



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA D MÉXICO**

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**Jefatura de la carrera de Biología**

**“RESPUESTA A ESTRÉS  
POR HIERRO EN  
*Gallibacterium anatis*”**

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

PRESENTA:

**JUAN ISMAEL REA HERNÁNDEZ**

ASESOR:

**Dr. ERASMO NEGRETE ABASCAL**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. De México, México.

Diciembre 2011



Agradecimientos a PAPIIT IN216010 y PAPCA FESI-UNAM



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.

## **Agradecimientos**

**A los millones de mexicanos(as) que pagan impuestos, quienes a través de la UNAM han financiado parte de mi formación.**

**Este proyecto de investigación fue financiado por PAPIIT IN216010 y PAPCA FESI-UNAM.**

## RESUMEN

RESPUESTA A ESTRÉS POR HIERRO EN *Gallibacterium anatis*.

Juan Ismael Rea-Hernández

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

[Guilty\\_rea@hotmail.com](mailto:Guilty_rea@hotmail.com) 2011

El Hierro es un elemento esencial para casi todos los microorganismos. *Gallibacterium anatis* es un cocobacilo Gram (-) perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* que afecta el aparato reproductor de las gallinas, produciendo grandes pérdidas económicas debido a que reduce la postura de huevo. Muchos organismos de la familia *Pasteurellaceae* obtienen el hierro directamente de las proteínas del hospedero, o por mecanismos dependientes de los sideroforos. En *G. anatis* no han sido estudiados los mecanismos de respuesta a estrés por bajo hierro ni las proteínas inducidas en estas condiciones. *G. anatis* crecida en presencia del agente quelante de hierro Dipyrityl, presentó un menor crecimiento que el mismo cultivo bacteriano en ausencia de dipyrityl. una densidad óptica menor que el control, indicando una inhibición en su crecimiento, y expresaron diferencialmente OMP's, las OMP's diferenciales fueron reconocidas por el suero de aves infectadas con *G. anatis* o *Avibacterium paragallinarum*, sugiriendo que su estructura es similar a las proteínas inducidas por estrés por hierro en *A. paragallinarum* y que es expresada *in vivo*. Una OMP de ~70K que se expresaba diferencialmente fue analizada mediante MALDI-TOF, dando homología con una proteína CirA involucrada en la adquisición del Fe. Así mismo se observó la presencia de un compuesto quelante de Fe secretado al medio, posiblemente un sideróforo. La baja concentración del Fe produce la expresión diferencial de proteínas que podrían estar participando en el proceso de patogenicidad

**Palabras clave:** Hierro, sideróforo, *Pasteurellaceae*, OMP's, *Gallibacterium anatis*

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> _____	<b>1</b>
<b>1. EL HIERRO EN LAS BACTERIAS</b> _____	<b>3</b>
1.1. Homeostasis bacteriana del Fe.	
1.2. Sideróforos.	
1.3. Transporte de Hierro.	
1.4. Transporte transmembranal.	
1.5. Participación del Fe en la patogenicidad.	
<b>2. DESCRIPCIÓN DEL ORGANISMO</b> _____	<b>9</b>
2.1. Descripción del genero <i>Gallibacterium</i> .	
2.2. Propiedades bioquímicas.	
2.3. Descripción de <i>Gallibacterium anatis</i> .	
<b>3. PATOLOGÍA</b> _____	<b>12</b>
<b>4. EPIDEMIOLOGÍA</b> _____	<b>13</b>
4.1. Distribución en el mundo	
4.2. Distribución en México	
<b>5. ANTECEDENTES</b> _____	<b>15</b>
<b>6. JUSTIFICACIÓN</b> _____	<b>17</b>
<b>7. OBJETIVOS</b> _____	<b>18</b>
<b>8. MATERIAL Y METODOS</b> _____	<b>19</b>
8.1. Bacteria	
8.2. Material	
8.3. Crecimiento de la bacteria	

