



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“FACTORES QUE AFECTAN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
DE 110-120 kDa SECRETADAS POR
Haemophilus paragallinarum”.

T E S I S

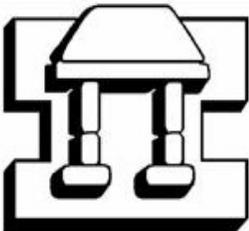
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

GABRIELA GÓMEZ LUGO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX. 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Proyecto financiado por:

PAPIIT/IN219203-3

PAPCA-UNAM



DEDICATORIA

*A mis padres Esteban y Emeteria,
por ser el mejor ejemplo de vida que puedo tener.
Por el cariño y apoyo brindado incondicionalmente en
cada momento. Agradezco a Dios por haberme regalado
unos padres maravillosos, porque con nada pago todo
el esfuerzo y la dedicación con la que nos han
educado. Mil Gracias, los Amo.*

*A mis hermanos Verónica, Mauricio y Esteban, por
ser una parte muy importante en mi vida, los
quiero mucho.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Erasmo Negrete Abascal, primeramente por haberme permitido realizar este trabajo, por toda la paciencia y confianza, pero sobre todo por ser una gran persona, dispuesta a compartir sus conocimientos.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco, por la ayuda y apoyo siempre brindados. Y en especial por todos los buenos consejos.

A mis revisores: Dr. Diego Arenas Aranda, M en C. Gloria Paniagua y M en C. Erick Monroy Pérez, por haber dedicado el tiempo y la atención para la revisión de este trabajo.

A mis amigos de la Carrera:

Paulo por haber compartir conmigo casi toda la carrera, eres una persona grandiosa y excelente amigo, siempre dispuesto a brindarme tu ayuda, Gracias.

Iván, aunque fue poco el tiempo que estuvimos juntos siempre me he tenido tu amistad.

Augusto por todo lo compartido, nunca olvidare todos los momentos divertidos que juntos pasamos.

Marce, porque desde que te conozco siempre me has ayudado incondicionalmente.

A todos mis compañeros de Laboratorio: Lolita, Ricardo, Favy, Angel, Ely, Angie por los buenos momentos compartidos.

Olivier, porque trabaje muy a gusto contigo, y me alentaste en momentos difíciles.

A Erick, por ser ese nido donde curo heridas y construyo sueños, los cuales pueden convertirse en triunfos o fracasos, pero de cualquier modo podré compartirlos contigo.

Ya toda mi familia por ser un gran apoyo para mi.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Coriza Infecciosa	2
2.1.1. Transmisión, morbilidad y mortandad	2
2.1.2. Signos Clínicos	3
2.1.3. Prevención y control.	4
2.2. Descripción del microorganismo	4
2.2.1. Requerimientos de crecimiento y medios de cultivo	5
2.2.2. Morfología colonial	5
2.2.3. Propiedades fisiológicas	6
2.2.4. Susceptibilidad antimicrobiana	7
2.3. Serotipificación	7
2.4. Estructura antigénica	8
2.5. Secreción de Proteínas	10
2.5.1. Toxinas	10
2.5.2. Toxinas RTX (repeats in toxin)	11
2.5.3. Importancia de las toxinas RTX como factores de virulencia	13
2.5.4. Expresión de toxinas RTX	14
3. ANTECEDENTES	15
3.1. Antecedente directo	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. OBJETIVOS	18
6. MATERIAL Y METODOS	19

6.1. Cepas bacterianas	19
6.2. Curva de crecimiento de <i>Hpg</i>	19
6.3. Obtención de Proteínas	19
6.4. Métodos de precipitación	20
6.5. Efecto de iones divalentes y agentes quelantes	20
6.6. Niveles de pH	21
6.7. Efecto de diferentes temperaturas	21
7. RESULTADOS	22
7.1. Curva de Crecimiento	22
7.2. Proteínas de 110-120 kDa secretadas por <i>Hpg</i>	23
7.3. Métodos de Precipitación	25
7.4. Efecto de iones divalentes y agentes quelantes	26
7.3. Efecto de pH	29
7.4. Efecto de temperatura	30
8. DISCUSIÓN	31
9. CONCLUSIONES	37
10. PERSPECTIVAS	38
11. BIBLIOGRAFÍA	39

1. RESUMEN

H. paragallinarum (*Hpg*) es el agente causal de la Coriza Infecciosa (CI), una enfermedad aguda que afecta el tracto respiratorio superior de gallinas y pollos, la cual genera pérdidas significativas a la avicultura. *Hpg* expresa varios factores de virulencia involucrados en su patogenicidad. Entre los más estudiados encontramos la cápsula y la haemaglutinina y recientemente se han descrito proteínas secretadas inmungénicas, que incluyen proteínas de 110 y 120 kDa; siendo la primera un probable miembro de la familia de proteínas RTX. Las proteínas RTX son consideradas como los factores de virulencia más importantes de diversos microorganismos patógenos. La expresión de este tipo de proteínas está controlada estrictamente por diversas señales ambientales. En el presente trabajo se determinaron los factores que afectan la expresión de proteínas de 110-120 kDa secretadas por *Hpg*. De los diferentes medios de cultivo probados, BHI fue en el que se obtuvo el mayor crecimiento bacteriano y la mejor expresión de estas proteínas. Sulfato de amonio ($\text{NH}_4(\text{SO}_4)$) al 50 % de saturación o MeOH al 100% (v/v) fueron los agentes precipitantes que permitieron una mayor recuperación de las proteínas. La adición de CaCl_2 5mM, MgSO_4 1mM, MnSO_4 1mM o citrato de amonio férrico 0.125 mM al medio de cultivo favorecieron la expresión de las proteínas de 110 y 120 kDa. Mientras que CuSO_4 1mM disminuyó su expresión. ZnCl_2 1mM no permitió el crecimiento bacteriano haciendo indetectable la expresión de las proteínas secretadas por *Hpg*. La expresión de las proteínas de 110-120 kDa no fue afectada por diferentes concentraciones de NAD en el medio de cultivo (5,10 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y pH de 7.5 fue el óptimo para su expresión. Finalmente la temperatura óptima de crecimiento y de expresión de las proteínas de 110-120 kDa fue 37 °C.

1. INTRODUCCIÓN

Haemophilus paragallinarum es una bacteria Gram-negativa que pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, la cual agrupa microorganismos patógenos para diferentes especies animales, incluido el hombre. Algunos de estos microorganismos están distribuidos mundialmente generando enfermedades que ocasionan grandes pérdidas económicas (Jacques-Mikael, 2002).

En los primeros trabajos reportados, este patógeno fue identificado como *H. gallinarum*, un organismo que requería de los factores X (hemina) y V (Nicotinamida Adenin Dinucleotido: NAD) para su crecimiento *in vitro* (Eliot, y Lewis, 1934). Sin embargo, de los 1960s a los 1980s, todos los aislamientos del agente causal de CI requirieron solamente NAD por lo que fue renombrado como *H. paragallinarum* (Blackall y Yamamoto, 1989). Actualmente se han aislado cepas independientes de este factor en Sudáfrica (Mouahid *et al.*, 1992 y Bragg *et al.*, 2002) y en México (García *et al.*, 2002). Así, este microorganismo puede ser tanto dependiente como independiente del factor V. Se ha demostrado que la independencia a este factor de crecimiento es gracias a la información contenida en un plásmido, ya que al extraer plásmido crudo de cepas de *Hpg* NAD-independientes aisladas de Sudáfrica y utilizarlo para transformar cepas de referencia NAD-dependientes, estas bacterias fueron capaces de crecer en ausencia de NAD (Bragg *et al.*, 1993). Sin embargo, este plásmido aún no ha sido caracterizado.

2.1. Coriza Infecciosa

H. paragallinarum (*Hpg*) es el agente causal de la Coriza Infecciosa (CI), una enfermedad aguda que ocurre mundialmente afectando el tracto respiratorio superior de gallinas y pollos (*Gallus gallus*), provocando grandes pérdidas a la avicultura y particularmente en granjas de edad múltiple (Kume *et al.*, 1984 y Blackall, *et al.*, 1997), ya que produce retardo en el crecimiento de aves jóvenes, pérdida de peso en individuos adultos y una baja en la producción de huevo de hasta un 40%, aumentando significativamente el número de aves de desecho (Blackall, 1999).

2.1.1. Transmisión, morbilidad y mortandad

Esta bacteria infecta al ave por vía respiratoria y luego de un corto período de incubación, que varía entre 1 a 3 días, produce una enfermedad que se manifiesta por inflamación catarral de los senos paranasales. Dado que esta bacteria sobrevive únicamente durante unas 5 h fuera del ave, el contagio sólo se produce a través de los animales infectados, que ya han padecido la enfermedad y que permanecen como portadores en la granja durante tiempo prolongado. En la forma no complicada las lesiones generalmente quedan confinadas al tracto respiratorio superior persistiendo los síntomas clínicos por 3 a 7 días y luego se produce su remisión. Los cambios patológicos que se desencadenan a partir de las 20 horas post-infección (PI) alcanzan su máxima severidad a los 7-10 días PI y finalizan a los 14-21 días PI (Blackall *et al.*, 1997).

La CI se caracteriza por una baja mortalidad y una alta morbilidad. En gallinas ponedoras causa alta morbilidad, baja o nula mortalidad y una importante pérdida en la producción de huevos, la que generalmente oscila entre un 10% y un 40%. La mortalidad puede aumentar por la presencia de otros microorganismos o virus (Blackall, 1999).

2.1.2. Signos clínicos

H. paragallinarum infecta por vía respiratoria quedando adherida a las células epiteliales traqueales de las aves y luego de un corto período de incubación, que varía entre 1 a 3 días, produce una enfermedad que se manifiesta por descarga nasal, estornudo, inflamación facial, lagrimación (Fig. 1), anorexia y diarrea, por lo que disminuye el consumo de agua y alimento (Blackall, 1997). Es probable que la distribución tisular de *Hpg* en el proceso de infección y colonización del tracto respiratorio de los pollos sea limitada, gracias a una β -defensina epitelial llamada gallinacina-3, la cual contribuye a la inmunidad innata mediante propiedades antimicrobianas propias de las células epiteliales y secreciones traqueales (Zhao *et al.*, 2001).

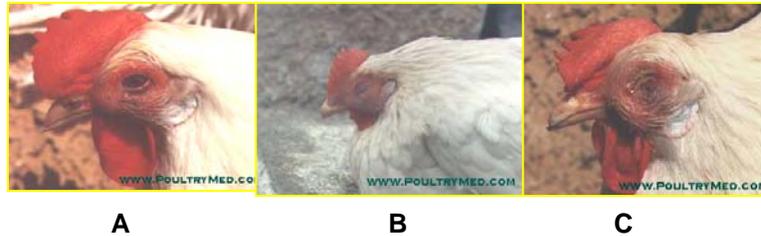


Fig. 1. Pollos infectados experimentalmente con *Hpg*.
A: catarro agudo con inflamación de pasaje nasal y sinusitis.
B: descarga nasal y conjuntivitis. C: edema facial severo.

Esta enfermedad se caracteriza por ser de corta duración (dos semanas) y de curación espontánea (Terzolo, 2000); sin embargo, puede complicarse por la presencia de otros patógenos como *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *Pasteurella spp.*, *Salmonella spp.*, y por el virus de la bronquitis, complicando su erradicación (Sandoval *et al.*, 1994). El diagnóstico microbiológico de la CI puede dificultarse por la presencia de otros microorganismos como *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Pasteurella avium* y *P. volantium* (Blackall, 1999, Blackall, *et al.*, 1997, Sandoval y Terzolo, 1996, Terzolo, *et al.*, 1993).

2.1.3. Prevención y control.

La estrategia más eficaz en la prevención de la CI es la vacunación de parvadas susceptibles. Se ha reconocido ampliamente que los tres serogrupos de Kume representan tres inmunovarietades y que no existe protección cruzada entre las serovarietades de estos serogrupos (Blackall, 1999). Sin embargo, se ha observado cierta protección cruzada entre las serovarietades de los tres serogrupos. Actualmente se emplean bacterinas comerciales bivalentes (serovarietades A-1 y C-1) y trivalentes (A-1, B-1 y C-2) contra la CI. Además existe la necesidad de utilizar bacterinas trivalentes en todos los lugares donde se han aislado cepas regionales de la serovarietad B (Soriano 2004).

Para el control de la CI también se han empleado varios quimioterapéuticos como: estreptomina (Bornstein y Samberg, 1954), espectinomina, así como combinaciones de: estreptomina-espectinomina (Hanley, Davis y Sunks, 1968),

sulfacloropiridazina-trimetoprim (Sumabo y Ocampo, 1987), y sulfadimetoxina-trimetoprim (Sakai y Nagao, 1987).

2.2. Descripción del microorganismo

H. paragallinarum es una bacteria Gram negativa no esporulada, pleomórfica que presenta morfología cocobacilar con tendencia a formar cadenas cortas y algunos filamentos. El microorganismo mide 1-3 µm de longitud y 0.4-0.8µm de ancho. Es anaerobia facultativa y sufre degeneración en 48-60 h, presentado formas indefinidas y fragmentadas. Esta bacteria es descrita como inmóvil; sin embargo, recientemente se demostró que *Hpg* bajo ciertas condiciones de cultivo presenta motilidad (Serrano-Vázquez, 2004).

