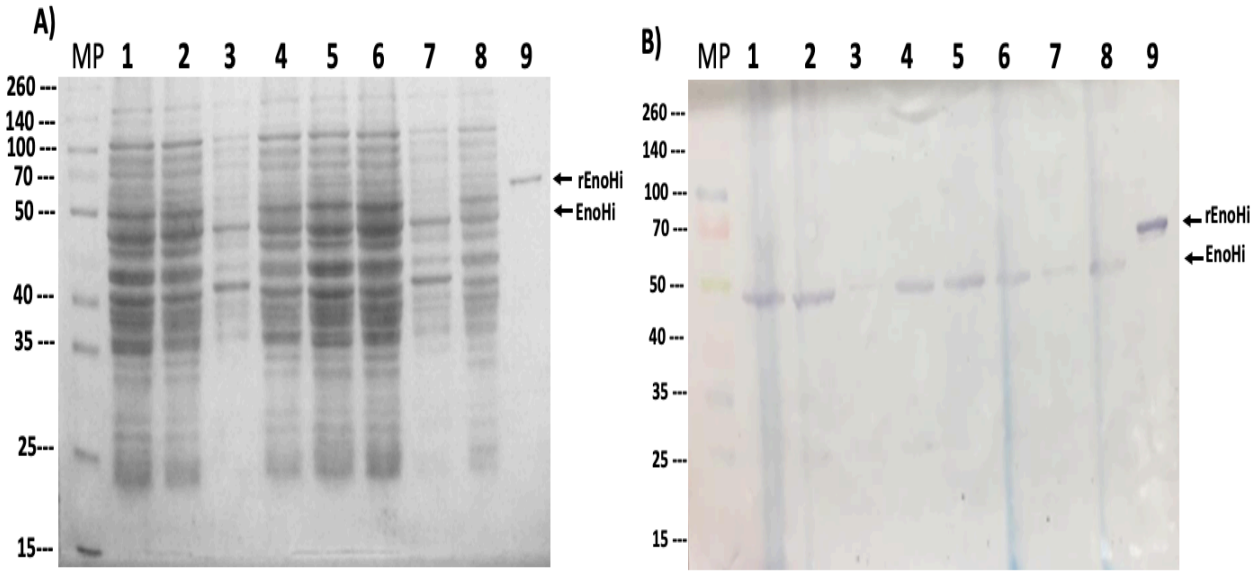


Figura 21 Identificación de la enolasa nativa de *H. influenzae.* A) SDS-PAGE 12% de extractos de proteínas totales de *H. influenzae.* B) Inmunodetección mediante Western-blot de la enolasa nativa de *H. influenzae* (46 kDa.) MP: marcador de peso molecular; Carriles 1-4: Proteínas totales de *Hi*bBUAPNAN, *Hi*bATCC33, *Hi*NTBUAP96 *y Hi*NTBUAPPAU, respectivamente; Carriles 5-8: enriquecidos de proteínas de membrana, mismo orden; Carril 9: rEnoHi **(52 kDa),** con anticuerpos policlonales anti-rEnoHi.

9.23. Identificación del isotipo de anticuerpos generados por rEnoHi.

Por otra parte, se determinó el isotipo de anticuerpos estimulados por rEnoHi, donde obervamos que, los anticuerpos policlonales son principalmente los de la clase IgG1 e IgG2a, seguido de IgG2b, IgG3, IgA e IgM (Figura 22); sin embargo, se observó una diferencia significativa de los niveles de IgG1 con respecto a IgG2a y el resto de los isotipos.

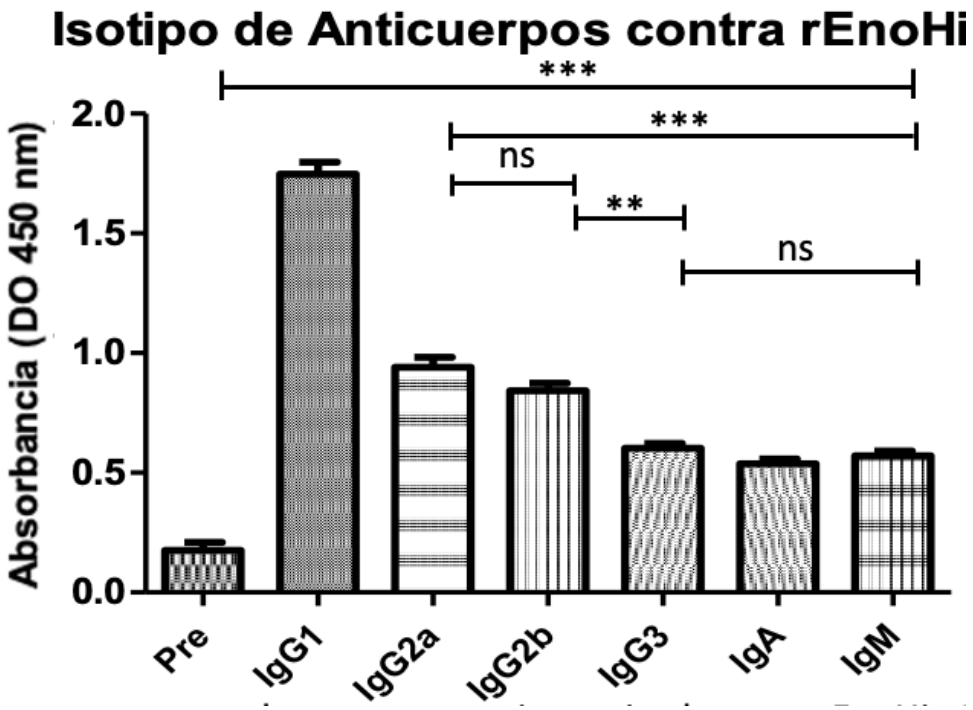


Figura 22. Isotipo de anticuerpos generados en ratones inmunizados con rEnoHi. Gráfica que muestra los valores de DO para los diferentes isotipos en un grupo de cuatro ratones. Los valores representan el promedio del ensayo por triplicado ± DS. La diferencia significativa fue detectada por la comparación entre los diferentes grupos: (*P<0,001) Preinmune VS IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM; (*P<0,001) IgG1 VS IgG2a, IgG2b, IgG3; (*P<0,01) IgG2a VS IgG2b, IgG3; ns: no significativo.

9.24. Determinación de Ac opsonizantes

Una vez determinado el isotipo de anticuerpos, ahora lo que nos interesaba identificar era los anticuerpos opsonizantes. Para esto, los anticuerpos policlonales contra rEnoHi, fueron sometidos a un tratamiento con calor para inactivar a las proteínas del complemento, y para que, de esta manera, solo detectáramos los anticuerpos con actividad opsonizante, tal como lo describe (Pablo *et al*., 2018). Estos ensayos se realizaron mediante inmunofluorescencia indirecta, en donde se utilizó como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-ratón IgG(H+L) hecho en cabra acoplado a FITC.

Los anticuerpos opsonizantes mostraron reactividad con la enolasa superficial de las cepas *Hi*NTBUAP96 y *Hi*bBUAPNAN, el marcaje se observa punteado y con baja intensidad de fluorescencia (Figura 23 y 24 A), con respecto a las muestras en donde se utilizó el suero sin tratamiento de calor (Figura 23 y 24 B). Se observó mayor intensidad en la fluorescencia en los controles positivos donde se utilizaron anticuerpos totales contra *H. influenzae*, y ninguna señal fue observada cuando las muestras que fueron incubadas con el suero preinmune como control negativo (Figuras 23 y 24 D).

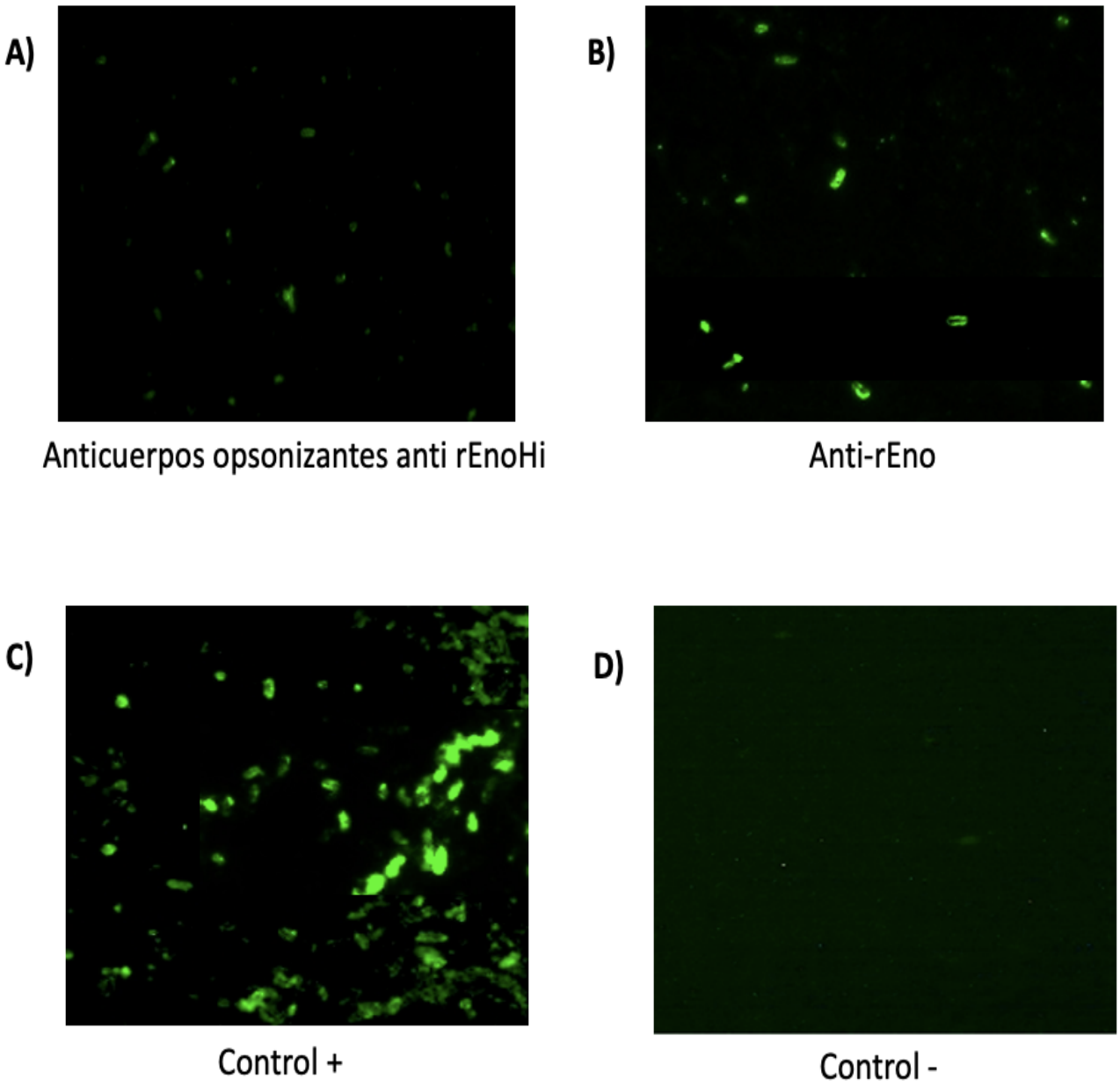


Figura 23. Determinación de anticuerpos opsonizantes contra *Hi*NTBUAP96 mediante epifluorescencia (Marcaje con FITC). **A)** Anticuerpos opsonizantes anti-rEnoHi. **B)** Anticuerpos anti-rEnoHi (suero sin tratamiento de calor). **C)** Control positivo (anticuerpos totales contra *H. influenzae)*. **D)** Control negativo (suero preinmune).

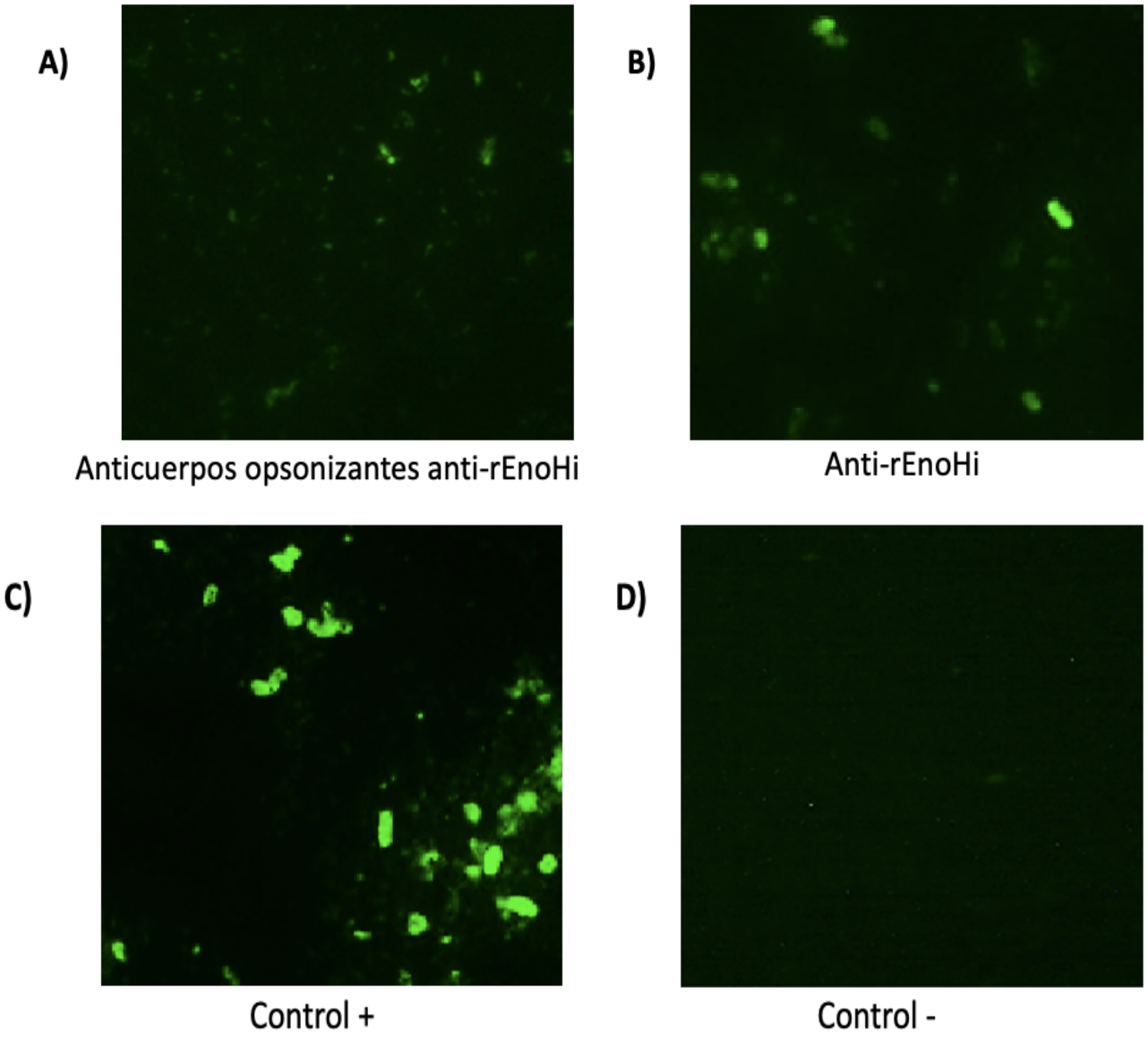


Figura 24. Determinación de anticuerpos opsonizantes contra *Hi*bBUAPNAN mediante epifluorescencia (Marcaje con FITC). **A)** Anticuerpos opsonizantes anti-rEnoHi. **B)** Anticuerpos anti-rEnoHi (suero sin tratamiento de calor). **C)** Control positivo (anticuerpos totales contra *H. influenzae)*. **D)** Control negativo (suero preinmune).