8.4. Cinética de Crecimiento bacteriano	
8.5. Obtención de Proteínas de membrana externa (OMP's)	
8.6. Obtención de Proteínas secretadas	
8.7. Electroforesis	
8.8. Analisis mediante Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization (MALDI-TOF)	
8.9. Inmunoreconocimiento	
8.10. Detección de sideróforos	
8.10.1.Crecimiento en medio minimo	
8.10.2.Prueba de FeCl <sub>3</sub> para detectar sideróforos	
8.11. Ensayo de OMP's que unen hemoglobina de <i>Gallus Gallus</i>	
8.11.1.Obtención de la sangre de pollo	
8.11.2.Purificación de hemoglobina	
8.11.3.Ensayo de adhesión de OMP's a hemoglobina de <i>G. gallus</i>	
<b>9. RESULTADOS</b> _____	<b>27</b>
9.1. Cinetica de crecimiento bacteriano	
9.2. OMP's y proteínas secretadas	
9.3. Inmunoreconocimiento	
9.4. MALDI-TOF	
9.5. Detección de posibles sideróforos	
9.6. Proteínas de Membrana externa que unen hemoglobina	
<b>10. DISCUSIÓN</b> _____	<b>35</b>
<b>11. CONCLUSIÓN</b> _____	<b>41</b>
<b>12. LITERATURA CITADA</b> _____	<b>42</b>

## INTRODUCCIÓN.

El Hierro (Fe) es un elemento esencial para casi todos los microorganismos esto se debe a sus propiedades químicas que lo hacen un elemento idóneo para participar en el transporte de electrones durante procesos inherentes al metabolismo celular al poder actuar como un catalizador. Durante los procesos metabólicos (*Hider y Kong, 2010*) sirve como cofactor de numerosas enzimas, tales como nitrogenasas, peroxidasas y catalasas, por mencionar algunas.

Sus propiedades son explicables gracias a la capacidad que posee el Fe para formar iones con estado de oxidación +3 o +2 (*De la Garza y Vaca Eds., 2010*), estos estados energéticos son lo suficientemente estables para permitirle al Fe participar en procesos biológicos que requieren transferencia de electrones, además de que implican un bajo gasto energético para transferir electrones hacia estos estados de oxidación, no importando si vienen de sustratos reductores u oxidantes.

El Fe es el 4<sup>to</sup> elemento en abundancia en la corteza terrestre, existe en un equilibrio dinámico entre la forma ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) y férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ), dependiendo de su entorno, de manera que a pH ácido o en condiciones anaeróbicas, el equilibrio se desplaza hacia la forma soluble ( $\text{Fe}^{+2}$ ) (*Aisen, 1976*). No obstante cuando este se encuentra en presencia de oxígeno pasa a su estado oxidado o férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ), que en condiciones de solución acuosa a pH alcalino o neutro forma un precipitado insoluble (*Litwin y Calderwood, 1993*) volviéndose inaccesible a los organismos.

Es por la limitada biodisponibilidad del Fe, que el proceso evolutivo favoreció a aquellos organismos que desarrollaron mecanismos para su adquisición del medio. A la par de esto se desarrollaron mecanismos que protegieran a la célula de la toxicidad potencial del Fe debida a una excesiva acumulación intracelular que podría desencadenar la formación de radicales de oxhidrilo altamente oxidantes debido a la reacción producida de la interacción de Fe con peróxido de hidrogeno.

Los mecanismos de adquisición de Fe están involucrados con el proceso de patogenicidad bacteriana, los microorganismos que sean más eficientes en la obtención del Fe tendrán mayores probabilidades de lograr la colonización del hospedero. En contraste los hospederos, como mecanismo de defensa, utilizan la respuesta del sistema inmune así como una disminución de nutrientes disponibles para el patógeno, incluido el Fe, el cual es secuestrado por moléculas producidas por el hospedero y/o limitado en su biodisponibilidad, lo que restringe el crecimiento bacteriano (Payne, 1993). Lo que conlleva a la restricción del crecimiento bacteriano (Ratledge y Dover, 2000; Weinberg, 2000).

La mayor parte del Fe presente en el hospedero se encuentra unido a proteínas, de forma que su concentración en el medio acuoso suele ubicarse en  $10^{-24}$ M (Palyada et al, 2004) valor muy por debajo de los requerimientos de las bacterias para su desarrollo óptimo, concentración que oscila entre  $10^{-6}$ M y  $10^{-8}$ M (Prade et al., 2000). Por ejemplo, el Fe en el suero humano se encuentra en una concentración aproximada de  $10^{-18}$ M (Bullen et al., 1978), esta concentración contrasta con el mínimo requerido por las bacterias para crecer. Por lo que se puede considerar que se produce un estado de hipoferrremia como respuesta inmunológica a la infección bacteriana. Este hecho ha sido comprobado en numerosos estudios donde dietas deficientes en Fe provocan un incremento en la resistencia a infecciones, esta situación es reversible cuando se restauran los niveles de Fe en suero (Bullen et al., 1978; Hart et al., 1982; Andrews et al., 2003).