2.2.1. Requerimientos de crecimiento y medios de cultivo

Algunos aislamientos requiere la presencia de NAD para su crecimiento, ya sea en forma reducida (NADH) en concentraciones de 1.56-25 µg/ml (Rimler, *et al.*, 1977) o en forma oxidada (20-100 µg/ml) (Sato S., y Shifrine M., 1965), otras cepas son NAD-independientes (Mouahid *et al.*, 1992 y Bragg *et al.*, 2002, García *et al.*, 2002). Durante el crecimiento en placa el NAD puede ser aportado por una cepa nodriza (*Staphilococcus* spp.) cultivada en forma transversal al cultivo de *Hpg* (Fig. 2). El cloruro de sodio (NaCl) en concentraciones de 1-1.5%, es necesario para el crecimiento de esta bacteria (Glisson, 1998); el suero de pollo (1%) favorece su crecimiento (Hinz, 1973).

Este patógeno puede crecer bajo condiciones de microaerobiosis o anaerobiosis, con 5-10% de CO₂ (Rimler, *et al.*, 1976), el pH óptimo para su crecimiento varía entre 6.9 a 7.6. Algunos de los cultivos que se han empleado para su crecimiento son Infusión Cerebro-Corazón (BHI), Caldo Soya Tripticaseína (TSB), Infusión de Carne de Pollo (CMI), medio de mantenimiento (HMM) (Blackall y Yamamoto 1998), agar de Casman (Rimler *et al.*, 1976), agar medio de prueba (TMA) (Rimler *et al.*, 1979) y agar Columbia (Terzolo *et al.*, 1993). La mínima y máxima temperatura para su crecimiento son 25° y 45°C respectivamente; sin

embargo, los organismos son crecidos normalmente a 37-38°C (Blackall *et al.*, 1997).

2.2.2. Morfología colonial

Los aislamientos de *Hpg* NAD-dependientes forman colonias pequeñas en forma de gotas de rocío de 0.3 mm de diámetro, contiguas a la cepa nodriza, y más pequeñas conforme se encuentran más alejadas de ella (Fig. 2). Las colonias se presentan de forma circular, convexa, de superficie lisa, y no produce hemólisis en agar sangre (Fig. 3). Las colonias de cepas NAD-independientes miden entre 1-2 mm. En cultivos jóvenes de 8 a 24 h. de incubación, la cápsula puede ser demostrada en cepas virulentas y las cepas cultivadas en medios transparentes presentan iridiscencia (Blackall *et al.*, 1997).



Fig. 2. Fenómeno de satelitismo de *Hpg* con cepa nodriza de *Staphylococcus* (estriado).



Fig. 3. Morfología colonial de *Hpg* en agar sangre.

2.2.3. Propiedades fisiológicas

Esta bacteria presenta un metabolismo quimiorganotrófico mesofílico y contiene dimetilmenaquinona y ubiquinona como componentes de la cadena respiratoria (Hollander R., y Mannheim W., 1975). Puede diferenciarse bioquímicamente de otros microorganismos por su incapacidad de producir formazán a partir de clorhidrato de 3,3,5-trifenil-tetrazolio (TTC) (Terzolo, *et al.*, 1993). Produce ácido a partir de manosa y glucosa (Blackall, 1983), fermenta esta última sin la producción de gas, reduce nitratos a nitritos, es indol y oxidasa negativa, presenta fosfatasa alcalina, y no hidroliza gelatina ni urea (Blackall y Yamamoto, 1998). La principal característica que diferencia los aislamientos de *Hpg* NAD-independientes de los NAD-dependientes es que no presentan actividad β -galactosidasa y no fermentan maltosa. Otros carbohidratos utilizados por *Hpg* en comparación con otros microorganismos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características para diferenciar *H. paragallinarum* de otras bacterias.

Microorganismo	<i>H. paragallinarum</i>	<i>O. rhinotracheale</i>	<i>P. avium</i>	<i>P. volantium</i>
Característica				
Catalasa	-	- ^a	+	+
Pigmento	-	-	+	+
Microaerofilia	+	+	-	-
β -galactosidasa	+ ^b	+	-	+
Arabinosa	-	-	-	-
Galactosa	-	+	+	+
Maltosa	+ ^b	+	-	+
Manitol	+	-	-	+
Sorbitol	V	-	-	V
Sacarosa	V	-	+	+
Trehalosa	-	-	+	+

^a: el 90% de las cepas de *O. rhinotracheale* son catalasa negativa

^b: *H. paragallinarum* NAD-independientes son negativos a la prueba de β -galactosidasa y fermentan la maltosa.

V: variable

2.2.4. Susceptibilidad antimicrobiana

En aislamientos procedentes de todo el mundo se ha detectado sensibilidad a ampicilina, eritromicina y penicilina, y se ha reportado susceptibilidad variable a la neomicina, estreptomina y tetraciclina, permitiendo reconocer cinco biovariedades en base a los patrones de susceptibilidad a estos antibióticos (Blackall *et al.*, 1989). En un estudio realizado en México usando 40 aislamientos, se identificaron las cinco biovariantes antes mencionadas (Fernández, *et al.*, 2000).

2.3. Serotipificación

La primera clasificación serológica de *Hpg* fue realizada en los Estados Unidos por Page (1962), quien utilizó una prueba de aglutinación en placa reconociendo tres serogrupos (A, B y C). Posteriormente Kume *et al.*, (1983) realizaron la caracterización serológica de 17 aislamientos procedentes de varias partes del mundo, mediante pruebas de inhibición de hemoaglutinación (HI), identificando tres serogrupos (I, II y III) distribuidos en siete serovariedades hemoaglutinantes (I: HA-1 a HA-3; II: HA-4 a HA-6; y III: HA-7). Posteriormente Eaves *et al.*, (1989), identificaron la hemoaglutinina HA-8 y Blackall *et al.*, (1990) la hemoaglutinina HA-9; ambas hemaglutininas se indentificaron en aislamientos hechos en Australia. Subsecuentemente Blackall *et al.*, (1990) basándose en la estrecha relación existente entre las serovariedades de Page y los serogrupos de Kume, modificaron la nomenclatura, ya que los serogrupos I, II y III de Kume corresponden a los serogrupos A, C y B de Page; quedando de la siguiente manera: serogrupo I: A-1 a A-4; serogrupo III: B-1; y serogrupo II: C-1 a C-4.

De acuerdo con esta clasificación en nuestro país se han reportado las serovariedades A-1, A-2, B-1 y C-2 en Jalisco; A-1 y A-2 en el Estado de México; B-1 y C-2 en Puebla; A-2 en Michoacán; A-1 y C-2 en Morelos y B-1 en Sonora. De las diferentes serovariedades reportadas en México, C-2 ha sido la más frecuentemente aislada, principalmente en Morelos. Cabe mencionar que existieron seis aislamientos que no fueron tipificados, lo que puede significar la existencia de nuevos serovares (Soriano *et al.*, 2001). En México se están utilizando vacunas bi- y trivalentes contra la CI, las cuales incluyen dos o tres de

los serovares de Page. Sin embargo, *Hpg* se ha aislado de aves que habían sido vacunadas contra la CI (Fernández *et al.*, 2000). Este fracaso puede ser debido a la presencia de serovares inusuales que no son incluidos en las vacunas contra la enfermedad (Soriano *et al.*, 2001).

2.4. Estructura antigénica

La hemoaglutinina es considerada la principal estructura antigénica para *H. paragallinarum*, y la capacidad hemoaglutinante en aislamientos de *Hpg* fue descrita por vez primera por Kato *et al.*, (1965). La hemoaglutinina es una proteína que al ser inoculada en pollos les provoca una respuesta inmunogénica con producción de anticuerpos que inhiben la hemoaglutinación (Sawata *et al.*, 1980).

Se considera que la adherencia bacteriana a las células epiteliales es el primer paso en el proceso de infección de las superficies mucosas. Las adhesinas son las estructuras bacterianas que median la adherencia a estructuras celulares complementarias llamadas receptores (Jacques y Paradis, 1998). Fernández *et al.*, (2000), evidenciaron que los antígenos hemoaglutinantes de *Hpg* actúan como adhesinas y que existen ligandos o receptores específicos en la superficie de las células epiteliales del tracto respiratorio superior de las aves, siendo su receptor celular principalmente de tipo D-manosa. Por lo que se dice que estas células poseen receptores específicos para *Hpg* y que los anticuerpos homólogos son capaces de inhibir la adherencia actuando como neutralizantes de las adhesinas (Fernández *et al.*, 2001).

También se ha descrito un antígeno termoestable de tipo común y un antígeno termolábil de tipo específico en cepas de serogrupo A y B (Hinz, 1973). Estudios sobre las propiedades morfológicas y serológicas de *Hpg* han revelado estructuras antigénicas complejas, las cuales fueron clasificadas por la prueba de aglutinación como antígenos termolábiles L1, L2 y L3 (destruyéndose a 65 ° C por 30 min) y sensibles a tripsina. Además, se han encontrado un antígeno termolábil (HL) y uno termoestable (HS) resistentes a tripsina (Sawata *et al.*, 1979).

Otro antígeno con el que cuenta esta bacteria es la cápsula, la cual ha sido asociada con la colonización bacteriana ya que la protege contra los mecanismos

de defensa del huésped (Sawata *et al.*, 1984). Se sugiere que la cápsula también puede estar involucrada con la adhesión a los cilios del tracto respiratorio de las aves, siendo el primer paso para la infección mediada por *Hpg* (Sawata *et al.*, 1985).

Recientemente se ha determinado la presencia de hemocina en *Hpg*, una bacteriocina que puede estar jugando un rol importante en la colonización de los senos respiratorios de los pollos, ya que aislamientos de *Pasteurella avium*, *P. volantium* y *P. especie A*, consideradas bacterias gram-negativas no patógenas y que se encuentran en el tracto respiratorio superior de pollos, fueron sensibles a esta hemocina, por lo cual *Hpg* puede inhibir el crecimiento de estas bacterias (Terry *et al.*, 2003). El mecanismo de acción de esta hemocina es desconocido. En otros microorganismos como *H. influenzae* esta hemocina causa elongación de células sensibles e inhibición de la síntesis de DNA pero no de RNA ni de proteínas (Streker *et al.*, 1981).

2.5. Secreción de proteínas

La interacción de patógenos con sus células hospederas es mediada por factores que se encuentran localizados sobre la superficie bacteriana o son secretados al espacio extracelular. Las bacterias secretan un gran número de proteínas entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

Las proteínas antigénicas secretadas por *Hpg* no han sido extensamente estudiadas. Recientemente se han identificado proteasas secretadas por *Hpg*, las cuales son enzimas degradativas que se encargan de catalizar la hidrólisis total o parcial de proteínas. Estas proteasas presentan reactividad cruzada con un suero policlonal dirigido contra metaloproteasas purificadas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 (Rivero-García, 2004). Otro tipo de proteínas secretadas que se han detectado en *Hpg* se encuentran en el rango de 110-120 kDa, las cuales fueron reconocidas por suero de cerdos convalecientes de pleuroneumonía y por un suero policlonal de conejos específico para la toxina ApxI

de *A. pleuropneumoniae* y la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*, sugiriendo la posible presencia de toxinas RTX en *Hpg*. La presencia de genes potenciales para toxinas RTX en *Haemophilus spp* fue descrita por Kuhnert *et al.*, (1997) y en base al peso molecular, la inmunoreacción cruzada y la forma en que fueron obtenidas las proteínas, es posible que se trate de toxinas RTX. Estas podrían ser citotoxinas ya que *Hpg* no es hemolítico (Mena-Rojas, *et al.*, 2004).

2.5.1. Toxinas

Las toxinas bacterianas participan en un gran número de mecanismos que alteran los procesos metabólicos críticos dentro de la célula huésped. En general, las toxinas dañan las membranas de la célula o modifican proteínas que son importantes para mantener la fisiología de la célula. Algunas toxinas bacterianas ejercen sus efectos sobre las células eucariontes únicamente después de introducirse en la célula. Otras ejercen sus efectos localizándose en la superficie de la célula eucarionte, tal como las toxinas formadoras de poros (Payne, 2003).

2.5.2. Toxinas RTX (repeats in toxin)

Este tipo de proteínas constituye una familia de toxinas con alto peso molecular (100-120 kDa) que se encuentran presentes en una gran variedad de bacterias Gram-negativas (Coote, 1992). Estas toxinas RTX son capaces de formar canales permeables a iones en membrana de fagocitos y otras células blanco, produciéndoles un desequilibrio osmótico y muerte celular, lo que permite al patógeno evadir la primera línea de defensa del huésped (Lalonde, *et al.*, 1989).

Existen dos modelos para explicar el mecanismo por el cual las RTX inducen la muerte celular, el primero propone que la toxina en altas concentraciones se inserta en la membrana celular y causa lisis celular, y en baja concentración provoca apoptosis (Korostoff, *et al.*, 1998; Menestrita, *et al.*, 1995; Soloaga, *et al.*, 1999). El segundo modelo postula que la toxina no pasa completamente a través de la membrana celular, sino que permanece en la parte externa; y por desplazamiento de moléculas lipídicas en la membrana externa causa muerte celular por presión lateral; subsecuentemente provoca colapso de la monocapa (Soloaga, *et al.*, 1999). Las RTX también pueden producir excesivamente

radicales de oxígeno, dañando a las células del huésped (Jacques y Mikael, 2002).