10. DISCUSIÓN

H. influenzae coloniza exclusivamente la nasofaringe humana (Watts & Holta, 2019). La bacteria se clasifica en seis serotipos capsulares (a–f) y cepas no tipificables (NT). *H. influenzae* es una de las principales bacterias patógenas que causan enfermedades invasivas (N *et al*., 2018) y sigue siendo una causa frecuente de enfermedad local, como otitis media, en los niños de todo el mundo (S et al., 2020)

En los países desarrollados, la incidencia anual de meningitis causada por bacterias es de aproximadamente 5 a 10 casos por cada 100, 000 habitantes (Zarei *et al*., 2016),

Uno de los patógenos habituales hasta antes de que surgiera la vacunación, era el serotipo b, pudiendo provocar muchas infecciones graves, como sepsis, epiglotitis, neumonía y meningitis (Bruce *et al.*, 2008).

Por otra parte, NTHi es una de las principales causas de infecciones del tracto respiratorio, incluida la otitis media aguda (OMA), la fibrosis quística y la neumonía adquirida en la comunidad entre los niños, especialmente en los países en desarrollo. También se sabe que la bacteria causa bronquitis crónica y EPOC en el tracto respiratorio inferior de los adultos (Behrouzi *et al*., 2017). Ocasionalmente, NTHi se ha aislado del tracto urogenital y se asocia con endometriosis, cervicovaginitis y otras infecciones urogenitales; además, estas cepas pueden ocasionar sepsis neonatal (St. Geme, 2000); (Puig *et al*., 2014).

Otros serotipos son patógenos poco comunes y se cree que tienen baja virulencia; sin embargo, algunos han planteado la hipótesis de que con la disminución de infecciones causadas por *H. influenzae* tipo b debido a la vacunación [vacuna específica contra este serotipo, debido a que está compuesta por el polisárido capsular fosfato de polirribosilribitol (PRP)], otros serotipos podrían adquirir características de virulencia y emerger como patógenos importantes (Adderson *et al*., 2001). Tal como se describe en estudios recientes, se ha informado un aumento en la incidencia de infecciones invasivas causadas por cepas no Hib (Langereis & De Jonge, 2015). En un estudio realizado en el período 2002-2013 en Bogotá, Colombia, se aislaron cepas de *H. influenzae* de enfermedades invasivas. El 50,5% provinieron de pacientes con meningitis, el 23,5%

pacientes con neumonías, el 19,5% pacientes con sepsis y bacteriemia, el 2,0% pacientes con otros tipos de infecciones, y el 4,5% sin datos. Donde se reporta que el serotipo predominante fue *Hi*b (40,5%), seguido de NTHi (38,0%), *Hi*a (17,5 %), *Hi*d (2,0 %), *Hi*f (1,5 %) y Hie (0,5 %) (Rodríguez *et al*., 2015).

A pesar de una marcada reducción en la enfermedad invasiva general de *H. influenzae* después de la vacuna contra el serotipo b, las cepas no tipificables continúan causando complicaciones invasivas como meningitis y bacteriemia, sobre todo en individuos inmunocomprometidos. De manera preocupante, diversos estudios en varias poblaciones posteriores a la vacunación han observado un aumento constante de las tasas de incidencia invasiva por NTHi. En los Estados Unidos, NTHi es la causa más común de enfermedad invasiva por *H. influenzae,* durante el año 2008 al 2019, la incidencia anual promedio de NTHi fue de 1,3/100,000 habitantes y en general, 5,8/100,000 en niños menores de 1 año y 10,2/100,000 en adultos mayores de 80 años (Oliver et al., 2023), En México, en 2011 Solórzano-Santos y colaboradores realizaron un estudio transversal, que incluyó a 573 niños menores de cinco años. En donde se reportó 88 aislamientos de *H. influenzae*: en 7/573 (1.2 %) se aisló a *Hi*b, en 3/573 (0.5 %) a *Hi*a, c, d, f y en mayor porcentaje se aisló a NTHi con 78/573 (13.6 %) (Solórzano-Santos *et al*., 2011).

La aparición de cepas virulentas no tipificables enfatiza la importancia de desarrollar nuevos objetivos de intervención, lo que destaca la importancia de investigar los mecanismos de invasividad en cepas con ausencia de cápsula (Kress-Bennett *et al*., 2016).

Es importante mencionar que la vigilancia continua es fundamental para todas las infecciones por *H. influenzae*, ya que como lo describimos antes, los serotipos no b y las cepas no tipificables pueden convertirse en la principal causa de enfermedades invasivas (Roaa *et al*., 2016). La falta de una vacuna que genere protección contra todos los serotipos y cepas no tipificables promueve la búsqueda de nuevos antígenos con potencial inmunogénico contra esta bacteria.

La enolasa forma parte de un gran repertorio de proteínas multifuncionales y es un objetivo de estudiarse como potencial inmunógeno para ser utilizado como vacuna, ya que se ha informado que esta proteína es esencial para la virulencia *in vivo* de algunos patógenos, por lo cual se han reportado estudios en modelos bacterianos y parasitarios, cuyos resultados han sido prometedores en una gran medida contra patógenos humanos, responsables de infecciones graves que amenazan la vida (Rahi *et al*., 2018).

En este contexto, hay reportes donde se describe que la enolasa de muchos patógenos puede facilitar su invasión y diseminación en los hospederos a través de la unión y activación del plasminógeno y su posterior conversión en plasmina activa (S. Bergmann *et al*., 2001); (Simone Bergmann *et al*., 2003); (Agarwal *et al*., 2008); (Kornblatt *et al*., 2011). Por lo que en este estudio se determinó el papel de la enolasa como proteína de unión al plasminógeno humano y componentes de la matriz extracelular, así como determinar su papel como inmunógeno para ser considerado un candidato vacunal contra cepas tipificables y no tipificables de *H. influenzae*.

En un estudio previo demostramos que la enolasa de *H. influenzae* está asociada a la membrana externa de la bacteria y que las enolasas de cepas tipificables y no tipificables tienen una identidad del 99,54 %. Esto podría indicar que el cambio entre la secuencia de aminoácidos no es significativo. Además, se identificó un motivo putativo para la unión al plasminógeno (252 FYNKENGMY 260) y se encontró que estaba presente en las enolasas de todas las cepas de *H. influenzae*. En el análisis de alineamiento se observó que este motivo es similar a un motivo interno responsable de la unión al plasminógeno. Este motivo ha sido bien caracterizado en la enolasa de *S. pneumoniae* (248 FYDKERKVY 256) (Simone Bergmann *et al*., 2003), y otros organismos, como *L. mexicana* (Vanegas et al., 2007) y *B. henselae* (Deng *et al*., 2019), con porcentajes de homología de 53,8%, 46,15% y 38,36%, respectivamente (Figura 8 A). En este estudio, las interacciones moleculares de NTHiENO con el plasminógeno del hospedero, simuladas por PatchDock, mostraron que ambas proteínas presentaron complementariedad de superficie, encontrándose el motivo putativo de unión a Plg (252 FYNKENGMY 260) en la región de interfaz (Figura 7). Se observaron resultados similares en el caso de *B. henselae* y *Trichinella spiralis* (Deng *et al*., 2019), *(P. Jiang et*

al., 2019). La estructura de NTHiENO se sometió a una evaluación de calidad mediante el análisis gráfico PROCHECK Ramachandran, que muestra que las conformaciones de la cadena principal para el 99,7% de los residuos de aminoácidos se encuentran dentro de las regiones más favorecidas o permitidas (Figura 6 B). El valor QMEAN normalizado para el modelo fue de -0,10. Los valores de *Z- scores* de la calidad global alrededor de 0,0 reflejan una estructura similar a la nativa; como regla general, se habla de que un valor Z- score de QMEAN por debajo de -4,0 indica un modelo de baja calidad (Benkert *et al*., 2008); por lo tanto, nuestro modelo está dentro del valor típico de desviación estándar (Figura 6 C). Además, el valor pronosticado por ProSA de la puntuación Z–score de 8,47 está dentro del rango de puntuaciones que normalmente se encuentran para las proteínas nativas, y estos resultados respaldan la calidad del modelo (Figura 6 D).

Por otro lado, el valor de ACE de -101,54, la alta afinidad de unión (kcal/mol) de -21,3 y el bajo valor de Kd (M) de $1,0 \times 10^{-15}$ son resultados que muestran un buen modelo de interacción predicho por PatchDock, y estos resultados confirman la calidad del modelo predicho. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que ambas estructuras, tanto la enolasa como Plg, presentan esta forma complementaria y que pbmHiENO está presente en la región interfaz, lo que sugiere que esta región de NTHiENO podría ser uno de los principales sitios de unión con el plasminógeno humano.

La región N-terminal del plasminógeno contiene cinco dominios *kringle* de 80 aminoácidos (K1-K5), que contienen sitios de unión a lisina (Derbise *et al*., 2004). La interacción con la lisina conduce a un cambio conformacional, lo que lo hace más susceptible a la escisión por los factores activadores del plasminógeno (Pas) (Lähteenmäki *et al*., 2001) y así pasar a su forma activa de plasmina.

Casi todos los dominios *kringle* se unen a lisina o ligandos similares a lisina. Las interacciones con residuos de lisina ocurren en los dominios K1, 2, 4 y 5; K1 y K4 los cuales exhiben las afinidades de ligando más fuertes, mientras que K2 posee la afinidad más débil (Menhart *et al*., 1993); (Marti *et al*., 1999); (Castellino & Ploplis, 2005); (Bhattacharya *et al*., 2012). En la enolasa de *T. spiralis* (TsENO), se identificaron cuatro residuos de lisina, que tienen un papel importante en la unión al Plg, esto se demostró

con un ensayo en donde los investigadores obtuvieron una cuádruple mutante de TsENO (Lys90Ala + Lys289Ala + Lys291Ala + Lys300Ala), en el que los residuos clave de lisina se sustituyeron por alanina; la mutante exhibió una reducción en la unión al Plg de casi el 50 % (45,37 %) (P. Jiang *et al*., 2019).

Por otro lado, uno de los principales sitios de unión a los dominios *kringle* del plasminógeno, en las enolasas estudiadas en la mayoría de los organismos patógenos, es la lisina C-terminal (Vanegas *et al*., 2007), como se observó en el caso de *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* (Derbise *et al*., 2004) y *Mycobacterium tuberculosis* (Rahi *et al*., 2018). Sin embargo, mientras que en el caso de *S. pyogenes* las lisinas C-terminales (dos lisinas), son importantes para la unión al Plg, para el caso de la enolasa neumocócica no es así, ya que la unión al Plg depende principalmente del motivo interno de unión de Plg denominado como BS2 (residuos 248–256), y el residuo de lisina C-terminal no está o solo está mínimamente involucrado (S. Bergmann *et al*., 2001); (Candela *et al*., 2007). La enolasa de *H influenzae* carece de lisinas C-terminales; sin embargo, tiene el sitio putativo de unión de Plg interno (252 FYNKENGMY 260). Por lo tanto, decidimos centrarnos en este motivo y someterlo a Blind Docking utilizando AutoDock Vina, con el fin de identificar qué aminoácidos son clave para la interacción con los dominios *kringle* del plasminógeno.

Acorde a los resultados del acoplamiento molecular, las mejores poses con las energías de enlace más bajas y la formación de puentes de hidrógeno mostraron que pbmHiENO (1 EFYNKENGMYE 11) tiene afinidad con los dominios *kringle* K2, K3 y K5, con una afinidad de enlace Kcal/mol de -3,9, - 4,4 y -4,8, respectivamente (Figura 9 A, B y C; tabla 2). Se identificaron tres residuos clave para la unión del plasminógeno: uno de los residuos de aminoácidos clave fue enoTYR 253, que se une a plgGLU 1 mediante la formación de un puente de hidrógeno. Aunque GLU 1 no se encuentra dentro de K2, múltiples residuos de plasminógeno ubicados en el dominio K2 ejercen otras fuerzas intermoleculares que favorecen la interacción. TYR 253 también participa en la formación de puentes de hidrógeno, pero en este caso, con plgGLY 310, ubicado en K3 de Plg. Los otros dos residuos clave que interaccionan con Plg fueron enoGLU 251 y enoLYS 255, que se unieron a plgLYS 468 y plgARG 471, respectivamente, ambos

ubicados en el dominio K5 (Figura 9 D-I). Además, otros residuos de plasminógeno ubicados en estos dominios (Tabla 3) que participan en la interacción también fueron identificados. Por otro lado, la prueba de acoplamiento de controles positivos mostró que la diferencia en la ubicación espacial de los átomos de la pose acoplada con respecto al ligando cristalizado presentó un RMSD <2,0 Å, (Tabla 4), por lo tanto, AutoDock Vina predijo con éxito las coordenadas de los ligandos cristalizados. Estos resultados brindan información de la confiabilidad del software; en consecuencia, se puede suponer que los resultados obtenidos con el Blind Docking son confiables.