# 1. EL HIERRO EN LAS BACTERIAS

## 1.1. Homeostasis bacteriana del Fe

Las bacterias han desarrollado mecanismos para satisfacer sus necesidades de Fe así como para la regulación de la concentración intracelular de este metal.. Los mecanismos de homeostasis se pueden resumir en 5 grandes grupos:

- Transporte de Fe desde el entorno por mecanismos con gran afinidad por esta molécula.
- Almacenamiento Fe en el espacio intracelular para disponer de estas reservas cuando las fuentes externas se agoten.
- El empleo de sistemas Redox en contra del estrés oxidativo.
- Control de la concentración mediante la regulación de la expresión de proteínas involucradas en el transporte de Fe bajo condiciones de baja o alta disponibilidad.
- Un sistema regulador de Fe que coordina la expresión de la maquinaria de transporte en relación a la disponibilidad en el entorno.

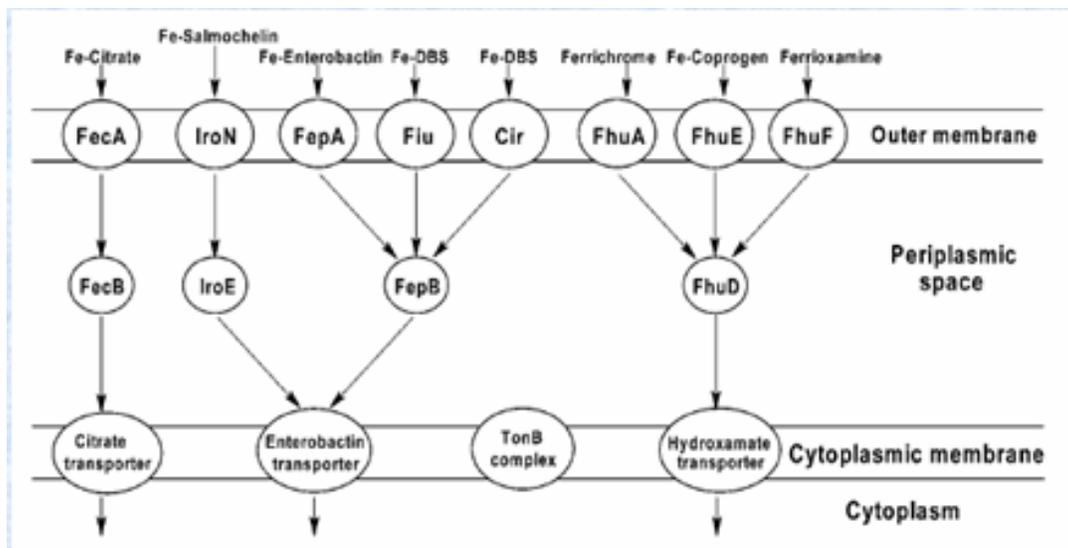
Aunque estas 5 estrategias forman, en general, los mecanismos involucrados en la homeostasis del Fe, la manera en que éstos funcionan varía considerablemente de un organismo a otro (*Andrews et al., 2003*). Bajo determinadas situaciones, los microorganismos tienen la capacidad para captar directamente el Fe del ambiente y transportarlo a su interior, sin embargo la mayoría de las bacterias Gram-negativas requieren de receptores específicos, en la membrana externa, dependientes del sistema TonB para su transporte, que internalizan el Fe hacia el periplasma, y una vez que el Fe se localiza en el periplasma, entra en función un sistema de transporte tipo ABC (también presente en las bacterias Gram-positivas) que transporta el hierro hacia el citoplasma.

## 1.2. Sideróforos.

Uno de los mecanismo más distribuidos entre los seres vivos para la adquisición de Fe es la secreción de compuestos de bajo peso molecular denominados

sideróforos que actúan a modo de quelantes y son utilizados por las monocotiledóneas, los hongos y las bacterias (Hider y Kong, 2010).