Otra característica común de esta familia de toxinas es una secuencia de repetidos ricos en glicina cerca del extremo amino terminal; estos repetidos son responsables de la unión divalente del ión calcio, el cual es requerido para la activación de algunas toxinas (Coote, 1992). Todas estas toxinas son secretadas de la célula bacteriana por la vía de secreción tipo I (Boehm, *et al.*, 1990; Welch, 1991; Kachlany *et al.*, 2000) y se ha demostrado que algunas de ellas requieren Ca^{2+} para la formación de poros en la membrana celular, pero también se ha propuesto que la síntesis de ApxI de *A. pleuropneumoniae* es regulada por los niveles libres de Ca^{2+} y se sugiere que este efecto puede ser a nivel transcripcional (Frey y Nicolet, 1988; Frey *et al.*, 1990).

Las toxinas RTX pueden presentar actividades citolíticas, citotóxicas, de proteasas y de lipasas. Además, presentan una organización genética común, la cual consiste en un operón de cuatro genes designados C, A, B y D en orden transcripcional; el gen A codifica para una protoxina inactiva que es activada por el producto codificado por el gene C (Jacques y Mikael, 2002); el producto de este último gen acetila un ácido graso de la protoxina (Stanley *et al.*, 1994; Issartel, *et al.*, 1991). Los genes B y D codifican para productos involucrados en la secreción de la proteína (Jacques y Mikael, 2002) (Fig. 4).

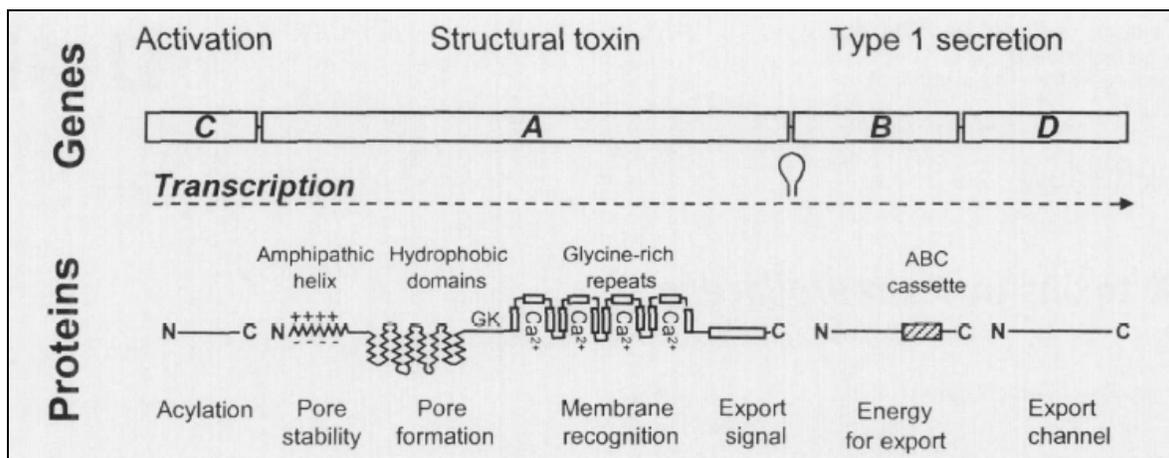


Fig. 4. Organización genética y estructural de las toxinas RTX
(Frey y Kuhnert, 2002).

Estas toxinas se dividen en dos categorías, basándose en la especificidad que presentan por los tipos de células blanco. Las hemolisinas RTX, tal como la α -hemolisina (HlyA) de *E. coli* (Cavaliere, Bohach, Snyder, 1984) y la toxina ApxIA de *A. pleuropneumoniae* (Frey *et al.*, 1991), las cuales lisan a una gran variedad de células blanco en diversos grupos animales; incluyendo eritrocitos, fibroblastos de embrión de pollo, y granulocitos de conejo y ratón (Welch, *et al.*, 1995). La otra categoría de proteínas RTX incluye toxinas con una alta especificidad de células blanco como las leucotoxinas de *A. actinomycetemcomitans* (LtxA) y de *M. (Pasteurella) haemolytica* (LktA) (Kachlandy *et al.*, 2000), ésta última lisa únicamente leucocitos de rumiantes (Kaehler, *et al.*, 1980).

Unas de las toxinas mejor estudiadas son las producidas por *A. pleuropneumoniae* (Apx I a Apx IV), y existen evidencias considerables sobre su contribución a la virulencia de este patógeno (Frey, 1995). Se ha observado que la actividad transcripcional del operón de la toxina ApxI puede ser aumentada hasta diez veces por la adición de calcio al medio de cultivo a concentraciones similares a las encontradas en el suero (Frey *et al.*, 1994; Gygi *et al.*, 1992). Por otro lado el hierro ha sido reportado como represor de la producción de la toxina ApxII a concentraciones de 100 y 500 μ M (Maudsley y Kadis, 1986).

2.5.3. Importancia de las toxinas RTX como factores de virulencia.

In vivo, las toxinas RTX inducen la liberación de mediadores inflamatorios o ejercen efectos citotóxicos y citolíticos principalmente sobre células del sistema inmune; también provocan necrosis, apoptosis, e inflamación. En algunos trabajos se ha propuesto que las toxinas RTX actúan en sinergia con lipopolisacáridos (Czuprynski y Welch, 1995).

Por su parte *A. pleuropneumoniae*, agente causal de la pleuropneumonia en cerdos, secreta toxinas RTX que son responsables de hemolizar eritrocitos y lisan macrófagos alveolares y leucocitos polimorfonucleares (Crujisen *et al.*, 1992 y Kamp *et al.*, 1987). La toxina ApxI es fuertemente hemolítica y citotóxica; ApxII es débilmente hemolítica y moderadamente citotóxica; mientras que ApxIII no es

hemolítica pero es fuertemente citotóxica (Frey *et al.*, 1993 y Kamp *et al.*, 1991). Estas toxinas son consideradas factores de virulencia muy importantes en el proceso infeccioso causado por *A. pleuropneumoniae* ya que mutantes de los serotipos 1 y 5 que han perdido la capacidad de sintetizar ApxI y ApxII, no producen la muerte de macrófagos o neutrófilos (Gygi *et al.*, 1990) ni causan enfermedad o lesiones pulmonares en cerdos (Gygi *et al.*, 1990 y Tascón *et al.*, 1994).

Otra bacteria Gram negativa que produce este tipo de toxinas es *A. actinomycetemcomitans*, patógeno que está implicada en numerosas enfermedades humanas incluyendo endocarditis, meningitis, osteomielitis y periodontitis (Slots *et al.*, 1980; Zimbon, 1985). Se ha demostrado que la leucotoxina (Ltx) secretada por esta bacteria puede producir poros en la bicapa lipídica, de tal modo que provoca muerte selectiva de monocitos y polimorfonucleados (PMN) (Taichmant *et al.*, 1980 y Tsai *et al.*, 1979). Además se ha mostrado que la Ltx purificada puede inducir necrosis y apoptosis en linfocitos T humanos en cultivo, ya que se observa fragmentación de DNA en estas células (un signo clásico de apoptosis). La fragmentación de DNA se observa después de 16 h de incubación y la máxima fragmentación ocurre con una concentración de 100 ng de Lkt /ml (Mangan *et al.*, 1991). Además de ser una proteína formadora de poros, se ha observado que une Ca^{2+} , por lo que puede inducir cambios citosólicos en las concentraciones de este catión, y consecuentemente alterar el potencial de membrana, haciendo susceptible a la célula (Iwase *et al.*, 1990).

Por otro lado, Maheswaran *et al.*, (1992) observaron que el sobrenadante de cultivos que contenían leucotoxina LktA, producen lisis de neutrófilos, mediada por la generación de radicales libres de oxígeno. Este efecto depende de la dosis, ya que bajas concentraciones provocan la lisis de neutrófilos por rompimiento oxidativo, liberando gránulos contenidos en estas células y cuando se incrementa la concentración de radicales, las células son estimuladas a experimentar apoptosis. En altas concentración la leucotoxina daña membranas celulares debido a la formación de poros con la subsiguiente necrosis de las células blancas (Narayanan *et al.*, 2001).

2.5.4. Expresión de toxinas RTX

Es claro que la expresión de proteínas puede estar regulada por las condiciones de un medio definido. Las toxinas RTX presentan una secuencia de repetidos ricos en glicina cerca del amino terminal, la cual es importante para hacer eficiente la unión de iones Ca^{2+} (Boehm *et al.*, 1990), y juegan un papel crucial en los niveles de Ca^{2+} que son requeridos para la máxima actividad hemolítica de algunas proteínas (Ludwing *et al.*, 1988). La pérdida de tales repeticiones en el caso de la α -hemolisina de *E. coli* conduce a reducción de capacidad para unir Ca^{2+} y una menor actividad (Boehm *et al.*, 1990). Esta actividad puede ser parcialmente restaurada por la adición de altas concentraciones de calcio (30 mM) (Ludwing *et al.*, 1988). El Ca^{2+} está involucrado también en la actividad biológica de una hemolisina de 104 kDa de *A. preuropneumoniae* serotipo 1 (Devenish y Rosendal, 1990). Y se ha reportado que esta actividad se incrementa al ser suplementado el medio de cultivo con CaCl_2 10 mM (Tarigan *et al.*, 1996, Umelalim *et al.*, 1992).

3. ANTECEDENTES

Las bacterias patógenas sintetizan toxinas y otros factores de virulencia cuando se encuentran en sus huéspedes; sin embargo, muchos de los genes que codifican para estas proteínas pueden ser reprimidos o expresados a su nivel más bajo cuando las bacterias se crecen en condiciones de laboratorio. Existen numerosas diferencias entre las condiciones en el ambiente del hospedero y las condiciones fuera de éste las cuales podrían influir en la expresión de genes de virulencia. Estas variables incluyen a la temperatura, osmolaridad, disponibilidad de nutrientes, concentración de iones, etc. (Payne, 2003).

En algunos estudios se ha confirmado que existe una relación entre la fase de crecimiento bacteriano y la secreción de algunas proteínas (Maudsley y Kadis, 1986). Bragg *et al.*, (1996) estudiaron el efecto de diferentes condiciones de crecimiento tales como el tiempo de incubación, la cantidad de inóculo utilizado para el crecimiento, niveles de NAD o NaCl y el pH del medio Casman, sobre la expresión de antígenos de *Hpg* los cuales fueron reconocidos por un panel de anticuerpos monoclonales. Observaron que los cambios en los patrones de antígenos producidos por diferentes cepas de *Hpg*, parecen estar causados por las diferentes condiciones de crecimiento seleccionadas.

En *M. haemolytica* A1 se ha determinado que la producción de la leucotoxina Lkt es influida por la densidad celular del medio inoculado, corroborando que la producción de Lktx inicia durante la etapa final de la fase lag, y siendo su máxima producción en la fase logarítmica, con un decline importante durante la fase estacionaria; definiendo ventajas prácticas para cuando se requiera obtener la toxina con el fin de usarla como vacuna (Odendaal y Plessies, 2000). Jarma y Regassa (2004) han observado que la expresión y actividad hemolítica de toxinas ApxI y ApxII se incrementa entre la fase exponencial y la primera etapa de la fase estacionaria, después de este tiempo de incubación las toxinas disminuyen en expresión y actividad.

En otros microorganismos, como *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae* se ha observado que la adición de ZnSO₄ o CuSO₄ causa la completa inhibición de la

actividad de una hemolisina, la cual es considerada un importante factor de virulencia en la patogénesis de la disentería en cerdos (Dupont *et al.*, 1993).

Tarigan *et al.*, (1996), caracterizaron una toxina RTX hemolítica producida por *A. pleuropneumoniae* aislado en Australia. La actividad hemolítica fue indetectable en el sobrenadante de cultivo cuando el medio no era suplementado con Ca^{2+} (10 mM) o cuando el Ca^{2+} en el medio era quelado con EGTA (2.2 mM).

Por otro lado, también se ha relacionado el pH del medio con la secreción y actividad de toxinas. Kachlany *et al.*, (2000) al estudiar una leucotoxina RTX secretada por *A. actinomycetemcomitans*, observaron que la cantidad de toxina secretada era afectada por el pH del medio. Amoako *et al.*, (1994) observaron que la actividad de una hemolisina producida por *Fusobacterium necrophorum* fue máxima a pH 7.4, disminuyendo conforme el pH se alejaba de este valor. Sun y Clinkenbeard (1998) optimizaron un medio de cultivo libre de suero para la producción de una leucotoxina (Lkt) de *P. haemolytica*, observando que el medio suplementado con 0.36 mM FeCl_3 o 1.0 mM de MgSO_4 incrementaba la actividad específica de la Lkt.