Como ya se mencionó anteriormente, se ha propuesto el papel de un motivo interno de unión de Plg en las enolasas (248 FYDKERKVY 256) para muchos organismos, incluidos parásitos, levaduras y bacterias. Para especies como *S. pneumoniae*, *L. mexicana*, *Bifidobacterias sp* y *Candida sp*, el papel de este motivo interno de la enolasa fue respaldado experimentalmente por ensayos de inhibición competitiva con péptidos sintéticos y/o también por mutagénesis dirigida al sitio del motivo de unión (Simone Bergmann *et al*., 2003); (Vanegas *et al*., 2007); (Candela *et al*., 2009); (Satala *et al.*, 2020). En el caso de *S. pneumoniae*, se ha demostrado que LYS 251, GLU 252 y LYS 254 son esenciales para la interacción con el plasminógeno. La sustitución de tres residuos de aminoácidos en el fragmento seleccionado de la enolasa bacteriana (sustituciones LYS251LEU, GLU252GLY Y LYS254LEU) disminuyo la unión del plasminógeno al 44% con respecto a la proteína nativa (Simone Bergmann *et al*., 2003). Estos resultados también se han visto con la enolasa bifidobacteriana; ya que, por mutagénesis directa de los sitios de LYS 251, GLU 252 y LYS 255 dentro del homólogo BS2 de *B. lactis* , la enolasa BI07 disminuyó significativamente su actividad de unión a Plg, lo que sugiere que los residuos cargados positivamente LYS 251, LYS 255 y el GLU 252 cargado negativamente, son vitales para la interacción con Plg (Candela *et al*., 2007). Estas cargas se conservan en pbmHiENO, equivalente a enoGLU 251, enoTYR 253 y enoLYS 255. GLU 251 está fuera del motivo de unión al plasminógeno característico clásico (252 FYNKENGMY 260); sin embargo, se observó que puede interactuar con el dominio K5. Por otra parte, aunque TYR 253 participa en la interacción con dos dominios *kringle* (K2 y K3), consideramos más importante a LYS 255 por su alta probabilidad de unirse con el dominio K5 debido a su posición estratégica al estar

expuesta en la estructura de NTHiENO (Figura 6 A y 8B). Resultados similares se reportan en un acoplamiento molecular de *G. intestinalis* (GiENO), donde LYS 266 se demostró que se une preferentemente al dominio K5 de Plg (Aguayo-Ortiz *et al*., 2017). Con estos antecedentes y los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos que enoGLU 251, enoTYR 253 y enoLYS 255 constituyen los principales sitios de unión al plasminógeno; sin embargo, podría haber aminoácidos fuera de pbmHiENO participando en la interacción o favoreciendo un plegamiento adecuado de la proteína para mantener su interacción con el plasminógeno; sin embargo, esta hipótesis tendrá que ser confirmada en estudios posteriores. Mientras tanto, proponemos que la enolasa de *H. influenzae* puede unirse a los dominios K2, K3, pero principalmente a K5 de Plg a través de pbmHiENO, debido a la formación de dos puentes de hidrógeno, y también porque presentó la mejor afinidad de unión (Kcal/mol -4,8) (Figura 9 F).

Basándonos en lo descrito por (Osorio-Aguilar 2018), en este trabajo se obtuvo la enolasa recombinante purificada *de H. influenzae* (rEnoHi*)* con un peso aproximado de 52 kDa (Figura 1 A, B), la cual fue utilizada para realizar los ensayos de interacción *in vitro* con distintas proteínas y que se describen a continuación.

La capacidad de rEnoHi para unirse a Plg y Pp se realizó utilizando ensayos de ELISA y de Far-Western Blot, los resultados muestran claramente que rEnoHi es una proteína de unión a Plg de una manera dependiente de la concentración de Plg (Figura 4 B y 5 A). Este resultado ha sido reportado en múltiples enolasas de diferentes modelos como *S. pyogenes* (Vijaykumar Pancholi & Fischetti, 1998); *L. mexicana* (Vanegas *et al*., 2007)*; T. vaginalis* (Mundodi *et al*., 2008)*; S. iniae* (Jun Wang *et al*., 2015); *M. tuberculosis* (Rahi *et al*., 2018)*; B. henselae* (Deng *et al*., 2019)*,* entre otros.

Sin embargo, para el caso de la interacción con Pp, se observan bandas adicionales al peso correspondiente del Plg (Figura 2B); hasta el momento desconocemos que tipo de proteínas podrían ser.

En otros estudios, se ha sugerido que la interacción entre el plasminógeno y la enolasa tiene un papel clave en la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, en las que la enolasa microbiana es capturada por el plasminógeno humano, y su posterior

conversión a plasmina sirve como mecanismo para aumentar su virulencia, favoreciendo la invasión del tejido del hospedero (Chumchua *et al*., 2008). Incluso sin activación del Plg, se ha informado que el reclutamiento de plasminógeno a la superficie bacteriana es un mecanismo fundamental de patogenicidad, que promueve la unión bacteriana a las superficies celulares. Un estudio con ratones infectados por vía intranasal demostró que el reclutamiento del plasminógeno por la enolasa neumocócica contribuye significativamente a su virulencia en ratones. En otros estudios, la enolasa expuesta en la superficie se identificó como un mediador para la unión bacteriana dependiente del plasminógeno (Lottenberg *et al*., 1994); (Simone Bergmann *et al*., 2003); (Fulde *et al*., 2013).

Teniendo en cuenta los estudios mencionados anteriormente y los resultados obtenidos del acoplamiento molecular, así como los ensayos *in vitro* en este trabajo, se propone que la interacción NTHiENO-Plg podría ser uno de los mecanismos utilizados por *H. influenzae* para infectar e invadir la célula hospedera: un mecanismo que para *H. influenzae* hasta el momento no había sido descrito.

Por otra parte, la matriz extracelular constituye un complejo de proteínas, cuya composición y organización estructural influyen en numerosos procesos biológicos como la adhesión, migración, proliferación o diferenciación celular (Chagnot *et al*., 2012); (Bailão *et al*., 2012). Los microorganismos han desarrollado diferentes mecanismos para colonizar con éxito los tejidos humanos. La adhesión a los tejidos del hospedero representa un paso inicial crucial en el proceso de colonización (Castaldo *et al*., 2009b). En el caso de *H. influenzae*, algunos mecanismos de persistencia incluyen la expresión de múltiples adhesinas que median la unión a las células del hospedero y los componentes de la matriz extracelular (Ahearn *et al*., 2017), por lo tanto, la relación entre las adhesinas y la MEC tiene un papel importante en el éxito de la colonización y virulencia de *H. influenzae* (Osman *et al*., 2018).

Como ya se mencionó, la enolasa tiene actividad como proteína multifuncional; la función más común parece ser la unión al plasminógeno (Plg), sin embargo, también se ha encontrado como adhesina en la superficie celular en una variedad de microorganismos que interactúan con las proteínas de la MEC (Carneiro *et al*., 2004); (Castaldo *et al*.,

2009b); (Antikainen, Kuparinen, *et al*., 2007), como laminina (Carneiro *et al*., 2004); fibronectina (Castaldo et al., 2009a); colágeno (Antikainen, Kuparinen, *et al*., 2007); entre otros. Estas proteínas son componentes importantes de las membranas basales y las matrices extracelulares en las barreras tisulares (Hussain *et al*., 2022).

Se ha reportado que, entre los componentes de la MEC, el colágeno es uno de los blancos de interacción con la enolasa de muchos patógenos, y algunas bacterias probióticas (Marcos *et al*., 2012); (Salzillo *et al*., 2017); (Muscariello *et al*., 2020); (Hussain *et al*., 2022). Sin embargo, hasta la fecha, en el caso de la enolasa de *H. influenzae*, no hay datos reportados. Por lo tanto, en este estudio también se caracterizó la capacidad de NTHiENO como una proteína de unión a colágeno del tipo I y III.

Para las predicciones *in silico* de la interacción NTHiENO con colágeno, al inicio se realizó el acoplamiento molecular con el monómero de NTHiENO; sin embargo, consideramos que los resultados no eran contundentes, debido a que algunas predicciones arrojaban una complementariedad de superficie entre ambas proteínas donde la región involucrada de la enolasa era la parte interna y, tomando en cuenta que la enolasa es una proteína con estructura de homodímero (ambas cadenas tienen la misma secuencia y el mismo pliegue básico; cadena A y cadena B son iguales) (Karbassi *et al*., 2010), muy probablemente estas interacciones no podrían llevarse a cabo por un impedimento estérico. De tal manera que se procedió a obtener el modelado por homología, pero ahora, de la estructura dimérica de NTHiENO mediante SWISS-MODEL; donde se utilizó el homodímero de la enolasa de *E. coli* como plantilla, la cual tiene un valor de resolución de 1,81 Å; ambas proteínas presentaron un alto porcentaje de identidad que es del 85,61%, por lo que proporciona una plantilla adecuada para el modelado de NTHiENO.

La calidad estereoquímica de la estructura NTHiENO fue verificada por PROCHECK Ramachandran plot, demostrando que la posición de los residuos de aminoácidos está dentro de las regiones más favorecidas o permitidas con un valor de 99,5% (Figura 10 B). El Z-score calculado (−9,05) por el servidor ProSA, se encuentra en el rango de puntuaciones de conformación de proteínas nativas (Figura 10 C) y el valor de QMEAN normalizado fue de 0,34 (Figura 10 D); lo que sugiere que el modelo obtenido no difiere significativamente de las estructuras experimentales, los rangos de estimación de calidad

están entre 0 y 1 (Benkert *et al*., 2008); por lo tanto, nuestro modelo se encuentra dentro del valor típico de desviación estándar. Estos datos indican que el modelado es confiable.

El colágeno tipo I se encuentra en todas las matrices extracelulares, incluidos los huesos, la piel y los tendones, mientras que el colágeno tipo III también es un componente importante de los vasos sanguíneos y los órganos huecos (Bönnemann & Voermans, 2012), ambos son los principales constituyentes de la matriz extracelular (Bode, 2000), pertenecen a los grandes colágenos fibrilares, y frecuentemente se pueden encontrar juntos (Bönnemann & Voermans, 2012).

Un estudio realizado por Antikainen *et al*. en 2007, muestra que la enolasa de *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus crispatus* presentan una fuerte unión al colágeno tipo I (Antikainen, Kupannen, *et al*., 2007), esto también se observó en *Lactobacillus casei* BL23 (Muñoz-Provencio *et al*., 2011a), *Paracoccidioides brasiliensis* (Marcos *et al*., 2012) y *Lactobacillus plantarum*; curiosamente, en este último estudio, los autores informaron que, al usar variantes de la enolasa recombinante trunca, demostraron que la región de aminoácidos que abarca desde los residuos 73 al 140 están involucrados en la unión del colágeno tipo I, además de que la enolasa recombinante puede unirse al colágeno tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes, adicionalmente observaron que la cepa mutante LM3- CC1, que lleva una mutación nula en el gen enoA1, se une al colágeno de manera menos eficiente que la cepa de tipo nativa (Salzillo *et al*., 2015). Resultados similares en cuanto a adhesión se observaron con la enolasa recombinante de *Staphylococcus lugdunensis* (rSIEno) (Hussain *et al*., 2022), pero en este caso uniéndose al colágeno tipo IV.

En este estudio, en los resultados obtenidos por HDOCK, se observa que NTHiENO presenta complementariedad de superficie tanto con Cln I como con Cln III, para ambos casos se analizaron múltiples modelos, y en aproximadamente el 50% de las predicciones de poses de acoplamiento para cada uno de los colágenos, ocurre en la misma región. Sin embargo, los residuos principales pertenecientes a la cadena A o la cadena B de NTHiENO están presentes en la región de la interfaz, lo que indica que la interacción puede estar mediada por ambas cadenas (A y B), pero el complejo NTHiENO-Colágeno se puede realizar principalmente con la cadena A o en su defecto con la cadena B de la enolasa de

H. influenzae; estos resultados no sorprenden, ya que al ser un homodímero, ambas cadenas tienen la misma secuencia. El mejor modelo se seleccionó en función de la mejor puntuación de energía de acoplamiento, que fue de −249,7 y −213,22 para Cln I y Cln III, respectivamente. En ambos casos, el motivo putativo de unión a colágeno de NTHiENO correspondiente a los aminoácidos72-139, son equivalentes a la región 73-140 de *L. plantarum* antes mencionada, se encuentra presente en la región de la interfaz (Figura 11 A y 11 B); sin embargo, para el caso de la interacción NTHiENO-Cln I, el área de interfaz (Å2) fue mayor con respecto a NTHiENO-Cln III, es decir Cln I presenta mayor superficie de contacto con NTHiENO, con respecto a Cln III (Tabla 5 y 6).

Por otro lado, el análisis realizado con PDBsum del complejo NTHiENO-Cln I, identificó tres residuos importantes en el homodímero de NTHiENO [TYR235 (cadena A), ASN72 y ASN73 (cadena B)] involucrados en la formación de cuatro puentes de hidrógeno con Cln I; dos de ellos ASN72 y ASN73 (cadena B) interactúan con GLN10 y ARG11 de las cadenas α I de Cln I formando tres puentes de hidrógeno, y el tercero TYR235 (cadena A) interactúa con HYP20 de la cadena α 2. Además, también se identificó un puente salino entre GLU415 (Cadena A) y ARG 11 de la cadena α I (Figura 12 B, C). Estos resultados podrían estar indicando que NTHiENO, presenta mejor afinidad con las cadenas α I con respecto a la cadena α 2 de Cln I, debido a la mayor formación de puentes de hidrógeno, además de los múltiples enlaces débiles. Curiosamente, en los ensayos de interacción *in vitro* por Far-Western Blot, se observó que rEnoHi interactúa con la banda correspondiente a la cadena α I de Cln I, (Figura 14 B, C). La capacidad de rEnoHi para unirse a Cln I también se examinó mediante ensayos ELISA, y los resultados muestran que rEnoHi se une a Cln I en manera dependiente de la concentración de Cln I (Figura 15).

En el caso del análisis de interacciones del complejo NTHiENO-Cln III, se observó que la interacción podría estar mediada principalmente por tres puentes de hidrógeno correspondientes a LEU130, TYR131 y VAL32 de la cadena B de NTHiENO y tres residuos de Cln III correspondientes a HYP23, HYP26, HYP29 de la cadena α 1´, además de múltiples interacciones débiles. Sin embargo, en las pruebas de Far-Western Blot no se observó señal, así como en las pruebas de ELISA, ya que la capacidad de rEnoHi para unirse a Cln III observada en la cinética de interacción, no tuvo diferencia significativa con

respecto al control negativo (Figura 15). Cabe mencionar que el acoplamiento molecular se realizó con la estructura cristalizada del colágeno tipo III de humano, y en las pruebas *in vitro*, se utilizó colágeno bovino tipo III. Suponemos que esta falta de interacción observada en los ensayos *in vitro* podría deberse al tropismo tisular que presenta *H. influenzae* por su hospedero, ya que coloniza exclusivamente la nasofaringe de humanos (Watts & Holta, 2019).