Estas moléculas de bajo peso (<1 KDa) tienen como característica una alta afinidad por el ión  $Fe^{+3}$ . La síntesis de sideróforos aumenta cuando el organismo se encuentra en entornos con una baja biodisponibilidad de Fe (Ratledge, 2000). La gran mayoría son polipéptidos que poseen grupos funcionales con una alta afinidad por los iones de Fe. La secreción de sideróforos ha conllevado, en las bacterias Gram-negativas, a la evolución de diferentes mecanismos de transporte a través de las dos membranas, así como de diferentes estrategias (Fig. 1), estos sistemas pueden o no permitir la reutilización de los sideróforos secretados.



**Figura 1.-** Sistemas de transporte de sideróforos de *E. coli* y otras enterobacterias. Se observa la presencia de 3 elementos comunes, un componente en la membrana externa que une al sideróforo, una proteína que transporta el Fe a través del espacio periplásmico y un tercer componente que internaliza el Fe.

(Hider y Kong, 2010).

### 1.3. Transporte de Hierro.

El sistema más importante de transporte de Fe en vertebrados, y algunos invertebrados son las transferrinas (Tf). Es un sistema de regulación, donde las Tf se unen al Fe proveniente de la hemoglobina (ya sea por la hidrólisis de la

hemoglobina o la lisis de los eritrocitos) o de las ferritinas, estas últimas el principal mecanismo de almacenamiento de Fe.

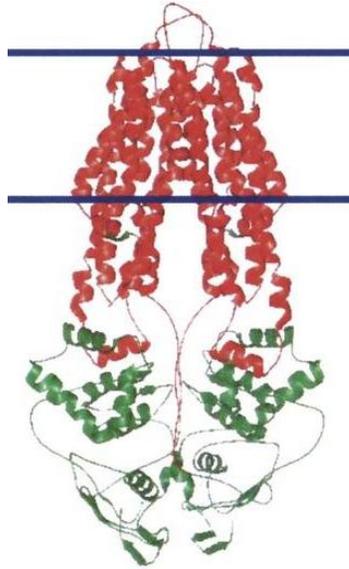
Las transferrinas se clasifican en 3 categorías: Tf sérica (serotransferrinas), lactoferrinas (Lf) también llamadas lactotransferrinas (presentes en los fluidos extracelulares) y Ovotransferrinas. Las transferrinas son glicoproteínas que poseen un peso molecular aproximado de 80 KDa y su particularidad es la presencia de dos sitios no idénticos de unión al Fe así como su elevado coeficiente de afinidad por ese ión. Su función fisiológica consiste en el transporte y/o captación del Fe. Posterior a su captación y transporte intracelular liberan el Fe cuando se localizan en el interior de endosomas ácidos (pH <5.5). Posteriormente la proteína es externalizada, ocurriendo así su reciclamiento.

Las ovotransferrinas, presentes en aves cumplen el doble papel de captación y liberación de Fe (*Abdallah y El hage Chahine, 1999*).

#### **1.4. Transporte transmembranal.**

ATP Binding Cassette o ABC son sistemas de transportadores que utilizan la energía proveniente de la hidrólisis del ATP. Comúnmente, estos sistemas son específicos para ligandos como iones inorgánicos, aminoácidos, glúcidos o polipéptidos, entre otros (*Higgins, 1992*). Estos sistemas se encuentran tan ampliamente distribuido, que conforma una de las familias más grandes de proteínas conocidas.