3.1 Antecedente directo

Mena-Rojas *et al.*, (2004) describieron la presencia de proteínas antigénicas en el rango de 25 a 120 kDa secretadas por *Hpg* durante su crecimiento en BHI, TSB o Luria-Bertani glucosa fosfato sin la adición de suero. Algunas de esas proteínas fueron reconocidas por suero de pollos infectados experimentalmente con *Hpg*. En particular, una proteína de 110 kDa fue reconocida por un pool de sueros de cerdos convalecientes naturalmente infectados con *A. pleuropneumoniae*, y también por un suero policlonal dirigido contra la ApxI, así como también contra la leucotoxina de *M. haemolytica*, sugiriendo la presencia de una proteína parecida a las RTX en *Hpg*, pudiendo ser un importante inmunógeno en el control de la CI.

4. JUSTIFICACIÓN

En trabajos antes mencionados se ha observado que la producción de ciertas proteínas es afectada por la composición del medio de cultivo y dado que las proteínas secretadas por *Hpg* no han sido ampliamente estudiadas, y en particular posibles toxinas RTX, el propósito de este trabajo fue conocer los factores que afectan la expresión de proteínas de 110-120 kDa secretadas por *Hpg*. Conocer las condiciones que afectan la expresión de factores de virulencia nos da información sobre el comportamiento de este patógeno al infectar a su huésped, además nos permite determinar las condiciones óptimas de su obtención, para obtener cantidades importantes de proteína que nos permitan caracterizarla más ampliamente y evaluar la posibilidad de incluirla como componente de una vacuna.

5. OBJETIVOS.

General.

- Determinar los factores bioquímicos y ambientales que afectan la expresión de proteínas de 110-120 KDa secretadas por *Hpg*.

Particulares.

- Evaluar la relación entre el tiempo de incubación y la expresión de proteínas de 110-120 kDa.
- Evaluar diferentes métodos de precipitación de proteínas
- Determinar si la presencia de iones metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ; Fe^{2+}), agentes quelantes (Dipyridyl y EGTA) y niveles de NAD en el medio de cultivo afectan la expresión de estas proteínas.
- Determinar el efecto del pH sobre la expresión de las proteínas de 110-120 KDa.
- Analizar la expresión de estas proteínas a diferentes temperaturas de incubación.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Cepas bacterianas

Se trabajó con una cepa de campo de *Hpg* (cepa Hpa6) aislada de aves con signos clínicos de CI, proporcionada por el laboratorio Biotecnología veterinaria S.A. de C.V. (Biovetsa).

6.2. Curva de crecimiento de *Hpg*

Los medios que se utilizaron fueron BHI, TSB y LB-GP (Luria Bertani suplementado con glucosa y fosfato) con los cuales se preparó un precultivo inoculándolos con *Hpg*, los cultivos se suplementaron con NAD 0.001%, y se incubaron 24 h a 37° C en agitación. El cultivo se resembró en agar para determinar su pureza, en donde el NAD necesario para su crecimiento fue proporcionado por una estría de *S. aureus*, como cepa nodriza (Mena-Rojas et al, 2004).

Este precultivo se utilizó para inocular al 1% los medios de cultivos (BHI, TSA y LB-GP) respectivamente, los cuales se suplementaron igualmente con NAD y se incubaron en agitación a 37° C. A partir de ese momento se midió la densidad óptica (a 600nm y previamente calibrado con el blanco respectivo) y se tomó una muestra cada hora durante diez horas. Las muestras obtenidas fueron procesadas para obtener las proteínas secretadas.

6.3. Obtención de Proteínas

Los cultivos fueron centrifugados (12,000 rpm x 15 min) para separar las células y las proteínas del sobrenadante se concentraron añadiendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70%, dejando precipitar toda la noche a 4° C (Mena, 2003). Después, las muestras se centrifugaron nuevamente y la pastilla se resuspendió en un volumen mínimo de buffer TRIS HCl pH 7.5. Posteriormente, previo a su separación en geles de poliacrilamida SDS 10%, las muestras se hirvieron durante 5 min en presencia de β -mercaptoetanol al 5%. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie, y se destiñeron con ácido acético al 10%.

Habiendo determinado el medio más apropiado para la expresión de estas proteínas (BHI) así como el tiempo de incubación óptimo (5 h) a 37°C en agitación, se establecieron estas condiciones como óptimas para determinar el efecto de las diferentes variables en la expresión de las proteínas de 110-120 kDa de *Hpg*. Además en los siguientes ensayos las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (1976) antes de la electroforesis, con el fin de colocar cantidades similares en los pozos y poder hacer un análisis comparativo.

6.4. Métodos de precipitación

Para poder establecer el método más adecuado para concentrar las proteínas de interés, se probaron como agentes precipitantes (NH₄)₂ SO₄ al 70% (Mena, 2003) y 50% (Frey, *et al.*, 1992), metanol 100% (v/v) (Mena, 2003) y etanol 200% (v/v) (Kachlany, *et al.*, 2000). Para ello el sobrenadante de cultivo libre de células se dejó precipitando toda la noche a 4° C utilizando los diferentes métodos mencionados.

6.5. Efecto de iones divalentes y agentes quelantes.

El medio BHI fue utilizado para probar el efecto de diferentes iones metálicos y otros componentes sobre la expresión de las proteínas de interés. Para comparar el efecto de altas y bajas concentraciones de calcio, el medio fue suplementado con Ca²⁺ por la adición de CaCl₂ en diferentes concentraciones: 3mM (Frey y Nicolet, 1988), 5mM (Umelalim *et al.*, 1992) y 10mM (Frey y Nicolet, 1988 y Tarigan *et al.*, 1996). Para generar un medio con baja concentración de calcio se utilizó el agente quelante EGTA 1mM, (Tarigan *et al.*, 1996).

Otros iones metálicos que también se utilizaron para ver su efecto en la expresión de las proteínas de 110-120 kDa secretadas por *Hpg* fueron MgSO₄, MnSO₄, CuSO₄, y ZnCl₂ 1mM (Dupont *et al.*, 1994).

También se determinó el efecto de concentraciones bajas y altas de hierro, y para ello el medio fue suplementado con citrato de amonio férrico 0.125mM (Zhao *et al.*, 1995), mientras que el medio con baja concentración de hierro fue obtenido

suplementando con un agente quelante específico de hierro, Dipyridyl 0.2 mM (Paustian et al., 2001)

Para determinar el efecto de diferentes concentraciones de NAD, el medio de cultivo fue complementado con 5 µg/ml de NAD, el cual se consideró como un medio con baja concentración de NAD, mientras que el medio con una concentración alta fue suplementado con 20 µg/ml. El medio control fue suplementado con 10 µg/ml de NAD.

6.6. Niveles de pH

El pH del medio BHI fue ajustado, antes de esterilizarlo, por la adición de HCl o NaOH, a los valores de 5.8, 6.5, 6.8, 7.5, 8.5, 8.8, 9.8 todos ± 0.05 , (Amoako *et al.*, 1994, Bragg *et al.*, 1996, Sun *et al.*, 1998 y Kachlany *et al.*, 2000). El pH que se manejó como control fue de 7.8 ± 0.05 ya que fue el registrado en el medio de BHI antes de esterilizarlo. Luego de incubar los medios las muestras se procesaron como se mencionó arriba.

6.7. Efecto de diferentes temperaturas

Para determinar el efecto de la temperatura de incubación en la expresión de las proteínas de 110-120, los cultivos fueron incubados a 30, 35, 37, 40, o 42°C (Tan *et al.*, 1992). Posterior a la incubación, las muestras se procesaron como se mencionó anteriormente.

7. RESULTADOS

7.1. Curva de Crecimiento

H. paragallinarum fue cultivado en los caldos TSB, BHI y LB-GP suplementados con NAD, los cuales se incubaron durante diez horas, y en intervalos de una hora se midió la densidad óptica. En BHI el crecimiento comenzó a las dos horas de incubación, y tuvo su máximo a las ocho horas logrando llegar a una clara fase estacionaria entre las ocho y las diez horas y alcanzando una densidad óptica de alrededor de 1.0. Este medio fue donde se obtuvo el mayor crecimiento en comparación con los otros dos utilizados. El crecimiento en TSB comenzó a las tres horas de incubación, registrándose el mayor crecimiento a las diez horas postinoculación, donde se observa el comienzo de una fase estacionaria; en este medio la D.O. alcanzada fue de aproximadamente 0.85. En LB-GP el crecimiento fue bastante lento y fue el menor (D.O. 0.4) en comparación con los otros medios de cultivo (Fig. 5).

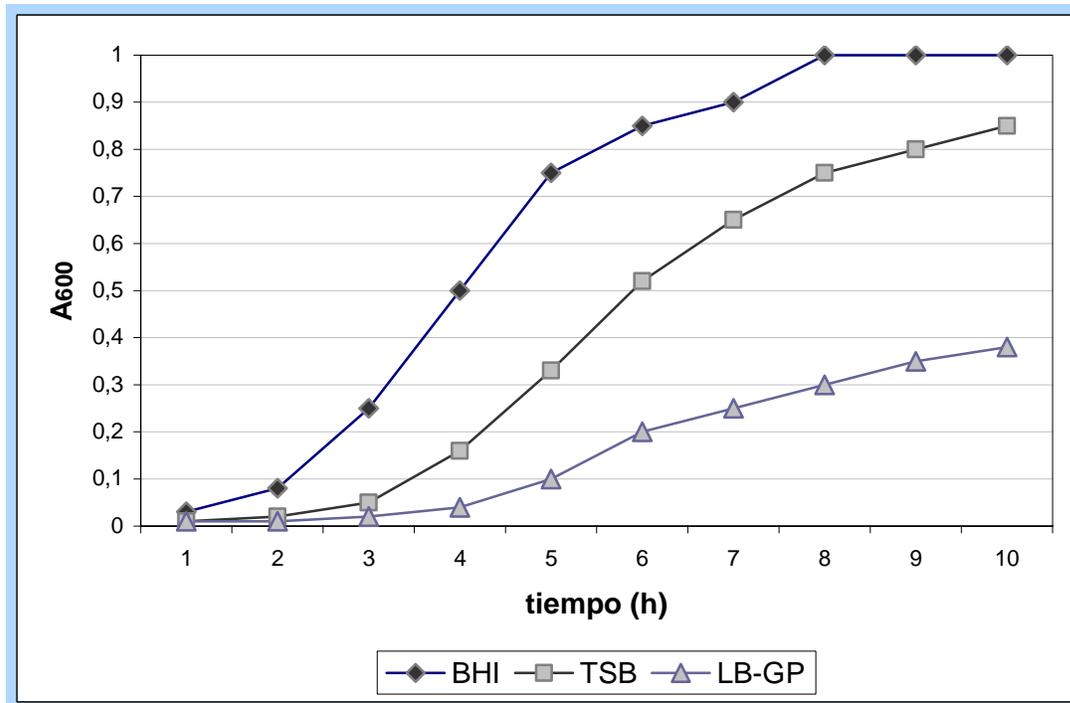


Fig. 5. Curva de crecimiento de *Hpg* en diferentes medios de cultivo.

7.2. Proteínas de 110-120 kDa secretadas por *Hpg*

Los diferentes medios de cultivo utilizados para crecer *Hpg* (BHI, TSB y LB-GP) se incubaron durante diez horas y en intervalos de una hora se tomaron muestras de cada uno para la obtención de las proteínas secretadas. Por medio de SDS-PAGE 10% se pudo observar que la expresión de las proteínas de 110-120 kDa en BHI comienza a las tres horas postinoculación (PI), mientras que su máxima expresión fue entre las cinco y seis horas PI (Fig. 6). Al comparar el crecimiento bacteriano y la expresión de las proteínas secretadas de 110-120 kDa podemos observar que el tiempo en donde se obtiene la mayor expresión de las proteínas es donde el crecimiento bacteriano se encuentra en plena fase exponencial, y a partir de ese momento la presencia de las proteínas disminuye notablemente, correspondiendo esto al momento en que el crecimiento bacteriano comienza una clara fase estacionaria (Fig. 5).

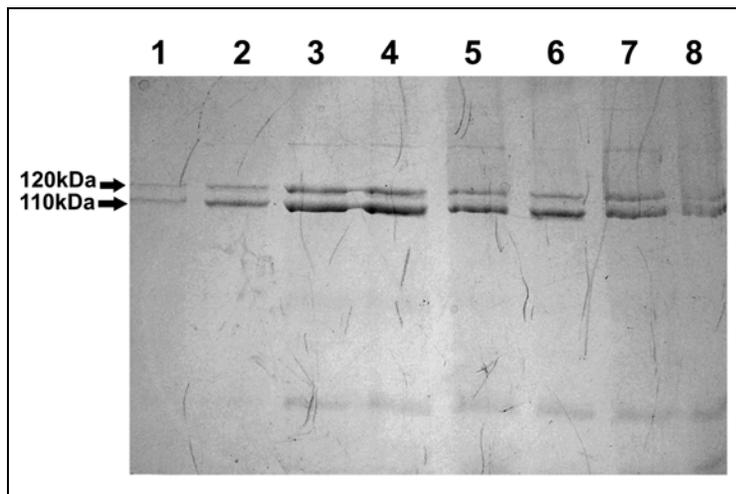


Fig. 6. Proteínas secretadas por *Hpg* en BHI a diferentes tiempos de incubación. Carril 1: 3 h de incubación; 2: 4 h; 3: 5 h; 4: 6 h; 5: 7 h; 6: 8 h; 7: 9 h, y 8: 10 h.