Por otra parte, el colágeno tipo I se purificó a partir de la cola de ratón, y en los análisis *in vitro* sí se observó interacción con rEnoHi, para analizar un poco más este resultado, se realizó un alineamiento con las secuencias del colágeno tipo I de humano y de ratón; los resultados mostraron un alto porcentaje de identidad que fue del 92,36%. Por lo tanto, este alto grado de similitud nos permite extrapolar los resultados de lo que podría suceder naturalmente con el colágeno de humano tipo I. Con estos datos, asumimos que rEnoHi podría interactuar con esta proteína, y esta interacción se llevaría a cabo principalmente con las cadenas α 1.

Para el caso del colágeno tipo III bovino, no encontramos la secuencia disponible en la base de datos del NCBI, sin embargo, con base a los resultados obtenidos por acoplamiento molecular, podemos suponer que existe una alta probabilidad de interacción entre ambas proteínas. Aunque la afinidad de NTHiENO sería preferentemente hacia el colágeno tipo I, como se observa en los resultados obtenidos por Prodigy, donde los valores de la energía libre de Gibbs ΔG: -10,0, así como la constante de disociación Kd: 8,7 × 10-^{8} observados, fueron mejores con respecto a los valores obtenidos para el colágeno tipo III ΔG: -5,2 y Kd: 2,3 × 10-, además Cln I también presentó la mayor formación de puentes de hidrógeno, puentes salinos y enlaces débiles, y estos resultados fueron consistentes con los ensayos *in vitro*, por lo tanto, proponemos que NTHiENO podría presentar una mejor capacidad para unirse a Cln I con respecto a Cln III. Esto ha sido reportado en estudios con las enolasas de *S. aureus y L. crispatus* (Antikainen, Kupannen, *et al*., 2007)*; L. casei* BL23 (Muñoz-Provencio *et al*., 2011b); *P. brasiliensis* (Marcos *et al*., 2012) y *L. plantarum* (Salzillo e*t al*., 2015); estas enolasas presentan una fuerte unión al colágeno tipo I.

La mejor afinidad que existe hacia el colágeno tipo I con respecto al colágeno tipo III probablemente se deba a las diferencias en la estructura que presentan, teniendo en cuenta que, la triple hélice del colágeno tipo I está compuesta por dos cadenas α1(I) y una cadena α2(I) (Gao *et al*., 2017), mientras que el colágeno tipo III es un homotrímero de tres cadenas polipeptídicas idénticas (Risteli *et al*., 2014), superenrolladas entre sí en una triple hélice dextrógira (Nielsen & Karsdal, 2016), por lo que asumimos que la exposición de ciertos residuos favorece una mejor interacción con Cln I.

Como ya se mencionó anteriormente, en la enolasa de *L. plantarum* se demostró que la región que abarca entre los residuos 73 y 140 está involucrada en la unión al colágeno tipo I (Salzillo *et al*., 2015). En nuestros resultados identificamos a los residuos ASN72, ASN73 (cadena B) y TYR235 (cadena A), y LEU130, TYR131 (cadena B) de NTHiENO, esenciales para la formación de puentes de hidrógeno con el colágeno tipo I y tipo III, respectivamente; Estos aminoácidos están presentes en el motivo putativo de unión a colágeno (72-139) (Figura 12 A y 13 A). Por tanto, con este antecedente, y los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos a los residuos (Asn72 y Asn73) y (Leu130 y Tyr131) de NTHiENO, como principales sitios de unión a Cln I; sin embargo, otros residuos podrían ser de vital importancia para mantener estas interacciones.

Por lo tanto, el colágeno humano podría ser un objetivo importante para la enolasa de cepas de *H. influenzae* tanto tipificables como no tipificables (debido al alto porcentaje de identidad que presentan entre ellas 99,54%) (Osorio Aguilar *et al*.,2018).

Otro componente importante de la MEC con el cual se ha identificado que la enolasa puede interaccionar es con la fibronectina; en los ensayos de acoplamiento molecular por HDOCK, observamos que NTHiENO y FN presentan complementariedad de forma (Figura 16). Además, los resultados obtenidos por Prodigy mostraron una alta afinidad de unión (Kcal/ mol) de -12,5 y una Kd (M) a 37.0 ℃, de $1{,}9\times10^{-9}$. Por otra parte, un análisis de interacciones mostró que la unión entre ambas proteínas está mediada por seis puentes de hidrógeno, un puente salino y 147 enlaces débiles. En este análisis también se identificaron los residuos importantes de NTHiENO, para la formación de seis puentes de hidrógeno correspondientes a SER57, LYS56 (cadena A) y ARG419, LYS195, ASP311, GLY364 (cadena B) y los residuos de FN correspondientes a ASP107, ASP137,

GLN84, ASN146, GLN187, GLN252 (Figura 17 A, B). La afinidad de interacción entre ambas proteínas fue evaluada por ELISA, donde se observó que rEnoHi se une de manera dependiente de la concentración a la FN inmovilizada (Figura 18). Estos resultados son consistentes con lo reportado para la enolasa de *S. suis* (Esgleas et al., 2008b); *L. plantarum* (Castaldo *et al*., 2009b)*; P.brasiliensis* (Marcos *et al*., 2012)*; Mycoplasma synoviae* (Bao *et al*., 2014)*; C. albicans, C. tropicalis* (Satala *et al*., 2020)*; M. hyorhinis* (Jia Wang *et al*., 2022)*;* entre otros.

Por lo tanto, estas interacciones, tanto con el colágeno como con fibronectina, podrían potenciar la adhesión de *H. influenzae* a los principales componentes de la MEC, y por consiguiente promover la invasión a las células hospederas, que también podría verse favorecida por su interacción con el plasminógeno humano (Plg) y su posterior conversión en plasmina activa (P. Jiang *et al*., 2019). Lo que podría tener relación con la fisiopatología de *H. influenzae,* ya que la interacción entre el plasminógeno y la enolasa juega un papel clave en la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, favoreciendo la invasión del tejido del hospedero.

Por otra parte, se ha demostrado la expresión de exRNA en importantes fluidos biológicos como la sangre, el semen, la saliva, las secreciones vaginales y la sangre menstrual (Hanson *et al*., 2009). En *S. pneumoniae*, se ha visto que la secuencia de enolasa presenta seis importantes motivos de unión a exRNA y, además, estos motivos promueven la adhesión a las células endoteliales y epiteliales (Zakrzewicz *et al.*, 2016). En la enolasa de *Helicobacter pylori*, también se demostró la presencia de cinco motivos conservados que podrían interactuar con el exARN derivado del hospedero (López-López *et al*., 2018). En este estudio, se analizó la secuencia de NTHiENO y se identificó la presencia de cinco de estos motivos (Tabla 9); esto podría indicar que *H. influenzae* estaría uniéndose con estos motivos para tener adhesión a exRNA, contribuyendo así a la colonización y diseminación de esta bacteria, principalmente por torrente circulatorio; sin embargo, se deben realizar más ensayos para verificar esta hipótesis.

Una vez observada la participación de la enolasa como un factor de virulencia en *H. influenzae*, otro aspecto importante de este trabajo era determinar las propiedades inmunogénicas de la enolasa de *H. influenzae,* inicialmente la secuencia de NTHiENO fue

analizada utilizando un enfoque bioinformático. Cuando la proteína se analizó con el programa VaxiJen, mostró que la enolasa podría funcionar como un antígeno protector; a su vez, AllergenFP v.1,0, la clasifica como una proteína no alergénica; estos resultados indican que NTHiENO puede actuar como un determinante antigénico y no debería causar una reacción alérgica dentro del cuerpo. Los ensayos bioinformáticos también predijeron la presencia de 10 epítopos lineales de células B y 13 epítopos de CTL que se conservan en varios alelos de los supertipos del HLA (Figura 19), cuatro de ellos mostraron superposición. Adicionalmente, los 13 epítopos de CTL se examinaron para determinar la presencia de sitios de escisión proteasomal. Todos los epítopos mostraron varios sitios de escisión para ser procesados por el proteosoma (Tabla 8); este procesamiento por vía citosólica es esencial para que un péptido actúe como epítopo de CTL.

Para corroborar la inmunogenicidad y el efecto inmunoprotector de la enolasa de *H. influenzae* predicha por los análisis *in silico*, la recombinante purificada fue utilizada en ensayos de inmunización en ratones BALB/C. Los anticuerpos policlonales generados, mostraron reconocimientos por rEnoHi (Figura 20 A), además de que alcanzaron títulos de anticuerpos mayores a 1:80,000 (Figura 20 B); cabe destacar que estos anticuerpos mostraron ser específicos al reconocer exclusivamente a la enolasa nativa en extractos de proteínas totales provenientes de diferentes aislados clínicos de *H. influenzae* (tipificables y no tipificables) (Figura 21 B); y disminuir significativamente la interacción rEnoHi-Plg (Figura 5 B). Estos datos indican que la enolasa, es capaz de estimular anticuerpos capaces de reconocer a la enolasa nativa de cepas tipificables y no tipificables; además de bloquear la interacción enolasa-Plg, que como ya se mencionó, es uno de los mecanismos que podría utilizar *H. influenzae* para favorecer su diseminación en el hospedero.

A su vez, se determinó el isotipo de anticuerpos generados, donde observamos que rEnoHi, estimula principalmente a los anticuerpos de la clase IgG1 e IgG2a, seguido de IgG2b, IgG3, IgA e IgM (Figura 22). Este perfil de isotipo de anticuerpos son caracteristicos de una respuesta Th1/Th2; por lo tanto, podemos enfatizar que la inmunización con rEnoHi puede desencadenar una respuesta inmune tanto Th1 como

Th2, tal como se predijo en los análisis *in silico,* sin embargo, se ve polarizada hacia una respuesta inmune Th2 o mediada por anticuerpos, debido a que el isotipo con mayor concentración fue de la clase IgG1; además, estos anticuerpos pueden ser de naturaleza opzonisante (Figura 23 A y 24 A), estos son anticuerpos claves para la eliminación de bacterias que presentan cápsula como es el caso de *H. influenzae.*

En este contexto, informes previos confirman que la estimulación con la enolasa recombinante de *Clonorchis sinensis* (enolasa rCs) conduce a la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a y que la enolasa rCs fusionada con una espora de *Bacillus subtilis* induce una respuesta inmune Th1/Th2 (X. Wang *et al*., 2014). Por otro lado, la enolasa de *C. albicans* puede estimular la secreción de IL-12 e IL-10, además de que también estimula anticuerpos protectores del isotipo IgG1 e IgG2a (Li *et al*., 2011).

Por otra parte, el uso de la enolasa para desencadenar una respuesta inmune protectora se informó en un estudio previo (Jun Wang *et al*., 2015). Los autores observaron que, la inmunización con la proteína recombinante confiere protección eficaz frente a una infección experimental con *Streptococcus iniae*. Otro estudio también informó que la enolasa recombinante de *S. sobrinus* actúa como un antígeno altamente inmunogénico en un modelo de rata, observando una correlación entre la inmunización previa de enolasa recombinante y la disminución de la colonización oral por *S. sobrinus* (Dinis *et al.*, 2009).

De la misma manera, en *Vibrio parahaemolyticus*, se demostró que la vacunación con enolasa recombinante en un modelo de ratón confiere inmunidad eficaz contra una dosis letal de *V. parahaemolyticus* (W. Jiang *et al*., 2014).

El efecto protector de la enolasa también ha sido reportado en parásitos. Por ejemplo, un estudio realizado en la India en el año 2007, mostró que los anticuerpos anti enolasa recombinante de *Plasmodium falciparum* (r-Pfen) inhiben su crecimiento en un cultivo *in vitro*; adicionalmente, los ratones inmunizados con r-Pfen demostraron protección frente a una infección con la cepa letal de *Plasmodium yoelii* 17XL (Pal-Bhowmick *et al*., 2007).

Resultados similares se reportaron para la enolasa de *Ascaris suum*, donde se observó una disminución en la recuperación de larvas y huevos del 61.13 y 88.62%

respectivamente, en ratones previamente inmunizados con enolasa y que posteriormente fueron infectados con 2500 larvas de *A. suum*; sugiriendo una vez más que la enolasa puede ser una vacuna candidata contra las infecciones por *A. suum* (Chen *et al*., 2012). Otro estudio mostró que la enolasa recombinante de *T. cruzi* fue reconocida por sueros de pacientes infectados; esto indica que la enolasa es reconocida por el sistema inmunológico de los pacientes y, por lo tanto, es inmunogénica (Carabarín-Lima *et al*., 2014).

De manera importante, la enolasa se ha utilizado como un inmunógeno para el desarrollo de vacunas de varias bacterias como: *Staphylococcus aureus* (Glowalla *et al*., 2009), *Vibrio parahaemolyticus* (W. Jiang *et al*., 2014)*, Streptococcus iniae* (Jun Wang *et al*., *2015),* entre otros; mostrando especificidad y capacidad para conferir protección en modelos infectados experimentalmente.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo son alentadores para proponer a la enolasa recombinante de *H. influenzae* como un potencial candidato vacunal contra las infecciones por esta bacteria, ya que podría generar protección contra todos los serotipos y las cepas no tipificables.

11. CONCLUSIONES

- La enolasa recombinante de *H. influenzae* interacciona con plasminógeno humano y esta interacción es dependiente de concentración.
- Los anticuerpos policlonales contra rEnoHi, disminuyen significativamente la interacción de rEnoHi-Plg.
- La enolasa interacciona con los dominios *kringle* (K2, K3 y K5) del plasminógeno.
- Los residuos de la enolasa claves para la interacción con plasminógeno humano son GLU251, TYR 253 y LYS2 55 (dentro del motivo putativo de unión a Plg).
- La enolasa de *H. influenzae* interacciona con proteínas de la matriz extracelular (colágeno y fibronectina), lo cual sugiere que podría ser un determinante de la virulencia al actuar como adhesina.
- Se logró identificar los residuos clave que participan en la interacción de dichas proteínas con la enolasa de *H. influenzae.*
- La enolasa recombinante de *H. influenzae* es altamente inmunogénica y estimula una respuesta inmune humoral y celular (IgG1 e IgG2a).
- Los anticuerpos policlonales contra la enolasa recombinante reconocen a la enolasa nativa *de H. influenzae* de cepas tipificables y no tipificables.

12. PERSPECTIVAS

- Realizar mutaciones sitio dirigidas para confirmar la participación en la interacción de los residuos propuestos con las diferentes proteínas de la matriz extracelular.
- Complementar los ensayos de interacción con fibronectina.
- Diseñar un protocolo en un biomodelo adecuado, para evaluar la protección que podría conferir la inmunización con rEnoHi.
- Complementar los ensayos para identificar anticuerpos opsonizantes y su asociación en la interacción macrófago-*H. influenzae.*
- Determinar el tipo de citocinas séricas producidas posterior a la inmunización (IL-2, IL-4, IL-10 e INF-Y).
- Realizar ensayos de inmunoproliferación e identificar subpoblaciones celulares ($CD4^+$ y $CD8^+$) posterior a la inmunización con la rEnoHi.