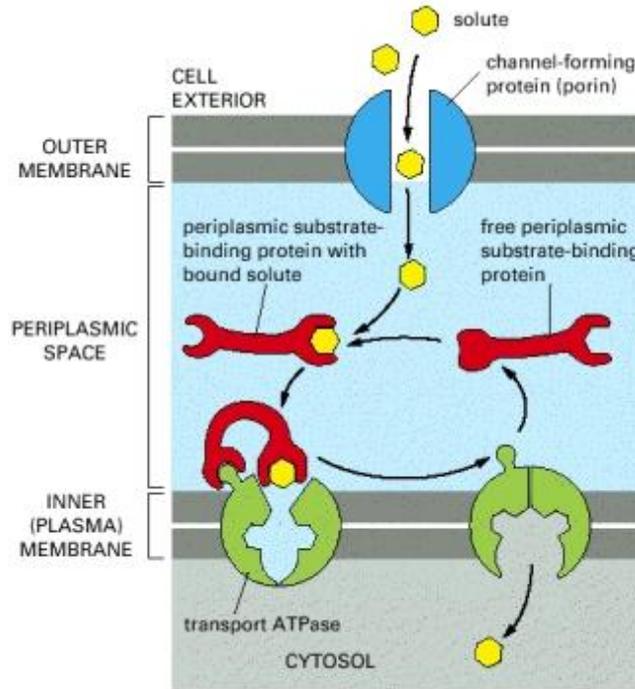
En los organismos procariontes se han identificado centenares de sistemas de transportadores ABC (Fig. 2). Estos sistemas ABC comparten características muy similares siguiendo un patrón que presenta al menos una proteína periplásmica de unión al ligando y una que sirve como translocador del ligando hacia el citoplasma. Este último componente está formado por una región asociada a la membrana citoplasmática del lado interno donde posee un dominio de unión al ATP, cuya hidrólisis suministra de energía para el proceso de internalización (*Fath y Kolter, 1993*).



**Figura 2.-** Transportador ABC, mostrando en rojo las  $\alpha$ -hélices que atraviesan la membrana citoplasmática, y en verde la región que une ATP necesario para el proceso de translocación. (*Oberai et al., 2006*).

El componente translocador presenta múltiples  $\alpha$ -hélices, que se distribuyen transmembranalmente y las  $\alpha$ -hélices constituyen el canal a través del cual las sustancias transportadas atraviesan la membrana citoplasmática (*Higgins, 1992*). En las bacterias es común encontrar homodímeros de moléculas que poseen un dominio transmembranal y un dominio de unión al ATP.

En el espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas se encuentran proteínas solubles, conocidas como Substrate Binding Proteins (SBP) (Fig. 3), que interactúan con el sistema ABC. Éstas funcionan al asociarse al ligando de interés y presentarlo al sistema ABC. Sin embargo, las SBP pueden encontrarse ancladas a la membrana (*Ames, 1986*). Las SBP obtienen el ligando de las proteínas de membrana externa (OMP) y lo transfieren al componente transmembranal correspondiente. Este complejo interactúa con el translocador de la membrana citoplasmática.



**Figura 3.-** Esquema simplificado del proceso de ingreso de un soluto desde el medio extracelular hasta el citosol. Se detalla la participación de las SBP en el proceso de transporte desde la membrana externa hacia la membrana interna. Tomado de *Albert's et al., 2002*.

### 1.5. Participación del Fe en la patogenicidad.

Ante una infección bacteriana, el proceso de secuestro de Fe es un importante mecanismo de defensa del hospedero, y por consiguiente la capacidad de obtenerlo es un factor de virulencia de los diversos patógenos (*Ratledge y Dover, 2000*).

Los organismos patógenos deben de percibir su entorno de manera adecuada y responder con alteraciones coordinadas de la expresión de sus genes. Determinados factores ambientales; pH, osmolaridad, temperatura y concentración de aminoácidos, regulan de manera coordinada la expresión de genes de virulencia. Entornos con baja concentración de Fe son una señal para los patógenos para la inducción de genes de virulencia. (Tabla 1) (Tabla 2) (*Litwin et al., 1993*).

**Tabla 1.-** Ejemplos de factores de virulencia regulados por Fe. Se observa la expresión de proteínas involucradas en la adquisición de Fe en diferentes microorganismos, las proteínas pueden o no ser secretadas al medio, su función radica en regular la homeostasis bacteriana del Fe.

Tomado de *Litwin et al., 1993*.