En el caso de TSB la presencia de las proteínas de 110-120 kDa comenzó a observarse a las cuatro horas PI, a partir de las cinco y hasta las diez horas de incubación la expresión de las proteínas permanece estable (Fig. 7). En este medio

también se pudo observar una relación entre la expresión de las proteínas y el crecimiento bacteriano, ya que el crecimiento en este medio fue menor y más lento coincidiendo con la menor expresión de las proteínas en comparación con el medio BHI. El patrón de proteínas secretadas en este medio incluye bandas que por el momento no nos interesa estudiar, por lo que fue descartado para los ensayos que se realizaron posteriormente.

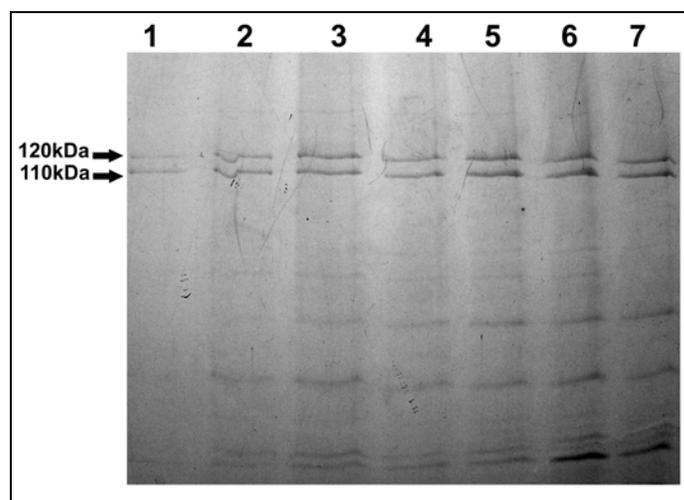


Fig. 7. Proteínas secretadas por *Hpg* en TSB a diferentes tiempos de incubación. Carril 1: 4 h de incubación; 2: 5 h; 3: 6 h; 4: 7 h; 5: 8 h; 6: 9 h; 7: 10 h.

El medio LB-GP fue donde se obtuvo el menor crecimiento bacteriano y la menor expresión de las proteínas de 110-120 kDa en comparación con BHI y TSB. La expresión de estas proteínas se observa a partir de las seis horas PI siendo entre las nueve y diez donde se obtiene la mayor expresión de las proteínas en este medio, aunque no alcanza los niveles obtenidos en los otros. El patrón de proteínas obtenido en este medio, al igual que el observado en TSB, incluye bandas que por el momento no nos interesan (Fig. 8).

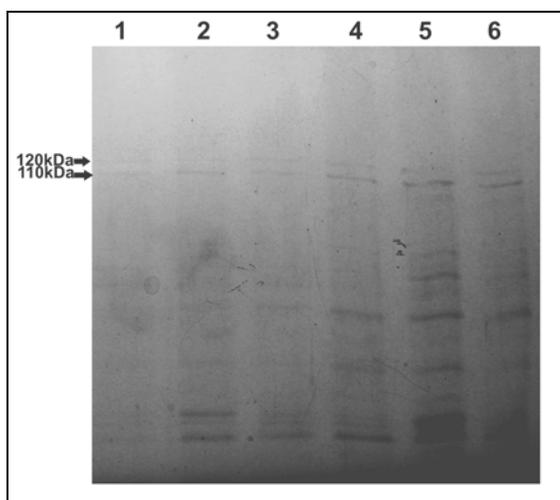


Fig. 8. Proteínas secretadas por *Hpg* en LB-GP a diferentes tiempos de incubación. Carril 1: 5 h de incubación; 2: 6 h; 3: 7 h; 4: 8 h; 5: 9 h; 6:10 h.

Ya que BHI fue donde se obtuvo la mayor expresión de las proteínas de 110-120kDa, se eligió este medio para realizar los ensayos posteriores. El tiempo de incubación que se estableció como óptimo para la obtención de las proteínas fue de cinco horas.

7.3. Método de precipitación

Para concentrar las proteínas de 110-120 kDa, los métodos de precipitación utilizados fueron MetOH 100% (v/v), EtOH 200% (v/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70% y 50% de saturación. Los patrones de proteínas obtenidos con los diferentes agentes precipitantes no presentan grandes diferencias, aunque las proteínas de 110-120 kDa precipitadas con etanol y con sulfato de amonio al 70 % de saturación se observan menos concentradas que cuando se usó sulfato de amonio al 50% o metanol como agentes precipitantes. La concentración de proteínas de 110-120 kDa obtenidas al precipitar con sulfato de amonio al 50% o metanol 100% (v/v) es muy parecida, por lo que se decidió trabajar con sulfato de amonio ya que es mucho más cómodo (Fig. 9).

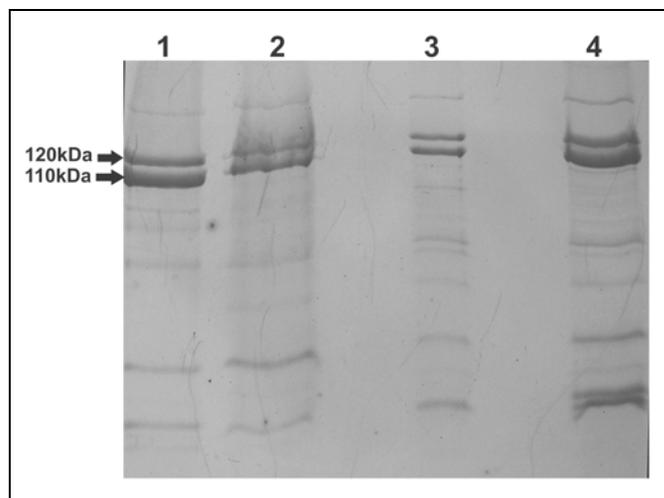


Fig. 9. Proteínas secretadas por *Hpg* obtenidas con diferentes agentes precipitantes. Carril 1: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50%; 2: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70%; 3: EtOH 200% v/v; 4: MetOH 100 % v/v.

7.4. Efecto de diferentes iones divalentes y agentes quelantes.

La presencia de algunos suplementos en el medio de cultivo favoreció la expresión de las proteínas de 110-120kDa secretadas por *Hpg*, mientras que otros la disminuyeron.

Cuando el medio de cultivo fue suplementado con CaCl_2 en diferentes concentraciones (3mM, 5mM y 10mM), se pudo observar que la expresión de las proteínas de 110-120 kDa secretadas por *Hpg* fue favorecida en el medio suplementado con CaCl_2 5mM en comparación con un medio control sin calcio (Fig. 10). La presencia de CaCl_2 3mM parece no afectar la expresión de las proteínas; sin embargo a una concentración de CaCl_2 10mM la expresión de estas proteínas disminuye notablemente (Fig. 10).

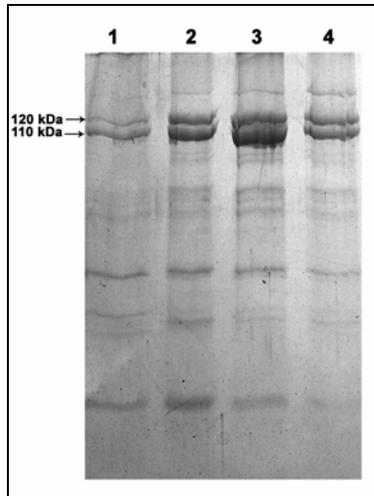


Fig. 10. Efecto del Ca^{+2} en la expresión de las proteínas de 110-120kDa secretadas por *Hpg*. Carril 1: control; 2: CaCl_2 3mM; 3: CaCl_2 5mM, 4: CaCl_2 10mM.

La presencia de un agente quelante específico para Ca^{+2} como EGTA 1mM en el medio, disminuyó fuertemente la expresión de las proteínas de 110-120kDa secretadas por *Hpg*, haciendo evidente la importancia de este catión divalente para la expresión de estas proteínas (Fig. 11). Mientras que citrato de amonio férrico a una concentración 0.125mM favoreció la expresión de las proteínas de 110-120 kDa secretadas por *Hpg*, la presencia de un agente quelante específico de hierro como dipirydyl 0.2 mM, disminuyó fuertemente la expresión de estas proteínas, ya que se observan en mucho menor cantidad.

Además de observar que los iones hierro y calcio favorecieron la expresión de las proteínas de 110-120 kDa, y que cuando los iones fueron quelados estas proteínas disminuyeron; se observó que en presencia de EGTA existía la expresión diferencial de bandas de aproximadamente 100, 81.4, 55.1 y 32.1 kDa (Fig. 11, carril 2), mientras que sólo las últimas 3 estaban presentes en cultivos suplementados con dipirydyl (Fig. 11, carril 4). Estas proteínas no se observaron en cultivos crecidos en ausencia de alguno de estos agentes quelantes (Fig. 11, carril 5).

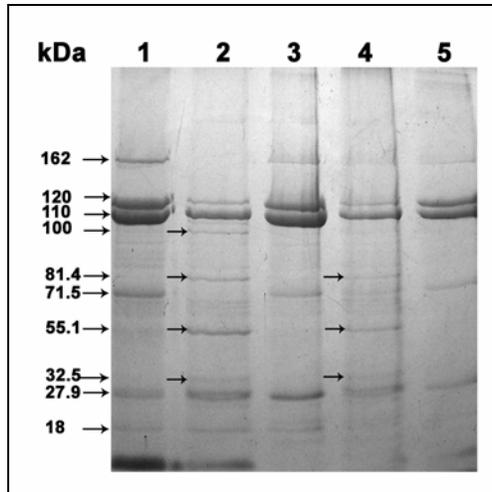


Fig. 11. Efecto de agentes quelantes sobre la expresión de proteínas secretadas por *Hpg*. Carril 1: citrato de amonio férrico 0.125 mM; 2:dipyridyl 0.2 mM; 3: CaCl₂ 5mM; 4: EGTA 1mM; 5: control.

Otros iones utilizados para determinar su efecto en la expresión de las proteínas de 110-120kDa fueron MgSO₄, MnSO₄, CuSO₄ y ZnCl₂ todos a una concentración 1 mM. La presencia de Mg²⁺ o Mn²⁺ favoreció la expresión de las proteínas de manera similar a como se observó cuando el medio se suplemento con CaCl₂. Cuando el medio se suplementó con CuSO₄ se observó una disminución en la expresión de estas proteínas (Fig. 12). La presencia de ZnCl₂ en el medio de cultivo disminuyó totalmente la expresión de proteínas secretadas por *Hpg* (dato no mostrado).

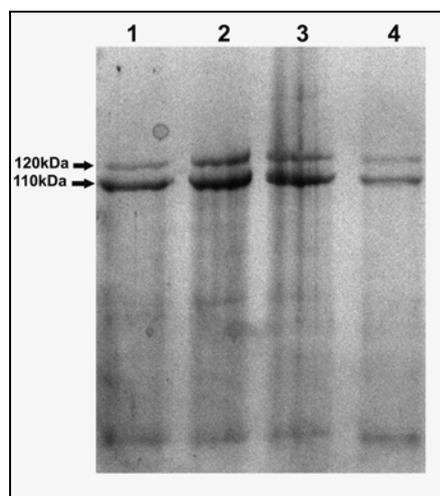


Fig. 12. Efecto de iones divalentes en la expresión de las proteínas de 110-120kDa secretadas por *Hpg*. Carril 1: control; 2: MgSO₄ 1mM; 3: MnSO₄ 1mM; 4: CuSO₄ 1mM.

Las diferentes concentraciones de NAD utilizadas parecen no afectar la expresión de las proteínas de 110-120 kDa, ya que la intensidad de las bandas en las tres condiciones no varió; tanto niveles altos como bajos de NAD no produjeron un cambio en comparación con un medio con NAD al 0.001%, concentración usualmente utilizada para el crecimiento de *Hpg* (Fig. 13).

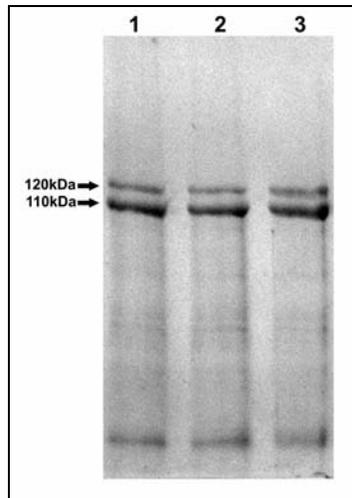


Fig.13. Efecto de diferentes concentraciones de NAD en la expresión de proteínas de 110-120kDa. Carril 1: 10 µg/ml; 2: 5 µg/ml (concentración baja) y 3: 20 µg/ml (concentración alta).

7.5. Efecto del pH

La expresión de las proteínas de 110-120 fue afectada por el pH del medio. Estas proteínas pueden producirse en el intervalo de pH de 6.8 a 8.8 (Fig. 14), y su expresión fue escasa a pH por debajo de 6.8 o por arriba de 8.8. A un pH de 7.5 o de 8.5 se observó la misma intensidad de las bandas de 110-120; siendo óptima a pH de 7.5. Sin embargo a pHs de 6.8, 7.8 y 8.8 se apreció una expresión diferencial en estas bandas, siendo la banda de 110 kDa la que se expresó mayoritariamente. A pH 7.8 es donde existió una óptima expresión de la proteína de 110 kDa.