13. BIBLIOGRAFIA

Adderson, E. E., Byington, C. L., Spencer, L., Kimball, A., Hindiyeh, M., Carroll, K., Mottice, S., Korgenski, E. K., Christenson, J. C., & Pavia, A. T. (2001). Invasive serotype a Haemophilus influenzae infections with a virulence genotype resembling Haemophilus influenzae type b: emerging pathogen in the vaccine era? *Pediatrics*, *108*(1). https://doi.org/10.1542/peds.108.1.e18

Agarwal, S., Kulshreshtha, P., Bambah Mukku, D., & Bhatnagar, R. (2008). ??-Enolase binds to human plasminogen on the surface of Bacillus anthracis. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1784*(7–8), 986–994. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.03.017

Aguayo-Ortiz, R., Meza-Cervantez, P., Castillo, R., Hernández-Campos, A., Dominguez, L., & Yépez-Mulia, L. (2017). Insights into the: Giardia intestinalis enolase and human plasminogen interaction. *Molecular BioSystems*, *13*(10), 2015–2023. https://doi.org/10.1039/c7mb00252a

Ahearn, C. P., Gallo, M. C., & Murphy, T. F. (2017). Insights on persistent airway infection by non-typeable Haemophilus influenzae in chronic obstructive pulmonary disease. *Pathogens and Disease*, *75*(4), 42. https://doi.org/10.1093/FEMSPD/FTX042

Antikainen, J., Kupannen, V., Lähteenmäki, K., & Korhonen, T. K. (2007). pH-dependent association of enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Lactobacillus crispatus with the cell wall and lipoteichoic acids. *Journal of Bacteriology*, *189*(12), 4539–4543. https://doi.org/10.1128/JB.00378-07

Antikainen, J., Kuparinen, V., Lähteenmäki, K., & Korhonen, T. K. (2007). Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *51*(3), 526–534. https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2007.00330.X

Arce, F. T., Carlson, R., Monds, J., Veeh, R., Hu, F. Z., Stewart, P. S., Lal, R., Ehrlich, G. D., & Avci, R. (2009). Nanoscale Structural and Mechanical Properties of Nontypeable Haemophilus influenzae Biofilms. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, *191*(8), 2512–2520. https://doi.org/10.1128/JB.01596-08

Ay, D. A., Fragoso, G., Bobes, J., & Laclette, J. P. (2018). *Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host ' s innate immunity in*. *0*(August), 1–16.

Bailão, A. M., Nogueira, S. V., Rondon Caixeta Bonfim, S. M., De Castro, K. P., De Fátima da Silva, J., Mendes Giannini, M. J. S., Pereira, M., & De Almeida Soares, C. M. (2012). Comparative transcriptome analysis of Paracoccidioides brasiliensis during in vitro adhesion to type I collagen and fibronectin: identification of potential adhesins. *Research in Microbiology*, *163*(3), 182–191. https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2012.01.004

Ballón Paucara, W. G., & Grados Torrez, R. E. (2019). Acomplamiento molecular:: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*, *7*(2), 55–72. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-

02652019000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
Bao, S., Guo, X., Yu, S., Ding, J., Tan, L., Zhang, F., Sun, Y., Qiu, X., Chen, G., & Ding, C. (2014). Mycoplasma synoviae enolase is a plasminogen/fibronectin binding protein. *BMC Veterinary Research*, *10*(1). https://doi.org/10.1186/S12917-014-0223-6
Behrouzi, A., Vaziri, F., Rahimi-Jamnani, F., Afrough, P., Rahbar, M., Satarian, F., & Siadat, S. D. (2017). Vaccine candidates against nontypeable Haemophilus influenzae: A review. In *Iranian Biomedical Journal* (Vol. 21, Issue 2, pp. 69–76). Pasteur Institute of Iran. https://doi.org/10.18869/acadpub.ibj.21.2.69
Benkert, P., Tosatto, S. C. E., & Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins*, *71*(1), 261–277. https://doi.org/10.1002/PROT.21715
Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S., & Hammerschmidt, S. (2001). ??-Enolase of Streptococcus pneumoniae is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular Microbiology*, *40*(6), 1273–1287. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02448.x
Bergmann, Simone, Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G. S., & Hammerschmidt, S. (2003). Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed α-enolase of Streptococcus pneumoniae. *Molecular Microbiology*, *49*(2), 411–423. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03557.x
Bhattacharya, S., Ploplis, V. A., & Castellino, F. J. (2012). Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/482096
Bode, M. (2000). *CHARACTERIZATION OF TYPE I AND TYPE III COLLAGENS IN HUMAN TISSUES OULU 2000*. http://herkules.oulu.fi/issn03553221/
Boël, G., Pichereau, V., Mijakovic, I., Mazé, A., Poncet, S., Gillet, S., Giard, J. C., Hartke, A., Auffray, Y., & Deutscher, J. (2004). Is 2-phosphoglycerate-dependent automodification of bacterial enolases implicated in their export? *Journal of Molecular Biology*, *337*(2), 485–496. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.12.082
Bönnemann, C. G., & Voermans, N. C. (2012). ECM-Related Myopathies and Muscular Dystrophies. *Muscle*, *2*, 979–994. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00070-3
Bruce, M. G., Deeks, S. L., Zulz, T., Navarro, C., Palacios, C., Case, C., Hemsley, C., Hennessy, T., Corriveau, A., Larke, B., Sobel, I., Lovgren, M., DeByle, C., Tsang, R., Parkinson, A. J., Burden, D., Harker-Jones, M., Hummel, K. B., Hurlburt, D., … Ringuette, L. (2008). Epidemiology of Haemophilus influenzae serotype a, North American Arctic, 2000-2005. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(1), 48–55. https://doi.org/10.3201/eid1401.070822
Candela, M., Bergmann, S., Vici, M., Vitali, B., Turroni, S., Eikmanns, B. J., Hammerschmidt, S., & Brigidi, P. (2007). Binding of human plasminogen to Bifidobacterium. *Journal of Bacteriology*, *189*(16), 5929–5936. https://doi.org/10.1128/JB.00159-07
Candela, M., Biagi, E., Centanni, M., Turroni, S., Vici, M., Musiani, F., Vitali, B., Bergmann, S., Hammerschmidt, S., & Brigidi, P. (2009). Bifidobacterial

enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host. *Microbiology*, *155*(10), 3294–3303. https://doi.org/10.1099/mic.0.028795-0

Capello, M., Ferri-Borgogno, S., Cappello, P., & Novelli, F. (2011). α-enolase: A promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS Journal*, *278*(7), 1064–1074. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08025.x

Carabarín-Lima, A., Rodríguez-Morales, O., González-Vázquez, M. C., Baylón-Pacheco, L., Reyes, P. A., Arce-Fonseca, M., & Rosales-Encina, J. L. (2014). In silico approach for the identification of immunological properties of enolase from Trypanosoma cruzi and its possible usefulness as vaccine in Chagas disease. *Parasitology Research*, *113*(3), 1029–1039. https://doi.org/10.1007/s00436-013-3737-0

Carneiro, C. R. W., Postol, E., Nomizo, R., Reis, L. F. L., & Brentani, R. R. (2004). Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of Staphylococcus aureus. *Microbes and Infection*, *6*(6), 604–608. https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2004.02.003

Castaldo, C., Vastano, V., Siciliano, R. A., Candela, M., Vici, M., Muscariello, L., Marasco, R., & Sacco, M. (2009a). Surface displaced alfa-enolase of Lactobacillus plantarum is a fibronectin binding protein. *Microbial Cell Factories*, *8*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-14/FIGURES/6

Castaldo, C., Vastano, V., Siciliano, R. A., Candela, M., Vici, M., Muscariello, L., Marasco, R., & Sacco, M. (2009b). Surface displaced alfa-enolase of Lactobacillus plantarum is a fibronectin binding protein. *Microbial Cell Factories*, *8*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-14/FIGURES/6

Castellino, F. J., & Ploplis, V. A. (2005). Structure and function of the plasminogen/plasmin system. In *Thrombosis and Haemostasis* (Vol. 93, Issue 4, pp. 647–654). Thromb Haemost. https://doi.org/10.1160/TH04-12-0842

Chagnot, C., Listrat, A., Astruc, T., & Desvaux, M. (2012). Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. *Cellular Microbiology*, *14*(11), 1687–1696. https://doi.org/10.1111/CMI.12002

Chandran, V., & Luisi, B. F. (2006). Recognition of enolase in the Escherichia coli RNA degradosome. *Journal of Molecular Biology*, *358*(1), 8–15. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.012

Chen, N., Yuan, Z. G., Xu, M. J., Zhou, D. H., Zhang, X. X., Zhang, Y. Z., Wang, X. W., Yan, C., Lin, R. Q., & Zhu, X. Q. (2012). Ascaris suum enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine*, *30*(23), 3478–3482. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.075

Chumchua, V., Pornputtapong, N., hammarongtham, C. T., & Meksuriyen, D. (2008). Homology modeling of Mycoplasma pneumoniae enolase and its molecular interaction with human- plasminogen. *Bioinformation*, *3*(1), 18–23. https://doi.org/10.6026/97320630003018

Deng, H., Wu, S., Song, Q., Zhang, J., Sang, F., Sun, X., Xu, T., Gao, Y., & Zhao, B. (2019). Cloning and identification of Bartonella α-enolase as a plasminogen-binding protein. *Microbial Pathogenesis*, *135*(August), 103651. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103651

Derbise, A., Song, Y. P., Parikh, S., Fischetti, V. A., & Pancholi, V. (2004). Role of

the C-Terminal Lysine Residues of Streptococcal Surface Enolase in Glu- and Lys-Plasminogen-Binding Activities of Group A Streptococci. *Infection and Immunity*, *72*(1), 94–105. https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.94-105.2004

Díaz-Ramos, À., Roig-Borrellas, A., García-Melero, A., & López-Alemany, R. (2012). α-enolase, a multifunctional protein: Its role on pathophysiological situations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/156795

Dinis, M., Tavares, D., Veiga-Malta, I., Fonseca, A. J. M. M., Andrade, E. B., Trigo, G., Ribeiro, A., Videira, A., Cabrita, A. M. S., & Ferreira, P. (2009). Oral Therapeutic Vaccination with *Streptococcus sobrinus* Recombinant Enolase Confers Protection against Dental Caries in Rats. *Journal of Infectious Diseases*, *199*(1), 116–123. https://doi.org/10.1086/594372

Donofrio, F. C., Calil, A. C. A., Miranda, E. T., Almeida, A. M. F., Benard, G., Soares, C. P., Veloso, S. N., De Almeida Soares, C. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2009). Enolase from Paracoccidioides brasiliensis: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *Journal of Medical Microbiology*, *58*(Pt 6), 706–713. https://doi.org/10.1099/JMM.0.003830-0

Duell, B. L., Su, Y. C., & Riesbeck, K. (2016). Host–pathogen interactions of nontypeable Haemophilus influenzae: from commensal to pathogen. *FEBS Letters*, *590*(21), 3840–3853. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12351

Esgleas, M., Li, Y., Hancock, M. A., Harel, J., Dubreuil, J. D., & Gottschalk, M. (2008a). Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from Streptococcus suis. *Microbiology (Reading, England)*, *154*(Pt 9), 2668–2679. https://doi.org/10.1099/MIC.0.2008/017145-0

Esgleas, M., Li, Y., Hancock, M. A., Harel, J., Dubreuil, J. D., & Gottschalk, M. (2008b). Isolation and characterization of α-enolase, a novel fibronectin-binding protein from Streptococcus suis. *Microbiology*, *154*(9), 2668–2679. https://doi.org/10.1099/MIC.0.2008/017145-0

Foxwell, A. R., Kyd, J. M., & Cripps, A. W. (1998). Nontypeable Haemophilus influenzae: Pathogenesis and Prevention. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(2), 294–308. https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.294-308.1998

Fulde, M., Steinert, M., & Bergmann, S. (2013). Interaction of streptococcal plasminogen binding proteins with the host fibrinolytic system. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *3*(NOV). https://doi.org/10.3389/FCIMB.2013.00085

Gao, L., Orth, P., Cucchiarini, M., & Madry, H. (2017). Effects of solid acellular type-I/III collagen biomaterials on in vitro and in vivo chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Expert Review of Medical Devices*, *14*(9), 717–732. https://doi.org/10.1080/17434440.2017.1368386

Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *55*(12), 1531–1546. https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2003.08.002

Ghosh, A. K., Coppens, I., Gardsvoll, H., Ploug, M., & Jacobs-Lorena, M. (2011). Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(41), 17153–17158. https://doi.org/10.1073/pnas.1103657108

Glowalla, E., Tosetti, B., Krönke, M., & Krut, O. (2009). Proteomics-based

identification of anchorless cell wall proteins as vaccine candidates against Staphylococcus aureus. *Infection and Immunity*, *77*(7), 2719–2729. https://doi.org/10.1128/IAI.00617-08

Gorgieva, S., & Kokol, V. (2011). Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. https://doi.org/10.5772/24118

Graille, M., Pagano, M., Rose, T., Ravaux, M. R., & van Tilbeurgh, H. (2010). Zinc Induces Structural Reorganization of Gelatin Binding Domain from Human Fibronectin and Affects Collagen Binding. *Structure*, *18*(6), 710–718. https://doi.org/10.1016/J.STR.2010.03.012

Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, *18*(15), 2714–2723. https://doi.org/10.1002/elps.1150181505

Hall, R. A. (2015). Studying protein-protein interactions via blot overlay/far western blot. *Methods in Molecular Biology*, *1278*, 371–379. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2425-7_24

Hanson, E. K., Lubenow, H., & Ballantyne, J. (2009). Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Analytical Biochemistry*, *387*(2), 303–314. https://doi.org/10.1016/J.AB.2009.01.037

Hassan, N. M., Alhossary, A. A., Mu, Y., & Kwoh, C. K. (2017). Protein-Ligand Blind Docking Using QuickVina-W with Inter-Process Spatio-Temporal Integration. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15571-7

Hsiao, K. C., Shih, N. Y., Fang, H. L., Huang, T. S., Kuo, C. C., Chu, P. Y., Hung, Y. M., Chou, S. W., Yang, Y. Y., Chang, G. C., & Liu, K. J. (2013). Surface α-Enolase Promotes Extracellular Matrix Degradation and Tumor Metastasis and Represents a New Therapeutic Target. *PLoS ONE*, *8*(7), 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069354