Organism	Virulence determinant(s)
<i>Escherichia coli</i>	Aerobactin SLT-I $\alpha$ -Hemolysin
<i>Shigella dysenteriae</i> type 1	Shiga toxin
<i>Serratia marcescens</i>	Hemolysin
<i>Vibrio cholerae</i>	Iron-regulated gene <i>A</i> ( <i>irgA</i> )
<i>Vibrio anguillarum</i>	Anguibactin
<i>Yersinia</i> spp.	Iron-regulated outer membrane proteins
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Transferrin-binding protein 1 (TBP1) Transferrin-binding protein 2 (TBP2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exotoxin A Elastase Alkaline protease
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diphtheria toxin

Uno de los factores que desempeña un papel fundamental en la colonización bacteriana es la adquisición del Fe. Durante la infección bacteriana se puede adquirir Fe directamente de algunas de las proteínas del hospedero. Estas son secuestradas por receptores en la membrana externa para después utilizar los iones Fe que transportan.

Se han identificado receptores para proteínas transportadoras de Fe, transferrina y lactoferrina, en la membrana externa de diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*, entre ellos *Actinobacillus pleuropneumoniae* para el cual se han descrito diferentes mecanismos de adquisición de Fe (*Jaques, 2004*) estos mecanismos se manifiestan durante la infección. *A. pleuropneumoniae* posee receptores para transferrina (*Gerlach et al., 1992; Gonzales et al., 1995; Wilke et al., 1997*) y hemoglobina (*Deener y Potter, 1989; Bélanger et al., 1995; Archambault, et al., 1999*) además de la capacidad para utilizar sideróforos exógenos. En otros miembros de la familia, como la cepa PM70 de *Pasteurella multocida*, se ha demostrado que una gran porción de su genoma (alrededor del 2.5%) codifica para 53 proteínas con secuencias similares a otras proteínas descritas para la homeostasis del Fe (*May et al., 2001*). Crecimientos diferenciales de *P. multocida*

en medios ricos y pobres en Fe demostraron que diferentes proteínas de membrana de alto peso molecular se encuentran reguladas por los niveles de Fe (*Snipes et al., 1988; Choi-Kim et al., 1991*).

**Tabla 2.-** Genes regulados por FE. El Fe actúa como co-represor de la proteína represora Fur (**F**erric **u**ptake **r**egulator). Cuando la concentración de Fe es alta, se forma el complejo Fe-Fur, el cual se une a los operadores adyacentes a los promotores de los genes cuyos productos están involucrados en la adquisición de hierro, impidiendo su transcripción. En condiciones de bajo Fe no se forma el complejo Fe-Fur y los genes antes reprimidos son transcritos.

Tomado de *Litwin et al., 1993*.

Gene(s)	Location (min)	Function
<i>fhuA (tonA)</i>	3	Outer membrane receptor, ferric hydroxamate siderophores
<i>fhuBCD</i>	3	Transport, ferric hydroxamate siderophores
<i>fecA</i>	6	Outer membrane receptor, ferric dicitrate
<i>fecBCDE</i>	6	Ferric dicitrate transport
<i>entABCDEF</i>	13	Enterobactin biosynthesis
<i>fepA</i>	13	Outer membrane receptor, ferric enterobactin
<i>fepBCDEG</i>	13	Ferric enterobactin transport
<i>fes</i>	13	Ferric enterobactin esterase (reductase)
<i>fur</i>	16	Repressor, ferric uptake regulation
<i>fhuE</i>	16	Outer membrane receptor, coprogen and ferric rhodotorulate
<i>fiu</i>	18	Unknown
<i>tonB</i>	27	Transport of ferric siderophores, vitamin B <sub>12</sub> , and lethal agents
<i>cir</i>	43	Colicin I transport
<i>exbBC</i>	64	Transport of ferric siderophores, vitamin B <sub>12</sub> , and lethal agents
<i>iutA</i>	pColV	Outer membrane receptor, ferric aerobactin
<i>iucABCD (aerDBCA, respectively)</i>	pColV	Aerobactin biosynthesis
<i>slt-I</i>	Phage H-19B	Shiga-like toxin I

## 2. DESCRIPCIÓN DEL ORGANISMO.

La taxonomía de organismos previamente reportados como *Actinobacillus salpingitidis*, *Pasteurella haemolytica* o *Pasteurella anatis* fue revisada y se concluyó en la creación de un nuevo género: *Gallibacterium* (*Christensen, et al 2003*).