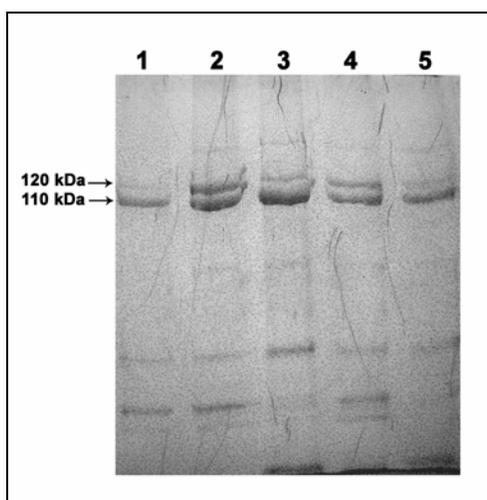


Fig. 14. Efecto de pH en la expresión de proteínas de 110-120 kDa secretadas por *Hpg*. Carril 1: 6.8 \pm 0.05; 2: 7.5 \pm 0.05; 3: 7.8 \pm 0.05; 4: 8.5 \pm 0.05; 5: 8.8 \pm 0.05.

7.6. Efecto de la temperatura.

Las proteínas de 110-120 kDa se expresan en bacterias incubadas a temperaturas de 42, 40, 37, 35 y 30°C. Sin embargo la temperatura donde se obtuvo la mejor expresión fue a 37°C, ya que temperaturas tanto superiores como inferiores disminuyeron la expresión de estas proteínas; esta disminución se vio más evidente a temperaturas mayores a 37°C (Fig. 15).

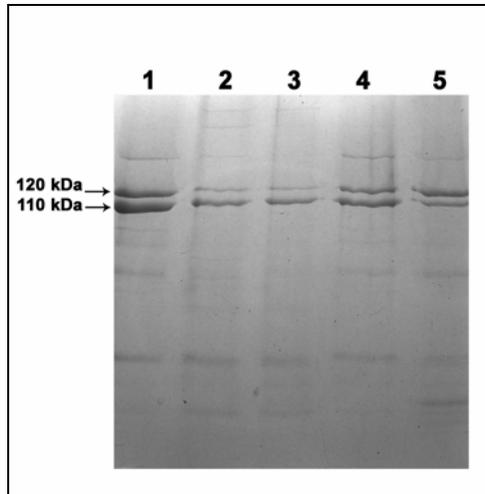


Fig. 15. Efecto de la temperatura de incubación en la secreción de proteínas de 110-120 kDa secretadas por Hpg. Carril 1: 37°C, carril 2: 42°C, carril 3: 40°C, carril 4: 35°C, carril 5: 30°C.

8. DISCUSIÓN

La relación existente entre la expresión de genes de virulencia de un microorganismo patógeno y los factores ambientales dentro del hospedero ha sido estudiada desde los 1930s, cuando las tentativas de producir toxinas en cantidades suficientes para caracterizarlas revelaron que el crecer a las bacterias en condiciones típicas de laboratorio provocaba la producción de niveles bajos de la toxina. Estos resultados condujeron a diseñar experimentos para identificar los factores que dentro del hospedero regulaban la expresión de estas toxinas (Payne, 2003). Existen muchas variables entre el hospedero y las condiciones de laboratorio que pueden influir en la expresión de genes que codifiquen para cierto tipo de toxinas, estas variables incluyen temperatura, osmolaridad, disponibilidad de nutrientes, concentraciones de hierro y otros iones etc. (Payne, 2003).

H. paragallinarum, agente causal de la CI, expresa varios factores de virulencia que están involucrados en su patogenicidad. Entre los más estudiados encontramos la cápsula (Sawata *et al.*, 1985) y la haemaglutinina (Iritani *et al.*, 1980). Recientemente se han descrito proteínas inmunógenas de 110 y 120 kDa secretadas por Hpg en medios libres de suero (LB-GP, TSA y BHI) que fueron reconocidas por sueros inmunes de aves enfermas de CI, pero no por los de aves libres de patógenos específicos (ALPES). Además, la proteína de 110 kDa fue reconocida por suero de cerdos convalecientes de pleuroneumonía infectados con *A. pleuroneumoniae*, así como por anticuerpos contra la leucotoxina de *M. haemolytica*, sugiriendo que esta proteína de 110 kDa podría pertenecer a la familia de toxinas RTX (Mena, 2003).

Las toxinas RTX tienen una importante participación en la patogenicidad de muchas bacterias Gram negativas de origen clínico y veterinario (Frey y Kunhert, 2002) tales como *E. coli* (Felmlee *et al.*, 1985), *M. haemolytica* (Lo *et al.*, 1987), *A. pleuronpneumoniae* (Frey *et al.*, 1994; Schaller *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 1989), y *A. actinomycetemcomitan* (Kraig *et al.*, 1990). La mayoría de los efectos celulares producidos por las toxinas RTX han sido asociados a su capacidad para formar poros, resultando en lesiones de membrana plasmática y lisis osmótica (Oxhamre

y Dahlfors, 2003). Además este tipo de toxinas pueden inducir la liberación de mediadores inflamatorios o ejercer efectos citotóxicos y citolíticos principalmente a células del sistema inmune del hospedero, asimismo pueden provocar muerte celular por apoptosis o necrosis (Czuprynski y Welch, 1995).

La expresión de genes de virulencia está estrictamente regulada y responde a estímulos ambientales, tales como temperatura, pH, y disponibilidad de nutrientes etc. Tal regulación permite la expresión oportuna de proteínas requeridas para el crecimiento y sobrevivencia en coordinación con cambios en las condiciones ambientales (Scarlato *et al.*, 1993; Mekalanos, 1992). Asimismo, la fase de crecimiento bacteriano puede ejercer efectos significativos en la expresión de ciertas toxinas (Shewen y Wilkie, 1985). La expresión de toxinas RTX al igual que la de muchas otras proteínas se encuentra regulada por varios factores ambientales. Por ejemplo, la mayor producción de una leucotoxina producida *por M. haemolytica* ocurre durante la fase logarítmica de crecimiento bacteriano, con una declinación importante en su producción durante la fase estacionaria. Esto pone de manifiesto que la secreción de esta leucotoxina es un proceso activo, que depende del metabolismo bacteriano en un medio de crecimiento específico, ya que puede o no ser capaz de soportar y sostener las necesidades metabólicas del microorganismo (Shewen y Wilkie, 1985).

Un fenómeno similar demostramos en este trabajo en cuanto a la expresión de las proteínas de 110 y 120kDa secretadas por *H. paragallinarum*, ya que la producción de ellas dependió de la fase de crecimiento y del tipo de medio utilizado para la incubación de *Hpg*. BHI fue el que permitió un crecimiento abundante por encima del obtenido en medio TSB y LB-GP. El tiempo PI en el cual se obtuvo la mayor expresión de las proteínas de 110 y 120 KDa fue entre las 5 y 6 h, que corresponde con la fase logarítmica. Bragg *et al.*, (1997) describieron que el tiempo de incubación ejerce efectos significativos en los niveles de expresión de antígenos por *Hpg*, detectados con anticuerpos monoclonales, cuya mayor producción ocurre durante la fase logarítmica de crecimiento bacteriano.

La síntesis de algunas toxinas bacterianas puede estar modulada por la concentración de ciertos cationes divalentes (Sato *et al.*, 1978; 1973; Avigad y

Bernheimer, 1978). Frey y Nicolet (1988) al examinar la expresión de hemolisinas producidas por *A. pleuropneumoniae*, observaron que la expresión de la hemolisina de cepas serotipo 1 estaba influida por el Ca^{+2} exógeno, ya que cuando el medio de cultivo fue suplementado con Ca^{+2} 3.25mM la expresión de la hemolisina se incrementó. La adición de EGTA 1 mM al medio provocó una fuerte disminución en la expresión de la hemolisina y en general de todas las proteínas secretadas por *A. pleuropneumoniae* las cuales no fueron visibles en gel de poliacrilamida. Además para determinar si la producción de esta hemolisina estaba inducida específicamente por Ca^{+2} , este ión fue sustituido por MgSO_4 , ZnCl_2 , KCl, LiCl., RbCl o CsCl a las mismas concentraciones. El resultado fue que ninguna de estas sales estimuló la producción de la hemolisina.

En este trabajo encontramos que la expresión de las proteínas de 110 y 120 kDa secretadas por *Hpg* también fue afectada por la presencia de Ca^{+2} , ya que la adición de CaCl_2 5mM al medio de cultivo aumentó su expresión. El efecto estimulador del calcio sobre la expresión de estas proteínas se confirmó por la disminución en su concentración que provocó la quelación del catión por EGTA, de manera similar a como fue reportado por Frey y Nicolet (1988) con cultivos de *A. pleuropneumoniae*.

Otro nutriente esencial para el crecimiento de muchos organismos es el hierro, ya que participa en la cadena transportadora de electrones, en el proceso de respiración, catálisis enzimática y estabilidad de estructuras proteicas (Paustian *et al.*, 2002). En trabajos previos se ha indicado que los niveles de Fe^{+2} son importantes en la expresión de una leucotoxina (LktA) secretada por *M. haemolytica*, aunque la relación entre la disponibilidad de hierro y la síntesis de la LktA no fue determinada (Gentry *et al.*, 1986). Gatewood *et al.*, (1994) al estudiar las condiciones de crecimiento que influían en la expresión de la leucotoxina (LTK) producida por *M. haemolytica*, observaron que la mayor producción de ocurrió en un medio suplementado con FeSO_4 (500-700 $\mu\text{g/ml}$). Por otro lado, Kenny *et al.*, (1997) determinaron que la presencia de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 1mM en el medio de cultivo fue necesaria para la máxima expresión de la proteína EspB secretada por *E. coli* enteropatógena (EPEC).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran que la expresión de las proteínas de 110 y 120 kDa fue favorecida por la presencia de Fe^{+2} en el medio (citrato de amonio férrico 0.125mM), poniendo de manifiesto la importancia de este ión en la expresión de estas proteínas, ya que en presencia de un agente quelante de hierro como dipiridyl la expresión de estas proteínas disminuyó fuertemente.

Otros iones que se han descrito pueden estar involucrados en la expresión y actividad de ciertas toxinas son Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} y Zn^{+2} . Sun *et al.*, (1998) al optimizar un medio de cultivo para la producción de una leucotoxina secretada por *M. haemolytica*, observaron que cuando el medio RPMI-1640 era suplementado con MgSO_4 1mM, el crecimiento bacteriano era favorecido, y consecuentemente la producción de la toxina se incrementaba. Este comportamiento es similar al observado por nosotros en *Hpg*, ya que cuando el medio de cultivo fue suplementado con MgSO_4 1mM o con MnSO_4 1mM la expresión de las proteínas de 110-120kDa secretadas por *Hpg* y en particular la de 110kDa se incrementó.

Dupont *et al.*, (1994) reportaron que la presencia de Cu^{+2} o Zn^{+2} inhibió la expresión de una hemolisina secretada por *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. La inhibición efectuada por el ZnSO_4 dependía de la dosis, siendo total a concentraciones por arriba de 0.1mM. La inhibición en la actividad de esta proteína no dependía de la viabilidad celular, ya que las células crecidas en medio con ZnSO_4 permanecieron viables, como se demostró por su capacidad de crecer al cultivarse en medio sin el catión.

La presencia de Cu^{+2} o Zn^{+2} en nuestros ensayos afectó la expresión de las proteínas de 110 y 120 kDa, puesto que cuando *Hpg* fue crecida en presencia de CuSO_4 1mM o ZnCl_2 1mM se observó una disminución en la expresión de estas proteínas, aunque el mayor impacto lo produjo el Zn^{+2} . Este efecto se debió a una disminución en el crecimiento celular y como describimos anteriormente en *Hpg* la expresión de estas proteínas depende de la masa celular existente. Además no solamente disminuyó la expresión de las proteínas de 110-120 kDa, sino de las demás proteínas secretadas observadas normalmente.

Un micronutriente necesario para el crecimiento de células procariontes y eucariontes es el NAD, una coenzima esencial en reacciones de oxidorreducción. Muchas bacterias son capaces de sintetizar este factor V de crecimiento; sin embargo otras han perdido esta capacidad y es necesario suplementar el medio con NAD. Se ha demostrado que cepas de *Hpg* NAD-dependientes requieren para su crecimiento de 1.56 a 25 µg/ml de NADH (Rimler *et al.*, 1977) o 20 a 100 µg/ml de NAD (Sato y Shifrine, 1965), con excepción de los aislamientos NAD-independientes descritos en Sudáfrica (Mouahid *et al.*, 1992) y México (García *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo indican que las diferentes concentraciones de NAD utilizadas en los ensayos no afectan la expresión de las proteínas de 110-120 kDa, las concentraciones empleadas (5, 10 y 20 µg/ml), se encuentran en el rango de las mencionadas anteriormente como necesarias para el crecimiento de *Hpg in vitro*. Estos resultados indican que *Hpg* puede crecerse óptimamente en presencia de NAD a una concentración de hasta 5 µg/ml, no afectando la expresión de las proteínas de 110-120 kDa, abriendo la posibilidad de crecer *Hpg* con una concentración menor a la utilizada usualmente. Sin embargo es necesario corroborar estos resultados.