Hua, C., Zhu, Y., Xu, W., Ye, S., Zhang, R., Lu, L., & Jiang, S. (2019). Characterization by high-resolution crystal structure analysis of a triple-helix region of human collagen type III with potent cell adhesion activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *508*(4), 1018–1023. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.12.018

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, *14*(1), 33–38. https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5

Hussain, M., Kohler, C., & Becker, K. (2022). Enolase of Staphylococcus lugdunensis Is a Surface-Exposed Moonlighting Protein That Binds to Extracellular Matrix and the Plasminogen/Plasmin System. *Frontiers in Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.837297/FULL

Jeffery, C. J. (2003). Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends in Genetics : TIG*, *19*(8), 415–417. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00167-7

Jeffery, C. J. (2016). What is Protein Moonlighting and Why is it Important? *Moonlighting Proteins: Novel Virulence Factors in Bacterial Infections*, *figure 1*, 1–19. https://doi.org/10.1002/9781118951149.ch1

Jiang, P., Zao, Y. J., Yan, S. W., Song, Y. Y., Yang, D. M., Dai, L. Y., Liu, R. D., Zhang, X., Wang, Z. Q., & Cui, J. (2019). Molecular characterization of a Trichinella spiralis enolase and its interaction with the host's plasminogen. *Veterinary Research*, *50*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s13567-019-0727-y

Jiang, W., Han, X., Wang, Q., Li, X., Yi, L., Liu, Y., & Ding, C. (2014). Vibrio parahaemolyticus enolase is an adhesion-related factor that binds plasminogen and functions as a protective antigen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(11), 4937–4948. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5471-z

Kainulainen, V., & Korhonen, T. (2014). Dancing to Another Tune—Adhesive Moonlighting Proteins in Bacteria. *Biology*, *3*(1), 178–204. https://doi.org/10.3390/biology3010178

Karbassi, F., Quiros, V., Pancholi, V., & Kornblatt, M. J. (2010). Dissociation of the Octameric Enolase from S. Pyogenes - One Interface Stabilizes Another. *PLOS ONE*, *5*(1), e8810. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0008810

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, *10*(6), 845–858. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053

Kornblatt, M. J., Kornblatt, J. A., & Hancock, M. A. (2011). *The Interaction of Canine Plasminogen with Streptococcus pyogenes Enolase : They Bind to One Another but What Is the Nature of the Structures Involved ? 6*(12), 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028481

Kress-Bennett, J. M., Hiller, N. L., Eutsey, R. A., Powell, E., Longwell, M. J., Hillman, T., Blackwell, T., Byers, B., Mell, J. C., Post, J. C., Hu, F. Z., Ehrlich, G. D., & Janto, B. A. (2016). *Identification and Characterization of msf, a Novel Virulence Factor in Haemophilus influenzae*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149891

Krucinska, J., Falcone, E., Erlandsen, H., Hazeen, A., Lombardo, M. N., Estrada, A., Robinson, V. L., Anderson, A. C., & Wright, D. L. (2019). Structural and Functional Studies of Bacterial Enolase, a Potential Target against Gram-Negative Pathogens. *Biochemistry*, *58*(9), 1188–1197. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01298

Lähteenmäki, K., Kuusela, P., & Korhonen, T. K. (2001). Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(5), 531–552. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00067-5

Langereis, J. D., & De Jonge, M. I. (2015). Invasive disease caused by nontypeable Haemophilus influenzae. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(10), 1711–1718. https://doi.org/10.3201/eid2110.150004

Laskowski, R.A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M., & IUCr. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Urn:Issn:0021-8898*, *26*(2), 283–291. https://doi.org/10.1107/S0021889892009944

Laskowski, Roman A., Jabłońska, J., Pravda, L., Vařeková, R. S., & Thornton, J. M. (2018). PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *27*(1), 129–134. https://doi.org/10.1002/PRO.3289

Law, R. H. P., Wu, G., Leung, E. W. W., Hidaka, K., Quek, A. J., Caradoc-Davies, T. T., Jeevarajah, D., Conroy, P. J., Kirby, N. M., Norton, R. S., Tsuda, Y., &

Whisstock, J. C. (2017). X-ray crystal structure of plasmin with tranexamic acid–derived active site inhibitors. *Blood Advances*, *1*(12), 766–771. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016004150

León, M. E., Kawabata, A., Nagai, M., Rojas, L., Chamorro, G., Zárate, N., Gómez, G., Leguizamón, M., Irala, J., Ortellado, J., Franco, R., & Segovia, N. (2021). Estudio epidemiológico de Haemophilus influenzae causante de enfermedad invasiva y no invasiva en Paraguay (1999-2017). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *39*(2), 59–64. https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2020.02.020

Li, W. qing, Hu, X. chu, Zhang, X., Ge, Y., Zhao, S., Hu, Y., & Ashman, R. B. (2011). Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against Candida albicans infection in mice. *Vaccine*, *29*(33), 5526–5533. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.030

López-López, M. D. J., Rodríguez-Luna, I. C., Lara-Ramírez, E. E., López-Hidalgo, M., Benítez-Cardoza, C. G., & Guo, X. (2018). Biochemical and Biophysical Characterization of the Enolase from Helicobacter pylori. *BioMed Research International*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/9538193

Lottenberg, R., Minning-Wenz, D., & Boyle, M. D. P. (1994). Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends in Microbiology*, *2*(1), 20–24. https://doi.org/10.1016/0966-842X(94)90340-9

Marcos, C. M., de Fátima da Silva, J., de Oliveira, H. C., Moraes da Silva, R. A., Mendes-Giannini, M. J. S., & Fusco-Almeida, A. M. (2012). Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of Paracoccidioides brasiliensis to host cells. *FEMS Yeast Research*, *12*(5), 557–570. https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2012.00806.X

Marti, D. N., Schaller, J., & Llinás, M. (1999). Solution structure and dynamics of the plasminogen kringle 2-AMCHA complex: 31-helix in homologous domains. *Biochemistry*, *38*(48), 15741–15755. https://doi.org/10.1021/bi9917378

Matter, H., Brachvogel, V., Lönze, P., Walser, A., Al-Obeidi, F., Wildgoose, P., Defossa, E., Heinelt, U., Blohm, P. M., Schneider, D., Müller, A., Herok, S., Schreuder, H., & Liesum, A. (2002). Design and quantitative structure-activity relationship of 3-amidinobenzyl-1H-indole-2-carboxamides as potent, nonchiral, and selective inhibitors of blood coagulation factor Xa. *Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(13), 2749–2769. https://doi.org/10.1021/jm0111346

Menhart, N., McCance, S. G., Sehl, L. C., & Castellino, F. J. (1993). Functional Independence of the Kringle 4 and Kringle 5 Regions of Human Plasminogen. *Biochemistry*, *32*(34), 8799–8806. https://doi.org/10.1021/bi00085a010

Mundodi, V., Kucknoor, A. S., & Alderete, J. F. (2008). Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated α-enolase of Trichomonas vaginalis. *Infection and Immunity*, *76*(2), 523–531. https://doi.org/10.1128/IAI.01352-07

Muñoz-Provencio, D., Pérez-Martínez, G., & Monedero, V. (2011a). Identification of Surface Proteins from Lactobacillus casei BL23 Able to Bind Fibronectin and Collagen. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *3*(1), 15–20. https://doi.org/10.1007/S12602-011-9065-8

Muñoz-Provencio, D., Pérez-Martínez, G., & Monedero, V. (2011b). Identification of Surface Proteins from Lactobacillus casei BL23 Able to Bind Fibronectin and Collagen. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *3*(1), 15–20.

https://doi.org/10.1007/S12602-011-9065-8/FIGURES/3
Muscariello, L., De Siena, B., & Marasco, R. (2020). Lactobacillus Cell Surface Proteins Involved in Interaction with Mucus and Extracellular Matrix Components. *Current Microbiology*, *77*(12), 3831. https://doi.org/10.1007/S00284-020-02243-5
N, T., S, S., N, I., M, O., S, T., M, S., K, M., & F, N. (2018). Capsular serotyping of Haemophilus influenzae by using matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Infection and Chemotherapy : Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, *24*(7), 510–514. https://doi.org/10.1016/J.JIAC.2018.02.007
Nielsen, A.B. and Holder, A.J. (2009) Gauss View 5.0, User's Reference. GAUSSIAN Inc., Pittsburgh. - References - Scientific Research Publishing. (n.d.). Retrieved November 12, 2020, from https://www.scirp.org/(S(vtj3fa45qm1ean45vvffcz55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1379504
Nielsen, M. J., & Karsdal, M. A. (2016). Type III Collagen. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: Structure, Function and Biomarkers*, 21–30. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00003-9
Nogueira, S. V., Backstedt, B. T., Smith, A. A., Qin, J., Jr, E. A. W., Ko, A., & Pal, U. (2013). *Leptospira interrogans Enolase Is Secreted Extracellularly and Interacts with Plasminogen*. *8*(10), 1–11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078150
Oliver, S. E., Rubis, A. B., Soeters, H. M., Reingold, A., Barnes, M., Petit, S., Farley, M. M., Harrison, L. H., Como-Sabetti, K., Khanlian, S. A., Wester, R., Thomas, A., Schaffner, W., Marjuki, H., Wang, X., & Hariri, S. (2023). Epidemiology of invasive nontypeable Haemophilus influenzae disease-United States, 2008-2019. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. https://doi.org/10.1093/CID/CIAD054
Osman, K. L., Jefferies, J. M., Woelk, C. H., Cleary, D. W., & Clarke, S. C. (2018). The adhesins of non-typeable Haemophilus influenzae. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *16*(3), 187–196. https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1438263
Osorio Aguilar, Y., & OSORIO AGUILAR, Y. 675961. (2018). Análisis bioinformático y experimental de las propiedades inmunogénicas de la Enolasa de Haemophilus influenzae. *Exploraciones, Intercambios y Relaciones Entre El Diseño y La Tecnología*, 57–79. https://doi.org/10.16/CSS/JQUERY.DATATABLES.MIN.CSS
Pablo, F., Dávila, V., Verónica, C., Wilson, N., Aída, M., & Domínguez, M. (2018). Microbial Pathogenesis Immunization with Larrea divaricata Cav . proteins elicits opsonic antibodies against Pseudomonas aeruginosa and induces phagocytic activity of murine macrophages. *Microbial Pthogenesis*, *118*(March), 257–267. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.029
Pal-Bhowmick, I., Mehta, M., Coppens, I., Sharma, S., & Jarori, G. K. (2007). Protective properties and surface localization of Plasmodium falciparum enolase. *Infection and Immunity*, *75*(11), 5500–5508. https://doi.org/10.1128/IAI.00551-07
Pancholi, V. (2001b). Multifunctional α-enolase: Its role in diseases. *Cellular and*

Molecular Life Sciences, *58*(7), 902–920. https://doi.org/10.1007/PL00000910
Pancholi, V. (2001a). Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *58*(7), 902–920. https://doi.org/10.1007/PL00000910
Pancholi, Vijay, & Chhatwal, G. S. (2003). Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, *293*(6), 391–401. https://doi.org/10.1078/1438-4221-00283
Pancholi, Vijaykumar, & Fischetti, V. A. (1998). alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(23), 14503–14515. https://doi.org/10.1074/JBC.273.23.14503
Periarticular Ligamentous Tissue: A Biochemical and Physiologic Assessment | Musculoskeletal Key. (n.d.). Retrieved July 28, 2022, from https://musculoskeletalkey.com/periarticular-ligamentous-tissue-a-biochemical-and-physiologic-assessment/
Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(13), 1605–1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084
Platt, A., Ross, H. C., Hankin, S., & Reece, R. J. (2000). The insertion of two amino acids into a transcriptional inducer converts it into a galactokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(7), 3154–3159. https://doi.org/10.1073/PNAS.97.7.3154
Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., Medina-Franco, J. L., Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2018). Molecular docking: current advances and challenges. *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *21*(1), 65–87. https://doi.org/10.22201/FESZ.23958723E.2018.0.143
Puig, C., Domenech, A., Garmendia, J., Langereis, J. D., Mayer, P., Calatayud, L., Liñares, J., Ardanuy, C., & Marti, S. (2014). Increased biofilm formation by nontypeable Haemophilus influenzae isolates from patients with invasive disease or otitis media versus strains recovered from cases of respiratory infections. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(22), 7088–7095. https://doi.org/10.1128/AEM.02544-14
Rahi, A., Dhiman, A., Singh, D., Lynn, A. M., Rehan, M., & Bhatnagar, R. (2018). Exploring the interaction between Mycobacterium tuberculosis enolase and human plasminogen using computational methods and experimental techniques. *Journal of Cellular Biochemistry*, *119*(2), 2408–2417. https://doi.org/10.1002/jcb.26403
Rao, V. K., Krasan, G. P., Hendrixson, D. R., Dawid, S., & St. Geme, J. W. (1999a). Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiology Reviews*, *23*(2), 99–129. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00393.x
Rao, V. K., Krasan, G. P., Hendrixson, D. R., Dawid, S., & St. Geme, J. W. (1999b). Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable Haemophilus influenzae. *FEMS Microbiology Reviews*, *23*(2), 99–129. https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.1999.TB00393.X

RCSB PDB - 7CWK: Structure of a triple-helix region of human collagen type I. (n.d.). Retrieved July 16, 2022, from https://www.rcsb.org/structure/7CWK

Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(1), a004978. https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A004978

Risteli, L., Koivula, M. K., & Risteli, J. (2014). Procollagen Assays in Cancer. *Advances in Clinical Chemistry*, *66*, 79–100. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801401-1.00003-7

Rittié, L. (2017). Type I Collagen Purification from Rat Tail Tendons. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1627*, 287–308. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_19

Roaa, Z., Abdulsalam, A., Shahid, G., Kamaldeen, B., & Tariq, A. F. (2016). Pediatric invasive disease due to Haemophilus influenzae serogroup A in riyadh, Saudi Arabia: Case series. *Journal of Infection in Developing Countries*, *10*(5), 528–532. https://doi.org/10.3855/jidc.6687

Rodríguez, M. K., Agudelo, C. I., & Duarte, C. (2015). Aislamientos invasivos de Haemophilus influenzae en menores de 5 años: Distribución de los serotipos y de la sensibilidad antimicrobiana, SIREVA II, Colombia 2002-2013. *Infectio*, *19*(2), 67–74. https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.12.005

Rossert, J., & de Crombrugghe, B. (2002). Type I Collagen: Structure, Synthesis, and Regulation. *Principles of Bone Biology*, 189–XVIII. https://doi.org/10.1016/B978-012098652-1.50114-1