### 2.1 Descripción del género *Gallibacterium*.

Del latín *gallus*: gallina y *bacterium*: barra. *Gallibacterium*; Bacteria de la gallina. Miembro de la familia *Pasteurellaceae* (*Pohl, 1979*) que Pohl en 1981 incluyó en el complejo aviar (*P. haemolytica*)-*A. salpingitidis*-*P. anatis*. La descripción fenotípica (Tabla 3) está fundamentada en Bisgaard 1982 así como en la caracterización de los subsecuentes aislados.

*G. anatis* es una bacteria Gram-negativa, tradicionalmente considerada inmóvil (aunque trabajos realizados en el laboratorio demuestran su capacidad de

movimiento), en forma de barra o pleomórfica que se encuentra como célula aislada o en pares. Las colonias en agar con sangre bovina muestran una marcada hemólisis Beta (Fig. 4), son grisáceas, no transparentes, pero eventualmente translúcidas en la periferia, con una consistencia butirosa, lisa y delgada, circulares, elevadas con un margen entero de 1 a 2 mm después de 24-48 horas de crecimiento a 37 grados centígrados. No forma endosporas. Su crecimiento es mesofílico y es anaerobia facultativa o microaerofílica.



**Figura 4.-** Colonias de *G. anatis* cultivadas en agar con sangre caprina después de 24 horas de crecimiento a 37° C en presencia de bióxido de carbono. Se observa una marcada hemólisis beta.

## 2.2 Propiedades bioquímicas

Las propiedades bioquímicas fueron calificadas (*Christensen et al., 2003; Bisgaard et al., 2009*) con: +,  $\geq 90\%$  de las cepas resultó positiva en 1-2 días; (+),  $\geq 90\%$  de las cepas dio positivo en 3-14 días; -,  $\leq 10\%$  de las cepas resultó positiva tras 14 días; d, 11-89% de las cepas dio positivo.

Es Catalasa -, oxidasa - y fosfatasa +. Reductora de nitrato. La reacción en Hugh-Lefson fue media con fermentación de (+) D-glucosa. Prueba de aminopeptidasas para porfirina y alanina positiva. Presenta formación de ácido sin gas de: glicerol, (-) D-ribosa, (+) D-Xilosa, (-) D.manitol, (-) D-fructosa, (+) D-galactosa, (+) D-

glucosa, (+) D-manosa, sucrosa y rafinosa. Prueba de: o-nitrofenil alfa-D-glucopiranosida (ONPG) p-nitrofenil alfa-D-glucopiranosida (PNPG) positivas. Negativa en crecimiento simbiótico, citrato de Simmons, Acido-Mucato, base malonato, H<sub>2</sub>S/triple azúcar Fe (TSI), crecimiento en presencia de KCN, Voges-Proskauer a 37° y ureasa.

Da resultados negativos con las pruebas de arginina deshidrolasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, fenilalanina deaminasa, indol, gelatinasa y Tween 20 y 80. No forma pigmentos. No produce ácido con m-erytritol, adonitol, (+) D-arabitol, xilitol, (-) L-xilosa, dulcitol, (+) D-fucosa, (+) L-rhamnosa, (-) L-sorbosa, celobiosa, (+) D-melobiosa, (+) D-melezitosa, (+) D-glicogen, inulina, aesculina, amidalin, arbutin, gentobiosa, salicin, (+) D-turanosa o  $\beta$ -N-CH<sub>3</sub>-glucosamida.

Las reacciones de p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosida (NPG), o-nitrofenil  $\alpha$ -L-fucopiranosida (ONPF),  $\alpha$ -galactosidasa, acido p-nitrofenil  $\beta$ -glucopiranosiduróico (PGUA),  $\alpha$ .manosidasa y o-nitrofenil  $\beta$ -D- xilanopiranosida (ONPX) también dan resultados negativos. Se observan variaciones en la reacción de rojo de metilo a 37°C, crece en agar MacConkey y produce ácido a partir de (+) L-arabinosa, (-) D-arabinosa, m-inositol, (-) D-sorbitol, (-) L-fucosa, lactosa, maltosa, trehalosa y dextrina. La especie tipo es *G. anatis*. (Christensen et al., 2003)

### **2.3 Descripción de *G. anatis*.**

Los aislados son  $\beta$  hemolíticos, (-) D-arabinosa y (-) L-fucosa-positiva (el biovar hemolítico, está conformado por los biovares 1, 3, 4, 11, 12, 15, 17-20, 22, 24 de las aves. O no hemolíticos, positivos para trehalosa y (-) D-arabinosa-, (-) L-fucosa-, maltosa-, y negativos para dextrina (biovar anatis, anteriormente *P. anatis*) (Christensen et al., 2003).