Muchos factores de virulencia expresados por bacterias patógenas responden a los cambios ambientales. Uno de los factores más importantes es el pH, ya que pequeñas variaciones pueden ejercer efectos significativos tanto en el crecimiento bacteriano como en la expresión de proteínas involucradas en su patogenicidad. En algunos trabajos se ha demostrado que el pH del medio influye fuertemente en la regulación de ciertas toxinas, Kachlany *et al.*, (2000) al estudiar la secreción de una leucotoxina RTX por *A. actinomycetemcomitans* determinaron que el pH del medio afectaba la cantidad presente en el sobrenadante. Cuando esta bacteria fue crecida en cultivos con un pH inicial de 7.1 se producía la cantidad más alta de esta leucotoxina, mientras que cuando el pH inicial era de 8.0, la producción se reducía. Kenny *et al.*, (1997) obtuvieron una óptima expresión a un pH de 6.35 a 7.6 de la proteína EspB, secretada por EPEC; mientras que a pH de 6 y 8 la secreción fue muy baja.

La expresión de las proteínas de 110 y 120 kDa secretadas por *Hpg* fue significativamente afectada por el pH del medio. A pHs de 7.5 y 8.5 fue donde se obtuvo la mayor expresión de las dos proteínas, aunque a pH de 7.5 parecen estar mucho más concentradas; mientras que a pH de 7.8 la proteína de 110 kDa fue la mayormente expresada. A un pH de 6.8 y 8.8 siguen presentes las dos proteínas aunque mayormente la de 110 kDa, indicando una expresión diferencial de estas proteínas.

El metabolismo bacteriano representa una red de reacciones metabólicas, las cuales pueden estar influidas por muchos factores ambientales. Se ha demostrado que la composición celular de ácidos grasos, (Shaw y Ingraham, 1965) la actividad de proteínas (Herendeen *et al.*, 1979) y los productos finales del metabolismo bacteriano son afectados por la temperatura del medio (Jones *et al.*, 1970). Kenny *et al.*, (1997), examinaron el efecto de la temperatura de incubación sobre la expresión de la proteína EspB secretada por (EPEC), utilizaron diferentes temperaturas: 30, 33, 36, 39 o 42°C y mediante un análisis de proteínas contenidas en el sobrenadante demostraron que la máxima expresión de la proteína EspB fue alrededor de 36°C y fue significativamente reducida a 33 o 39, e indetectable a 42°C.

Igualmente la temperatura de incubación afectó la expresión de las proteínas de 110 y 120 kDa secretadas por *Hpg*. A 37° C se obtuvo su mayor expresión, mientras que a temperaturas por arriba o por debajo de 37° C disminuyeron tanto el crecimiento como la expresión de las proteínas.

Las proteínas de 110 y 120 kDa secretadas por *Hpg* podrían estar participando en el daño que esta bacteria causa a su hospedero, ya que posiblemente se trate de toxinas RTX, las cuales desempeñan un rol importante en la patogénesis causada por las bacterias que las producen (Czuprynski y Welch, 1995; Welch, 2001). Además estas proteínas son reconocidas por suero de aves enfermas de CI, lo cual indica que son producidas durante el proceso infeccioso causado por *H. paragallinarum*, asimismo son reconocidas por anticuerpos dirigidos contra Apx de *A. pleuropneumoniae* y contra la leucotoxina producida por *M. haemolytica* (Mena, 2004), evidenciando que estas proteínas son

inmunógenas y debido a su importancia podrían formar parte de alguna vacuna, ampliando la protección contra la CI. Establecer las condiciones para obtener cantidades considerables de estas proteínas, facilitará estudios posteriores, y nos permitirá conocer los factores que regulan la expresión de estas proteínas *in vivo* que pueden estar participando en la virulencia de esta bacteria.

9. CONCLUSIONES

-  El medio BHI fue donde se obtuvo el mayor crecimiento y la mejor expresión de las proteínas de 110 y 120 kDa.
-  La expresión óptima de estas proteínas se observó durante la fase logarítmica de crecimiento bacteriano.
-  La mayor recuperación de las proteínas de 110 y 120 kDa se obtuvo precipitando con $\text{NH}_4(\text{SO}_4)$ al 50 % de saturación o con MeOH 100% (v/v).
-  La presencia de CaCl_2 5mM, MgSO_4 1mM, MnSO_4 1mM o Citrato de amonio férrico 0.125mM favorecieron la expresión de las proteínas de 110 y 120 kDa.
-  La presencia de CuSO_4 1mM disminuyó la expresión de las proteínas. El ZnCl_2 1mM no permitió el crecimiento bacteriano haciendo indetectable la expresión de las proteínas secretadas por *Hpg*.
-  Las diferentes concentraciones de NAD utilizadas para el crecimiento de *Hpg* no afectaron la expresión de las proteínas de 110-120 kDa.
-  La expresión de las proteínas de 110 y 120 kDa se obtuvo a pHs entre 6.8 y 8.8. A pH de 7.5 fue donde se obtuvo la mayor expresión de ambas proteínas, mientras que la proteína de 110 kDa fue mayormente expresada a pH de 7.8.
-  37 °C es la temperatura óptima de crecimiento y de expresión de las proteínas de 110-120 kDa.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar si las proteínas de 110 y 120 kDa secretadas por *Hpg* pertenecen a la familia de proteínas RTX comparando la secuencia de aminoácidos o nucleótidos de estas proteínas con las secuencias de otras proteínas RTX ya secuenciadas.
- Identificar el operón característico que codifica para este tipo de proteínas.
- Clonar DNA que codifica para estas proteínas para sobreexpresarlas y ampliar su caracterización.
- Investigar la posible participación de las proteínas de 110–120 kDa secretadas por *Hpg* en la patogenicidad causada por esta bacteria, por medio de estudios citotóxicos en cultivo celulares, embriones o por inoculación en animales de experimentación.
- Generación de una mutante para comprobar los efectos anteriormente observados.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. **Amoako K. K., Goto Y. and Shinjo T.** 1994. Studies on the factors affecting the hemolytic activity of *Fusobacterium necrophorum*. *Vet. Microbiol.* 41:11-18.
2. **Blackall P. J.** 1983. An evaluation of methods for the detection of carbohydrate fermentation in avian *Haemophilus* species. *J. Microbiol Methods.* 1: 275-280.
3. **Blackall P. J. and Yamamoto R.** 1989. Whole-Cell Protein Profiles of *Haemophilus paragallinarum* as detected by polyacrylamide gel electrophoresis. *Avian Dis.* 33: 168-173.
4. **Blackall P. J., Eaves L. E. and Rogers D. G.** 1989. Biotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates using hemagglutinin serotyping, carbohydrate fermentation patterns, and antimicrobial drugs resistance patterns. *Avian Dis.* 33: 491-496.
5. **Blackall P. J., Eaves L. E. and Aus G.** 1990. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page scheme: comparison of the use of agglutination and hemagglutination-inhibition tests. *Avian Dis.* 34: 343-645
6. **Blackall P. J., Matsumoto, M. and Yamamoto R.** 1997. Infectious Coryza. In: Diseases of Poultry. Calnek B. W., Barnes H. J., Beard C. W., McDougald L. R, Sayf Y. M., (eds) Poultry Diseases. 10th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa. 179-190 pp.
7. **Blackall P. J. and Yamamoto R.** 1998. Infectious coryza. In: Swayne D. E., Glisson J. R., Jackwood M. W., Pearson J. E., Reed W. M., (eds). A laboratory manual for the isolation and identification of Avian Pathogens, 4th ed. Kenneth Square: American Association of Avian Pathologists.29-34.
8. **Blackall P. J.** 1999. Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic Options. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 627-632.
9. **Boehm D. F., Welch R. A. and Snyder I. S.** 1990. Calcium is required for binding of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes. *Infect. Immun.* 58: 1951-1958.
10. **Bornstein S. and Samberg Y.** 1954. The therapeutic effect of streptomycin on infectious coryza of chickens caused by *Haemophilus gallinarum*. II. Isolation and culture of *Haemophilus gallinarum*, and some of its biochemical reactions. *Am. J. Vet. Res.* 15:612-616.
11. **Bradford M. M.** 1968. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

12. **Bragg R. R., Coetzee L. and Verschoor J. A.** 1993. Plasmid encoded NAD independence in some South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Onderstepoort J. Vet. Res. 60: 147-152.
13. **Bragg R. R., Coetzee L. and Verschoor J. A.** 1997. Effects of growth conditions and incubation times on the expression of antigens of *Haemophilus paragallinarum* which are detected by monoclonal antibodies. Onderstepoort J. Vet. Res. 64:57-63.
14. **Bragg R.R.** 2002. Virulence of South African of *Haemophilus paragallinarum*. Part 2: Naturally occurring NAD-independent field isolates. Onderstepoort J. Vet. Res. 69: 171-175.
15. **Bragg R. R.** 2002. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 2: Naturally occurring NAD-independent field isolates. Onderstepoort J. Vet. Res. 69:171-175.
16. **Cavaliere S. J., Bohach G. A. and Snyder I. S.** 1984. *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. Microbiol. Rev. 18:326-343.
17. **Chang Y. F., Young R. and Struck D. K.** 1989. Cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. DNA. 8:635-347.
18. **Coote J. G.** 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxins determinants of Gram-negative bacterial. FEMS Microbiol. Rev. 88:137-162.
19. **Crujisen T. L., van Leengoed M. G., Dekker-Nooren E. M., Schoevers E. J. and Verheijden H. M.** 1992. Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. Infect. Immun. 60:4867-4871.
20. **Czuprynski C. J. and Welch R. A.** 1995. Biological effects of RTX toxins: The possible role of lipopolysaccharide. Trends Microbiol. 3:480.-483
21. **Devenish J. and Rosendal S.** 1990. Calcium binds to and is required for biological activity of the 104-kilodalton hemolysin produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Can. J. Microbiol. 37:317-321.
22. **Dupont D. P., Duhamel G. E., Carlson M. P. and Mathiesen M. R.** 1994. Effects of divalent cations on hemolysin synthesis by *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*: inhibition induced by zinc and copper. Vet. Microbiol. 41:63-73.
23. **Eaves L. E., Rogers D. G. and Blackall P. J.** 1989. Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar. J Clin Microbiol. 27:1540-1513.
24. **Elliot C. P. and Lewis M. R.** 1934. A hemophilic bacterium as a cause of infectious coryza in the fowl. J. Am. Vet. Med. Assoc. 84:878-888.

25. **Felmlee T., Pellett S. and Welch R. A.** 1985. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. J. Bacteriol. 163:94-105.
26. **Fernández R. P., García-Delgado G. A., Ochoa P. and Soriano V. E.** 2000. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico. Avian Pathol. 29:473-476.
27. **Fernandez L. A. and Bergueria J.** 2000. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. Microbiol Res. 24:21-44.
28. **Frey J. and Nicolet J.** 1988. Regulation of Hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by Ca⁺². Infect. Immun. 56: 2570-2575
29. **Frey J. and Nicolet J.** 1990. Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 28:232-236.
30. **Frey J., Meler R., Gygi D. and Nicolet J.** 1991. Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun. 59:3026-3032
31. **Frey J., Haldimann A., Nicolet J., Boffini A. and Prentki P.** 1994. Sequence analysis and transcription of the apxl operon (hemolysin I) from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Gene. 142: 97-102
32. **Frey J.** 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. Trends Microbiol. 3:257-261.
33. **Frey J. and Kuhnert P.** 2002. RTX toxins in *Pasteurellaceae*. Int. J. Med. Microbiol. 292:149-158.
34. **García A. F., Blackall P. J. and Aungulo E.** 2002. Presencia de *Haemophilus paragallinarum* NAD-independientes en México. Memorias de la XXVII Convención Anual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference; Puerto Vallarta (Jalisco) México. pp 59.
35. **Glisson J. R.** 1998. Bacterial respiratory diseases of poultry. Poultry Sci. 77: 1139-1142.
36. **González-Pedrajo B. and Dreyfus G.** 2003. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. En Mensaje Bioquímico. Vol XXVII. Flores H. O., Riveros R. H., Sosa P. A., Vázquez C. E. (eds). México.
37. **Gygi D., Nicolet J., Hughes C. and Frey J.** 1992. Functional analysis of the Ca⁺² regulated hemolysin I operon of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype I. Infect Immun. 60:3059-3064.