S, W., D, F., D, C., L, Y., & Z, X. (2020). Molecular epidemiology and evolution of Haemophilus influenzae. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *80*. https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2020.104205

Salazar, N., Souza, M. C. L. de, Biasioli, A. G., Silva, L. B. da, & Barbosa, A. S. (2017). The multifaceted roles of Leptospira enolase. *Research in Microbiology*, *168*(2), 157–164. https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2016.10.005

Salzillo, M., Vastano, V., Capri, U., Muscariello, L., & Marasco, R. (2017). Pyruvate dehydrogenase subunit β of Lactobacillus plantarum is a collagen adhesin involved in biofilm formation. *Journal of Basic Microbiology*, *57*(4), 353–357. https://doi.org/10.1002/JOBM.201600575

Salzillo, M., Vastano, V., Capri, U., Muscariello, L., Sacco, M., & Marasco, R. (2015). Identification and characterization of enolase as a collagen-binding protein in Lactobacillus plantarum. *Journal of Basic Microbiology*, *55*(7), 890–897. https://doi.org/10.1002/JOBM.201400942

Satala, D., Satala, G., Karkowska-kuleta, J., Bukowski, M., Kluza, A., Rapala-kozik, M., & Kozik, A. (2020). Structural insights into the interactions of candidal enolase with human vitronectin, fibronectin and plasminogen. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 1–28. https://doi.org/10.3390/ijms21217843

Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2005). PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Research*, *33*(Web Server issue), W363. https://doi.org/10.1093/NAR/GKI481

Slack, M. P. E., Cripps, A. W., Grimwood, K., Mackenzie, G. A., & Ulanova, M. (2021). Invasive Haemophilus influenzae Infections after 3 Decades of Hib

Protein Conjugate Vaccine Use. *Clinical Microbiology Reviews*, *34*(3). https://doi.org/10.1128/CMR.00028-21

Soeters, H. M., Blain, A., Pondo, T., Doman, B., Farley, M. M., Harrison, L. H., Lynfield, R., Miller, L., Petit, S., Reingold, A., Schaffner, W., Thomas, A., Zansky, S. M., Wang, X., & Briere, E. C. (2018). Current Epidemiology and Trends in Invasive Haemophilus influenzae Disease-United States, 2009-2015. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *67*(6), 881–889. https://doi.org/10.1093/CID/CIY187

Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, M. G., Leaños-Miranda, B., Ortiz-Ocampo, L. A., Echaniz-Avilés, G., Palacios-Saucedo, G., & Guiscafré-Gallardo, H. (2011). [Haemophilus influenzae nasopharyngeal colonization in children]. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, *49*(5), 499–502. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22185850/

St. Geme, J. W. (2000). The pathogenesis of nontypable Haemophilus influenzae otitis media. *Vaccine*, *19*(SUPPL. 1). https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00277-2

Sundstrom, P., & Aliaga, G. R. (1992). Molecular cloning of cDNA and analysis of protein secondary structure of Candida albicans enolase, an abundant, immunodominant glycolytic enzyme. *Journal of Bacteriology*, *174*(21), 6789–6799.

Tabernero, L., Chang, C. Y. Y., Ohringer, S. L., Lau, W. F., Iwanowicz, E. J., Han, W. C., Wang, T. C., Seiler, S. M., Roberts, D. G. M., & Sack, J. S. (1995). Structure of a retro-binding peptide inhibitor complexed with human α-thrombin. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 246, Issue 1, pp. 14–20). https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0060

Toledo, A., Coleman, L., Kuhlow, C. J., Crowley, J. T., & Benach, J. L. (2012). The Enolase of Borrelia burgdorferi Is a Plasminogen Receptor Released in Outer Membrane Vesicles. *Infection and Immunity*, *80*(1), 359. https://doi.org/10.1128/IAI.05836-11

Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, *31*(2), NA-NA. https://doi.org/10.1002/jcc.21334

US20060029618 Vaccine against dental caries based on virulence-associated immunomodulatory extracellular proteins produced by the cariogenic bacteria Streptococcus sobrinus *and* Streptococcus mutans. (n.d.). Retrieved December 16, 2022, from https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf;jsessionid=3318A16431A96E569DA023D530FD7D48.wapp2nA?docId=US41403048&_cid=P20-KEO8BE-04239-3

Vanegas, G., Quiñones, W., Carrasco-López, C., Concepción, J. L., Albericio, F., & Avilán, L. (2007). Enolase as a plasminogen binding protein in Leishmania mexicana. *Parasitology Research*, *101*(6), 1511–1516. https://doi.org/10.1007/s00436-007-0668-7

Velasquez, M., Drosos, J., Gueto, C., Márquez, J., & Vivas-Reyes, R. (2013). *Método acoplado autodock-pm6 para seleccionar la mejor pose en estudios*

de acoplamiento molecular. https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/49116
Wang, Jia, Yu, Y., Li, Y., Li, S., Wang, L., Wei, Y., Wu, Y., Pillay, B., Olaniran, A. O., Chiliza, T. E., Shao, G., Feng, Z., & Xiong, Q. (2022). A multifunctional enolase mediates cytoadhesion and interaction with host plasminogen and fibronectin in Mycoplasma hyorhinis. *Veterinary Research*, *53*(1), 26. https://doi.org/10.1186/S13567-022-01041-0
Wang, Jun, Wang, K., Chen, D., Geng, Y., Huang, X., He, Y., Ji, L., Liu, T., Wang, E., Yang, Q., & Lai, W. (2015). Cloning and characterization of surface-localized α-enolase of Streptococcus iniae, an effective protective antigen in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(7), 14490–14510. https://doi.org/10.3390/ijms160714490
Wang, X., Chen, W., Tian, Y., Mao, Q., Lv, X., Shang, M., Li, X., Yu, X., & Huang, Y. (2014). Surface display of Clonorchis sinensis enolase on Bacillus subtilis spores potentializes an oral vaccine candidate. *Vaccine*, *32*(12), 1338–1345. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.039
Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W296–W303. https://doi.org/10.1093/NAR/GKY427
Watts, S. C., & Holta, K. E. (2019). HICAP: In silico serotyping of the haemophilus influenzae capsule locus. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(6). https://doi.org/10.1128/JCM.00190-19
Whittaker, R., Economopoulou, A., Dias, J. G., Bancroft, E., Ramliden, M., Celentano, L. P., Steindl, G., Martiny, D., Grammens, T., Georgieva, T., Maikanti-Charalampous, P., Koliou, M., Lebedova, V., Krizova, P., Dalby, T., Valentiner-Branth, P., Epstein, J., Kerbo, N., Toropainen, M., … McDonald, E. (2017). Epidemiology of invasive Haemophilus influenzae disease, Europe, 2007–2014. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(3), 396–404. https://doi.org/10.3201/EID2303.161552
Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, *35*(suppl_2), W407–W410. https://doi.org/10.1093/NAR/GKM290
WO2012065034 ENOLASE PEPTIDE CONJUGATE VACCINES AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS. (n.d.). Retrieved December 16, 2022, from https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2012065034
Wojtas, K., Slepecky, N., Von Kalm, L., & Sullivan, D. (1997). Flight muscle function in Drosophila requires colocalization of glycolytic enzymes. *Molecular Biology of the Cell*, *8*(9), 1665–1675. https://doi.org/10.1091/MBC.8.9.1665
Xue, L. C., Rodrigues, J. P., Kastritis, P. L., Bonvin, A. M., & Vangone, A. (2016). PRODIGY: A web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. *Bioinformatics*, *32*(23), 3676–3678. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW514
Xue, Y., Bodin, C., & Olsson, K. (2012). Crystal structure of the native plasminogen reveals an activation-resistant compact conformation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *10*(7), 1385–1396. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04765.x

Yan, Y., Tao, H., He, J., & Huang, S. Y. (2020). The HDOCK server for integrated protein–protein docking. *Nature Protocols*, *15*(5), 1829–1852. https://doi.org/10.1038/S41596-020-0312-X

Yang, C.-K., Ewis, H. E., Zhang, X., Lu, C.-D., Hu, H.-J., Pan, Y., Abdelal, A. T., & Tai, P. C. (2011). Nonclassical Protein Secretion by Bacillus subtilis in the Stationary Phase Is Not Due to Cell Lysis. *Journal of Bacteriology*, *193*(20), 5607–5615. https://doi.org/10.1128/JB.05897-11

Zakrzewicz, D., Bergmann, S., Didiasova, M., Giaimo, B. D., Borggrefe, T., Mieth, M., Hocke, A. C., Lochnit, G., Schaefer, L., Hammerschmidt, S., Preissner, K. T., & Wygrecka, M. (2016). Host-derived extracellular RNA promotes adhesion of Streptococcus pneumoniae to endothelial and epithelial cells. *Nature Publishing Group*. https://doi.org/10.1038/srep37758

Zarei, A. E., Almehdar, H. A., & Redwan, E. M. (2016). Hib Vaccines: Past, present, and future perspectives. *Journal of Immunology Research*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/7203587

14. ANEXOS

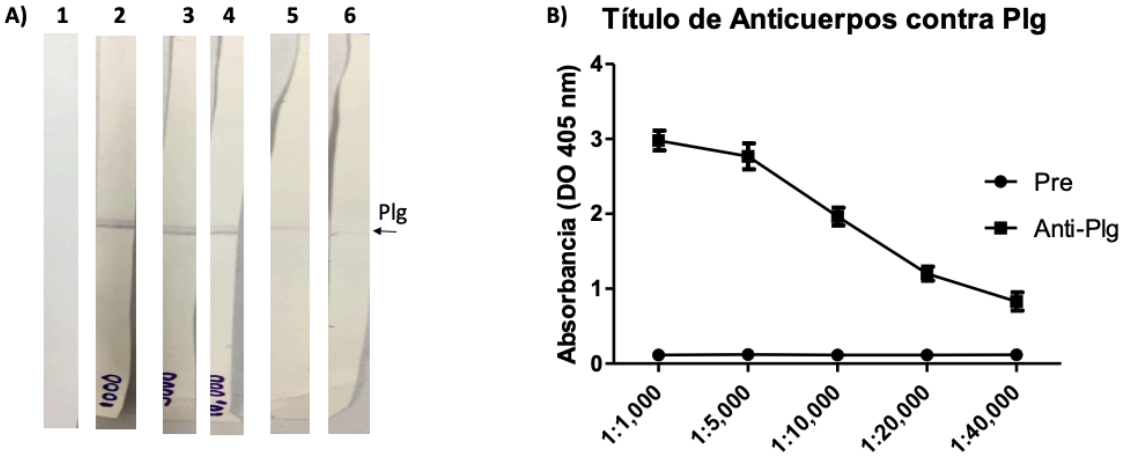
Anexo 1. Soluciones para la purificación de proteínas

Solución	Componentes
Buffer de carga	50 mM de $NiSO_4$
Buffer de unión	20mM Tris-HCl pH =8.0, 5 mM de imidazol, 0.5 M de NaCl
Buffer de lavado	20mM Tris-HCl pH =8.0, 60 mM de imidazol, 0.5 M de NaCl
Buffer eluyente	20mM Tris-HCl pH =8.0, 1 M de imidazol, 0.5 M de NaCl
Buffer strip	20mM Tris-HCl pH =8.0, 100 mM de EDTA, 0.5 M de NaCl

Anexo 2. Componentes SDS-PAGE

Componentes	Gel separador 7.5%	Gel separador 10%	Gel separador 12%	Gel concentrador
Agua	2.86 ml	2.071 ml	1.35 ml	1.04 ml
Acrilamida 30%	1.82 ml	2.5 ml	3.0 ml	0.32 ml
Bis-acrilamida 2%	0.75 ml	1.0 ml	1.22 ml	0.13 ml
Tris-HCl1.5 M pH=8.8 SDS=0.4%	1.82 ml	1.82 ml	1.82 ml	----------
Tris-HCl1.5 M pH=6.8 SDS=0.4%	----------	----------	----------	0.5 ml
Persulfato de amonio 10%	60 µl	60 µl	60 µl	40 µL
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	3 µL

Anexo 3. Identificación de Plasminógeno (Plg) con Ac policlonales anti-Plg Producidos en modelo murino



A) Inmunodetección mediante Western-Blot de Plg con anticuerpos policlonales anti Plg. Carril 1: Suero pre inmune; Carril 2: dilución 1:1,000; Carril 3: dilución 1:5,000; Carril 4: dilución 1:10,000; Carril 5: dilución 1:20,000; Carril 6: 1:40,000. **B) Detección por ELISA del título de anticuerpos en ratones inmunizados con rEnoHi.** Los datos representan el valor promedio de tres experimentos independientes ($p < 0.001$): Pre VS Anti-rEnoHi

Anexo 4. Artículos publicados

Cloning and Characterization of Immunological Properties of *Haemophilus influenzae* Enolase.
Osorio-Aguilar Y, Gonzalez-Vazquez MC, Lozano-Zarain P, Martinez-Laguna Y, Carabarin-Lima A, Del Carmen Rocha-Gracia R.J Immunol Res. 2021 Jun 16;2021:6629824. doi: 10.1155/2021/6629824. eCollection 2021.PMID: 34222496

Hindawi
Journal of Immunology Research
Volume 2021, Article ID 6629824, 14 pages
https://doi.org/10.1155/2021/6629824

Research Article

Cloning and Characterization of Immunological Properties of *Haemophilus influenzae* Enolase

Yesenia Osorio-Aguilar,[1] Maria Cristina Gonzalez-Vazquez,[1] Patricia Lozano-Zarain,[1] Ygnacio Martinez-Laguna,[1] Alejandro Carabarin-Lima,[1,2] and Rosa del Carmen Rocha-Gracia[1]

[1]*Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Instituto de Ciencias, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiologicas, Posgrado en Microbiologia, Puebla, Puebla, Mexico*
[2]*Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Instituto de Ciencias, Licenciatura en Biotecnologia, Mexico*

Correspondence should be addressed to Rosa del Carmen Rocha-Gracia; rochagra@yahoo.com

Received 29 December 2020; Revised 19 May 2021; Accepted 4 June 2021; Published 17 June 2021

Academic Editor: Enrique Ortega

Copyright © 2021 Yesenia Osorio-Aguilar et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Haemophilus influenzae is a common organism of the human upper respiratory tract; this bacterium is responsible of a wide spectrum for respiratory infections and can generate invasive diseases such as meningitis and septicemia. These infections are associated with *H. influenzae* encapsulated serotype b. However, the incidence of invasive disease caused by nontypeable *H. influenzae* (NTHi) has increased in the post-*H. influenzae* serotype b (Hib) vaccine era. Currently, an effective vaccine against NTHi is not available; due to this, it is important to find an antigen capable to confer protection against NTHi infection. In this study, 10 linear B cell epitopes and 13 CTL epitopes and a putative plasminogen-binding motif ($_{252}$FYNKENGMY$_{260}$) and the presence of enolase on the surface of different strains of *H. influenzae* were identified in the enolase sequence of *H. influenzae*. Both *in silico* and experimental results showed that recombinant enolase from *H. influenzae* is immunogenic that could induce a humoral immune response; this was observed mediating the generation of specific polyclonal antibodies anti-rNTHiENO that recognize typeable and nontypeable *H. influenzae* strains. The immunogenic properties and the superficial localization of enolase in *H. influenzae*, important characteristics to be considered as a new candidate for the development of a vaccine, were demonstrated.