38. **Hanley L. E., Davis R. B. and Sunka E. M.** 1968. An evaluation and comparison of spectinomycin and spectinomycin-erythromycin combinations for infectious coryza. *Avian Dis.* 12:1-3.
39. **Herendeen S. L., Van Bogelen R. and Neidhardt F. C.** 1979. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* 139:185-194.
40. **Hinz K. H.** 1973. Beitrag zur Differenzierung von *Haemophilus*-Stämmen aus Hühnern. I. Mitteilung: Kulturelle and Biochemische Untersuchungen. *Avian Pathol.* 2: 211-229.
41. **Hollander R. and Mannheim W.** 1975. Characterization of haemophilic and related bacteria by their respiratory quinones and cytochromes. *Int J Syst Bacteriol.* 35:102-107.
42. **Iritani Y., Katagiri K. and Arita H.** 1980. Purification and properties of *Haemophilus paragallinarum* Hemagglutinin. *Am. J. Vet Res.* 41:2114-2118.
43. **Iritani Y., Iwasi S. and Katagiri K.** 1978. Production of extracellular antigen in culture supernate by *Haemophilus gallinarum*. *J. Comp. Pathol.* 88: 395-399.
44. **Issartel J. P., Koronakis V. and Hughes C.** 1991. Activation of *Escherichia coli* prohemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature.* 351:759-61.
45. **Jacques M. and Mikael L. G.** 2002. Virulence Factors of *Pasteurellaceae*, Formidable animal pathogens. *ASM News.* 68: 175-179
46. **Jarma E. and Regassa L. B.** 2004. Growth phase mediated regulation of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxI and ApxII toxins. *Microbial Pathogen.* 36:197-203.
47. **Kachlandy S. C., Fine D. and Figurski D. H.** 2000. Secretion of RTX-leucotoxin by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 68: 6094-6100.
48. **Kamp E. M., Popma J. K. and Van Leengoed. M. G.** 1987. Serotype related differences in production and type of heat-labile hemolysin and heat-labile cytotoxin of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 27:1187-1191.
49. **Kato K., Tsubahara H. and Okuma S.** 1965. Infectious coryza of chickens. VI. Hemagglutinating properties of *Haemophilus gallinarum*. *Jpn. Vet. Sci.* 27:457.
50. **Kenny B., Abe A., Stein M. and Finlay B.** 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 65:2606-26012.
51. **Korostoff J., Wang J. F., Keiba I., Miller M., Shenker B. J. and Lally E. T.** 1998. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. *Infect. Immun.* 66:4474-4483.

52. **Kuhnert P., Heyberger M., Burnens P. A., Nicolet J. and Frey J.** 1997. Detection of RTX toxin genes in gram-negative bacteria with a set of specific probes. *Applied Environ. Microbiol.* 63:2258-2265.g
53. **Kume K., Sawata A., Nakai T. and Matsumoto M.** 1983. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J Clin Microbiol.* 17:958-964.
54. **Kume K., Sawata, A. and Nakai, T.** 1984. Clearance of the challenge organisms from the upper respiratory tract of chickens injected with an inactivated *Haemophilus paragallinarum* vaccine. *Jpn. Vet. Sci.* 46: 843-850
55. **Kraig E., Dailey T. and Kolodrubetz D.** 1990. Nucleotide sequence of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: homology to the alpha-hemolysin/leukotoxin gene family. *Infect. Immun.* 58:920-929.
56. **Lolande G., Miller J. F., Tompkins L. S. and O'Hanley P.** 1989. Transformation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and analysis of R factors by electroporation. *Am. J. Vet. Res.* 50:1957-1960.
57. **Ludwing A., Jarchau T., Benz R. and Goebel W.** 1988. The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca⁺²-dependent binding to erythrocytes. *Mol. Gen. Genet.* 214:553-561.
58. **Mangan D. F., Taichman N. S., Lally E. T. and Wahl S. M.** 1991. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infect. Immun.* 59:3267-3272.
59. **Maudsley J. R. and Kadis S.** Growth and hemolysin production by *H. pleuropneumoniae* cultivated in a chemically defined medium. *Can. J. Microbiol.* 1989. 32:801-5.
60. **Mena R. E.** 2003. Identificación de proteínas secretadas al medio por *Haemophilus paragallinarum*. Tesis de Maestría en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Instituto de Ciencias. Puebla, Puebla.
61. **Mena-Rojas, E., Vázquez C.C., Vaca P.S., García G.O., Pérez-Márquez, V., Pérez-Méndez, A., Ibarra-Caballero, J., de la Garza, M., Zenteno E. and Negrete-Abascal, E.** 2004. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110 kDa putative RTX-protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 232: 83-87.
62. **Mekalanos J. J.** 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 174:1-7.
63. **Mouahid M., Bisgaard M., Morley A. J., Metters R. and Mannheim W.** 1992. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Vet. Microbiol.* 31: 363-368.

64. **Narayanan S. K., Nagaraja T. G., Chengappa M. M. and Stewart G. C.** 2001. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Veterinary Microbiology*. 84:337-356.
65. **Odendaal M. W. and Plessies D. L.** 2000. The influence of *Mannheimia haemolytica* A1 seed culture inoculum cell density on the production of leukotoxin in submerged culture supernatant. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 67:205-216.
66. **Oxhamre C. and Richter-Dahlfors A.** 2003. Membrane-damaging toxins: Family of RTX toxins. In *Bacterial Protein toxins*. Burns, D. L., Barbieri, J. L., Iglewsl, B. H., Rappouli R. (Eds). 2003. Asm Press, USA, pp 23-38.
67. **Page L. A.** 1962. *Haemophilus* infections in chickens. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am. J. Vet. Res.* 23:85-95.
68. **Paustian M. L., May B. J. and Kapur V.** 2001. *Pasteurella multocida* gene expression in response to iron limitation. *Infect. Immun.* 69:4109-4115.
69. **Payne S. M.** Regulation of bacterial toxins synthesis by iron. In *Bacterial Protein toxins*. Burns, D. L., Barbieri, J. L., Iglewsl, B. H., Rappouli R. (Eds). 2003. ASM Press, USA, pp 23-38.
70. **Rimler R. B., Shotts E. B., Brown J. and Davis R. B..** 1977. The effect of sodium chloride and NADH on the growth of six strains of *Haemophilus* species pathogenic to chickens. *J. Gen. Microbiol.* 98:349-354.
71. **Rimler R. B., Shotts E. B., Brown J. and Davis R. B..** 1976. The effect of atmospheric conditions on the growth of *Haemophilus gallinarum* in a defined medium. *J. Gen. Microbiol.* 92:405-409.
72. **Rimler R. B.** 1979. Studies of the pathogenic avian haemophili. *Avian Dis.* 24:1006-1018.
73. **Rivero-García P.** 2005. Identificación de proteasas secretadas por *Haemophilus paragallinarum*. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala UNAM.
74. **Sato S. and Shifrine M.** 1965. Application of the gel precipitation test to serologic studies of chickens inoculated with *Haemophilus gallinarum*. *Avian Dis.* 9:591-598
75. **Sakai T. and Nagao S.** 1987. Experimental infection of chickens with *Haemophilus paragallinarum* and therapeutic efficacy of TA-068W. *Bull. Coll. Vet. Med. Nihon Univ.* 40:228-235.
76. **Sandoval V. E., Terzolo H. R. and Blackall P. J.** 1994. Complicated infectious coryza in Argentina. *Avian Dis.* 38:672-678.
77. **Sandoval V. E. and Terzolo H. R.** 1996. Coriza infecciosa. Primera parte: descripción de la enfermedad, el agente y los brotes de campo. *Avicult Profes.* 14:29-35.

78. **Sawata A., Kume K. and Nakase Y.** 1979. Antigenic structure and relationship between serotypes 1 and 2 of *Haemophilus paragallinarum*. *Am. J. Vet. Res.* 40: 1450-1453.
79. **Sawata A., Kume K. and Nasake Y.** 1980. Biologic and serologic relationship between Page's and Sawata's serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1901-1904.
80. **Sawata A., Kume K. and Nakai T.** 1984. Hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum* serotype 1 organism. *Jpn. J. Vet. Sci.* 46:21-29.
81. **Sawata A., Nakai T., Kume K., Yoshikawa H. and Yoshikawa T.** 1985. Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. *Am. J. Vet. Res.* 46:1185-1191.
82. **Scanlan C. M., Berg J. N. and Fales W. H.** 1992. Comparative in vitro leukotoxin production of three strains of *Fusobacterium necrophorum*. *Am. J. Vet. Res.* 43: 1329-1333.
83. **Sato H., Yamakawa Y., Ito A. and Murata R.** 1978. Effect of zinc and calcium ions on the production of alpha-toxin and proteases by *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* 20:325-333.
84. **Scarlato V., Arico B., Domenighini M. and Rappuoli R.** 1993. Environmental regulation of virulence factors in *Bordetella* species. *Bioessays.* 15:99-104.
85. **Schaller A., Kuhn R., Kuhnert P., Nicolet J., Anderson T. J., MacInnes J. L., Segers R. P. and Frey J.** 1999. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology.* 145:2105-16.
86. **Serrano-Vázquez A.** 2004. Condiciones de motilidad *in vitro* de *Haemophilus paragallinarum*. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala UNAM.
87. **Shaw M. K. and Ingraham J. L.** 1965. Fatty acid composition of *Escherichia coli* as a possible controlling factor of the minimal growth temperature. *J. Bacteriol.* 90:141-146.
88. **Shewen P. E., and Wilkie B. N.** 1982. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect. Immun.* 35:991-94.
89. **Slots J., Reynolds H. S. and Genco R. J.** 1980. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect. Immun.* 29:1013-1020.
90. **Soloaga A., Kuhnert P., de la Puente-Redondo V. A., Nicolet J. and Frey J.** 1999. Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol. Microbiol.* 31:1013-1024.

91. **Soriano V. E., Blackall P. J., Dabo G., Téllez G., Delgado-García A. and Fernández R. P.** 2001. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume Hemagglutinin Scheme. *Avian Dis.* 45:680-683.
92. **Soriano V. E., Longinos G. M., Fernández R. P., Téllez G. A., Suárez G. F. and Blackall, P. J.** 2003. Cross-protection studies among nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Blackall scheme. Proceedings of XVIII congress of the World Veterinary Poultry Association. 19-23; Denver (Colorado) USA. United Kingdom (Compton): World Veterinary Poultry Association, pp. 121.
93. **Soriano V. E., Longinos G. M., Fernández R. P., Velásquez Q. E., Ciprián C. A., Salazar-García F. and Blackall P. J.** 2004. Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 48:886-889.
94. **Stanley P., Backman L. C., Koronakis V. and Hughes C.** 1994. Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science.* 266:1992-1996.
95. **Sumano L.G. and Ocampo C.L.** 1987. Estudio cinético comparativo de tres combinaciones de sulfonamida-trimetoprim en gallinas White Leghorn sanas y enfermas de coriza infecciosa (*Haemophilus gallinarum*). *Vet. Méx.* 18:21-26.
96. **Sun Y., Kenneth D. and Clinkenbeard D.K.** 1998. Serum-free culture of *Pasteurella haemolytica* optimized for leukotoxin production. *Am. J. Vet. Res.* 59: 851-855.
97. **Talchman N. S., Dean R. T. and Sanderson C. J.** 1980. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 28:258-268.
98. **Tan Z. L., Nagaraja T. G. and Chengappa M. M.** 1996. *Fusobacterium necrophorum* infections: virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. *Vet. Res. Com.* 20:113-140.
99. **Tan Z. L., Nagaraja T. G. and Chengappa M. M.** 1992. Factors affecting the leukotoxin activity of *Fusobacterium necrophorum*. *Vet. Microbiol.* 32: 15-28.
100. **Tarigan S., Slocombe R. F., Browning G. F. and Blackall P. J.** 1996. Characterization of haemolytic RTX toxins produced by Australian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Austr. Vet. J.* 73:164-169.
101. **Tascón R. I., Vázquez-Boland J. A., Gutiérrez-Martin C. B., Rodríguez-Barbosa I. and Rodríguez-Ferri E. F.** 1994. The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol. Microbiol.* 14:207-216.

102. **Terzolo H. R., Paolicchi F. A., Sandoval V. E., Blackall P. J., Yamaguchi T. and Iritani Y.** 1993. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. Avian Dis. 37: 310-314.
103. **Terzolo H. R.** 2000. Revisión sobre coriza infecciosa: propuestas de investigación para su diagnóstico y control. Rev Med Vet. 81:262-269.
104. **Terry T. D., Zalucki Y. M., Walsh S. L., Blackall P. J. and Jennings M. P.** 2003. Genetic analysis of plasmid encoding haemocin production in *Haemophilus paragallinarum*. Microbiol. 147:3177-3184.
105. **Tsaí C. C., McArthur W. P., Baehni P. C., Hammond B. F. and Talchman N. S.** 1979. Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque-derived Gram-negative microorganism. Infect. Immun. 25:427-439.
106. **Umelalim A. I., Steffens W. L., Udeze F. A. and Kadis S.** 1992. Effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin and lipopolysaccharide on cultured porcine neutrophils. Curr. Microbiol. 24: 81-87.
107. **Welch R. A.** 1991. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. Mol. Microbiol. 5:521-528.
108. **Welch R. A., Bauer M. E. Kent D. A., Leeds A. J., Moayeri M. Regassa B. L. and Wenson L. D.** 1995. Battling Against Host Phagocytes: The Wherefore of the RTX Family of Toxins? Infect. Agent Dis. 4: 254-272.
109. **Zambon J. J.** 1985. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 12:1-20.
110. **Zhao C., Nguyen T., Lui L., Sacco R. E., Brogden K. A. and Lehrer R. I.** 2001. Gallinacin-3, an inducible epithelial β -defensin in the chicken. Infect. Immun. 69:2684-2691.