Structural Characterization of *Haemophilus influenzae* Enolase and Its Interaction with Human Plasminogen by In Silico and In Vitro Assays.

Osorio-Aguilar Y, Gonzalez-Vazquez MC, Hernandez-Ceron DE, Lozano-Zarain P, Martinez-Laguna Y, Gonzalez-Bonilla CR, Rocha-Gracia RDC, Carabarin-Lima A.Pathogens. 2021 Dec 10;10(12):1614. doi: 10.3390/pathogens10121614.PMID: 34959569

pathogens

MDPI

Article

Structural Characterization of *Haemophilus influenzae* Enolase and Its Interaction with Human Plasminogen by In Silico and In Vitro Assays

Yesenia Osorio-Aguilar [1], Maria Cristina Gonzalez-Vazquez [1], Diana Elizabeth Hernandez-Ceron [2,†], Patricia Lozano-Zarain [1], Ygnacio Martinez-Laguna [1], Cesar Raul Gonzalez-Bonilla [3], Rosa del Carmen Rocha-Gracia [1] and Alejandro Carabarin-Lima [1,4,*]

1 Posgrado en Microbiología, Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, Mexico; yesenia.osorio.aguilar@gmail.com (Y.O.-A.); crispi333@yahoo.com.mx (M.C.G.-V.); plozano_zarain@hotmail.com (P.L.-Z.); ignacio.martinez@correo.buap.mx (Y.M.-L.); rochagra@yahoo.com (R.d.C.R.-G.)

2 Licenciatura en Biomedicina, Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72420, Mexico; ar_dinamics@hotmail.com

3 Director de Investigación Educativa, Instituto de Salud para el Bienestar, Acapulco 39355, Mexico; c.gonzalez.bonilla@gmail.com

4 Licenciatura en Biotecnología, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, Mexico

* Correspondence: alejandro.carabarin@correo.buap.mx; Tel.: +52-(222)-229-5500 (ext. 3965)

† RIP.

check for updates

Citation: Osorio-Aguilar, Y.; Gonzalez-Vazquez, M.C.; Hernandez-Ceron, D.E.; Lozano-Zarain, P.; Martinez-Laguna, Y.; Gonzalez-Bonilla, C.R.; Rocha-Gracia, R.d.C.; Carabarin-Lima, A. Structural Characterization of *Haemophilus influenzae* Enolase and Its Interaction with Human Plasminogen by In Silico and In Vitro Assays. *Pathogens* **2021**, *10*, 1614. https://doi.org/10.3390/pathogens10121614

Academic Editor: Stephen Tristram

Received: 10 November 2021
Accepted: 7 December 2021
Published: 10 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Abstract: *Haemophilus influenzae* is the causal agent of invasive pediatric diseases, such as meningitis, epiglottitis, pneumonia, septic arthritis, pericarditis, cellulitis, and bacteremia (serotype b). Non-typeable *H. influenzae* (NTHi) strains are associated with localized infections, such as otitis media, conjunctivitis, sinusitis, bronchitis, and pneumonia, and can cause invasive diseases, such as as meningitis and sepsis in immunocompromised hosts. Enolase is a multifunctional protein and can act as a receptor for plasminogen, promoting its activation to plasmin, which leads to the degradation of components of the extracellular matrix, favoring host tissue invasion. In this study, using molecular docking, three important residues involved in plasminogen interaction through the plasminogen-binding motif ($_{251}$EFYNKENGMYE$_{262}$) were identified in non-typeable *H. influenzae* enolase (NTHiENO). Interaction with the human plasminogen kringle domains is conformationally stable due to the formation of four hydrogen bonds corresponding to enoTYR$_{253}$-plgGLU$_1$ (K2), enoTYR$_{253}$-plgGLY$_{310}$ (K3), and enoLYS$_{255}$-plgARG$_{471}$/enoGLU$_{251}$-plgLYS$_{468}$ (K5). On the other hand, in vitro assays, such as ELISA and far-western blot, showed that NTHiENO is a plasminogen-binding protein. The inhibition of this interaction using polyclonal anti-NTHiENO antibodies was significant. With these results, we can propose that NTHiENO–plasminogen interaction could be one of the mechanisms used by *H. influenzae* to adhere to and invade host cells.

Keywords: *Haemophilus influenzae*; enolase; plasminogen-binding protein; interaction; virulence factor

Anexo 5. Artículo que se encuentra en revisión para su próxima publicación en la revista: *International Joural of Molecular Sciences.*

International Journal of *Molecular Sciences*

MDPI

Article

The enolase of the *Haemophilus influenzae* mediates binding to collagens: an extracellular matrix component

Yesenia Osorio-Aguilar[1], Maria Cristina Gonzalez-Vazquez[1], Patricia Lozano-Zarain[1], Ygnacio Martinez-Laguna[1], Lidia Baylon-Pacheco[2], Jose Luis Rosales-Encina[2], Alejandro Carabarin-Lima[3] and Rosa del Carmen Rocha-Gracia[1,*]

[1] Posgrado en Microbiología, Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.; e-mail@e-mail.com

[2] Departamento de Infectómica y Patogenesis Molecular, CINVESTAV-IPN, Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, 07360, Ciudad de Mexico, Mexico; e-mail@e-mail.com

[3] Licenciatura en Biotecnología, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.; alejandro.carabarin@correo.buap.mx

* Correspondence: e-mail@e-mail.com; Tel.: (optional; include country code; if there are multiple corresponding authors, add author initials)

Abstract: The enolase protein plays a significant role as a moonlighting protein. In their role as surface-associated enolase, has multiple functions as the interaction with extracellular matrix proteins. Type I and III collagens are the major constituents of this extracellular matrix and collagen is one of the targets of interaction with the enolase of many pathogens, thereby helping the colonization process and promotes the subsequent invasion of the host. In this study, by *in vitro* tests was demonstrated that recombinant enolase of non-typeable *H. influenzae* strong binding to type I collagen, mainly with the α I chains of Cln I. Using molecular docking, the residues that could take part in the interaction of NTHiENO- Cln I and NTHiENO-Cln III were identify. However, in vitro assays shows that NTHiENO has a better affinity to interact with the type I collagen, with respect to type III collagen. The interaction of NTHiENO with collagen could play a significant role in the colonization process, this would allow to *H. influenzae* increase their virulence factors and strengthen its pathogenesis.

Citation: To be added by editorial staff during production.

Keywords: *Haemophilus influenzae*; enolase; collagen-binding protein

Anexo 6. Presentaciones en congresos

- **CVII REUNIÓN ANUAL DE PROFESORES DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA A.C. Y EL XVIII CONGRESO NACIONAL DE ESTUDIANTES DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA (abril 2019).**

Tema: Identificación de la enolasa recombinante de *Haemophilus influenzae* como proteína de unión a colágena y proteínas plasmáticas de humano.

- **XXXVIII CONGRESO INTERAMERICANO DE INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA** y **X CONGRESO ESTATAL DE PEDIATRÍA DE JALISCO (noviembre 2019)**

Tema: Enolasa recombinante de *Haemophilus influenzae* potencial inmunógeno para el desarrollo de una vacuna.

- **3er CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y XXIV SEMANA DEL QUIMICO, UNIVERSIDAD DE SONORA (noviembre 2020)**

Tema 1: Análisis *in silico* y experimental de la interacción de la enolasa de *Haemophilus influenzae* con plasminógeno de humano.

Tema 2: Enolasa recombinante de Haemophilus influenzae: potencial inmunógeno para el desarrollo de una vacuna

- **XLVI CONGRESO NACIONAL DE INFECTOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA (mayo 2022)**

Tema: Enolasa de *Haemophilus influenzae* presenta capacidad para unirse al plasminógeno humano ¿Nuevo factor de virulencia?.

Anexo 7. Reconocimientos obtenidos

1er LUGAR EN LA CATEGORIA MICROBIOLOGÍA POSGRADO INVESTIGACIÓN BÁSICA Y CLÍNICA

Asociación Mexicana de Profesores de Microbiología y Parasitología A.C.

Otorga la presente CONSTANCIA a

Yesenia Osorio Aguilar, Alejandro Carabarin Lima, María Cristina González Vázquez, Ygnacio Martínez Laguna, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia

Por obtener el Primer Lugar en el concurso de carteles en **CVII Reunión Anual de Profesores de Microbiología y Parasitología A.C. y el VXIII Congreso Nacional de Estudiantes de Microbiología y Parasitología**,

Con el Tema: **"Identificación de la enolasa recombinante de Haemophilus influenzae como proteína de unión a colágena y proteínas plasmáticas de humano."**
En la categoria Microbiologia Posgrado Investigación Básica y Clínica
11 de abril.

Acapulco, Guerrero, abril de 2019

Dr. Elias B. Pezzat Said
Presidente AMPMP

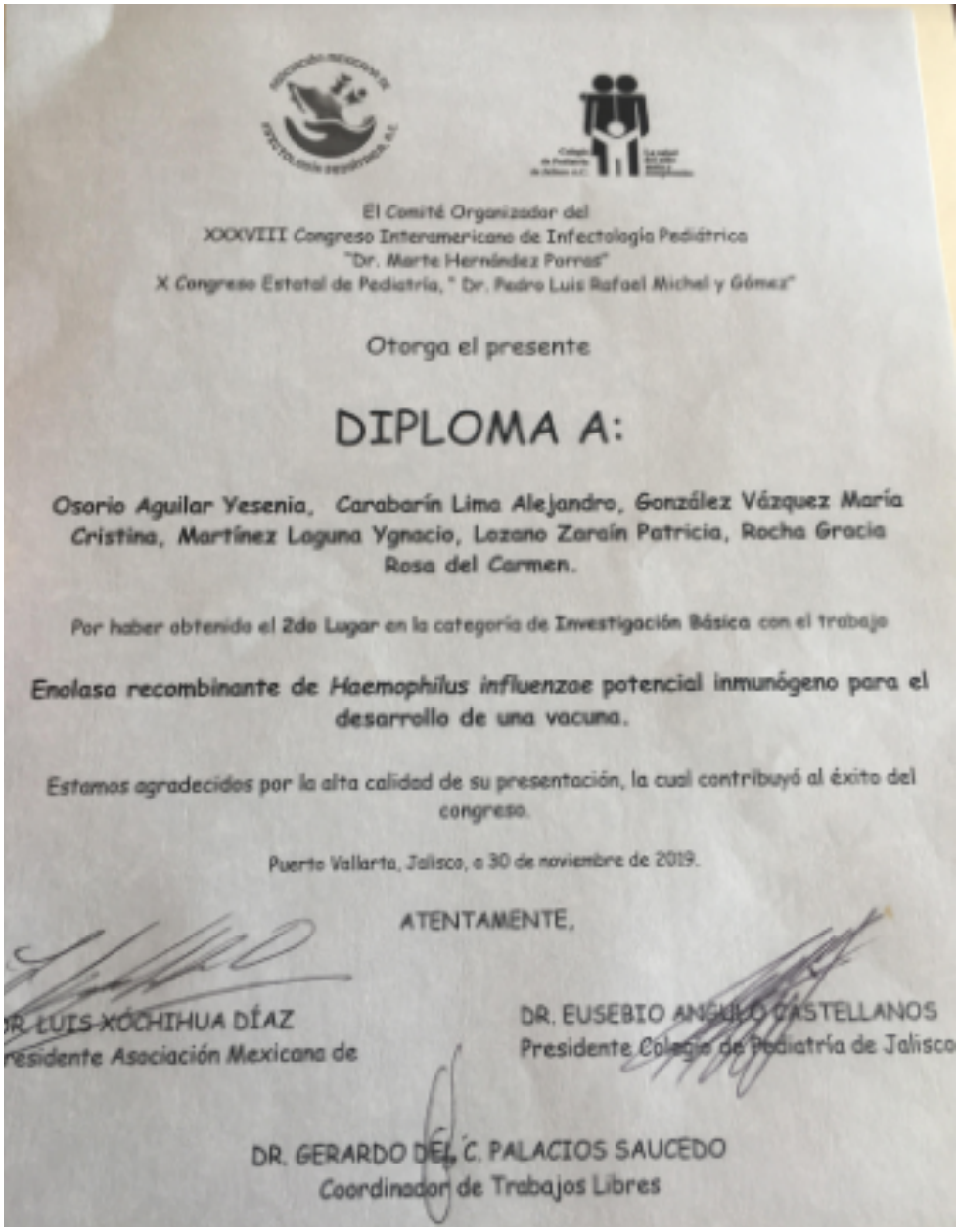
ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA, A.C.

Dr. José Lino Zumaquero Rios
Secretario AMPMP

M.C. José Manuel Rodríguez Luna
Tesorero AMPMP

2do LUGAR EN LA CATEGORÍA INVESTIGACIÓN BÁSICA

Tema: Enolasa recombinante de *Haemophilus influenzae* potencial inmunógeno para el desarrollo de una vacuna.



El Comité Organizador del
XXXVIII Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica
"Dr. Marte Hernández Porras"
X Congreso Estatal de Pediatría, " Dr. Pedro Luis Rafael Michel y Gómez"

Otorga el presente

DIPLOMA A:

Osorio Aguilar Yesenia, Carabarín Lima Alejandro, González Vázquez María Cristina, Martínez Laguna Ygnacio, Lozano Zarain Patricia, Rocha Gracia Rosa del Carmen.

Por haber obtenido el **2do Lugar** en la categoría de **Investigación Básica** con el trabajo

***Enolasa recombinante de Haemophilus influenzae* potencial inmunógeno para el desarrollo de una vacuna.**

Estamos agradecidos por la alta calidad de su presentación, la cual contribuyó al éxito del congreso.

Puerto Vallarta, Jalisco, a 30 de noviembre de 2019.

ATENTAMENTE,

DR. LUIS XOCHIHUA DÍAZ
Presidente Asociación Mexicana de

DR. EUSEBIO ANGULO CASTELLANOS
Presidente Colegio de Pediatría de Jalisco

DR. GERARDO DEL C. PALACIOS SAUCEDO
Coordinador de Trabajos Libres