La cepa de estudio 12656-12 liver fue aislada de pollo en Dinamarca, se encontró en un caso de septicemia, pertenece al biovar hemolítico y se incluye en el Biovar 4. (Bojensen et al., 2007).

**Tabla 3.-** Características fenotípicas diacríticas del género *Gallibacterium*. Biovar (bv) haemolytica representa los biovares 1, 4, 11, 12, 15, 17-20, 22 y 24 del complejo (*P. haemolytica*)- *A. salpingitis*. Genomoespecies 1 representa los biovares 5 y 8 y Genomoespecies 2 representa los biovares 8 y 9. Las características fueron evaluadas con: +, ≥90% de las cepas resultó positiva en 1-2 días; (+), ≥90% de las cepas dio positivo en 3-14 días; -, ≤10% de las cepas resultó positiva tras 14 días; d, 11-89% de las cepas dio positivo.

Tomada de Christensen et al., 2003.

Character	<i>G. anatis</i> bv. haemolytica	<i>G. anatis</i> bv. anatis	<i>Gallibacterium</i> genomoespecies 1	<i>Gallibacterium</i> genomoespecies 2
Haemolysis	+	-	+	+
Production of acid from:				
(-)D-Arabinose	(+)	-	(+)	d
(+)L-Arabinose	-	-	d	d
m-Inositol	d	d	-	d
(-)D-Sorbitol	d	d	-	-
(-)L-Fucose	(+)	-	+/(+)	d
Maltose	d	-	+	+
Trehalose	d	+	+	d
Dextrin	d	-	+/(+)	+

### 3 PATOLOGÍA

Este microorganismo ha sido relacionado con diferentes patologías de aves, incluidas septicemia, ooporitis, degeneración folicular, salpingitis, peritonitis, enteritis y diferentes lesiones del tracto respiratorio (Kjos-Hansesen, 1950; Kohlert, 1968; Mráz et al., 1976; Gerlach, 1977; Matthes y Hanschke, 1977; Mushin et al., 1980; Bisgaard y Dam, 1981; Shaw et al., 1990; Mirle et al., 1991; Bojensen et al., 2003a; Bojensen et al., 2003b; B Jordan et al., 2005; Vazquez et al., 2006). Aunque también ha sido aislado de aves sanas (Harry, 1962; Bisgaard 1977; Mushin et al., 1980; Bojensen et al., 2003). Su potencial patogénico no está aun comprendido.

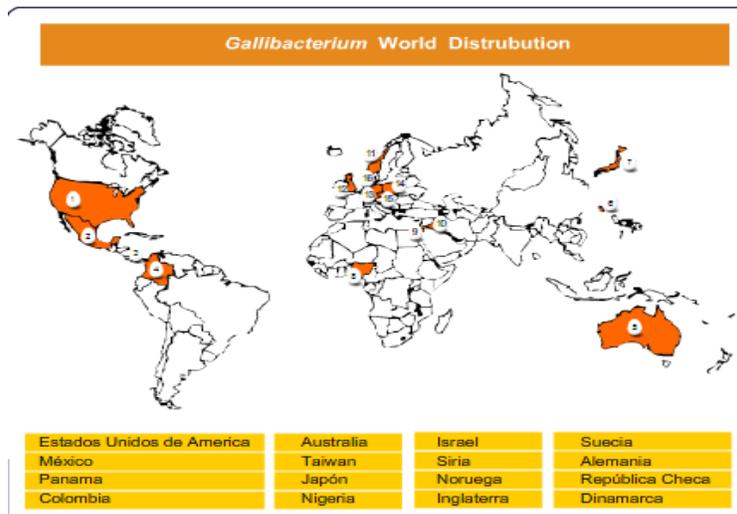
Su presencia en aves sanas nos supone su existencia en la flora bacteriana normal, y es probable que el desarrollo patógeno se dé solo bajo determinadas

circunstancias. O que se trata de una bacteria oportunista, capaz de iniciar la enfermedad cuando el sistema inmune se encuentra deprimido.

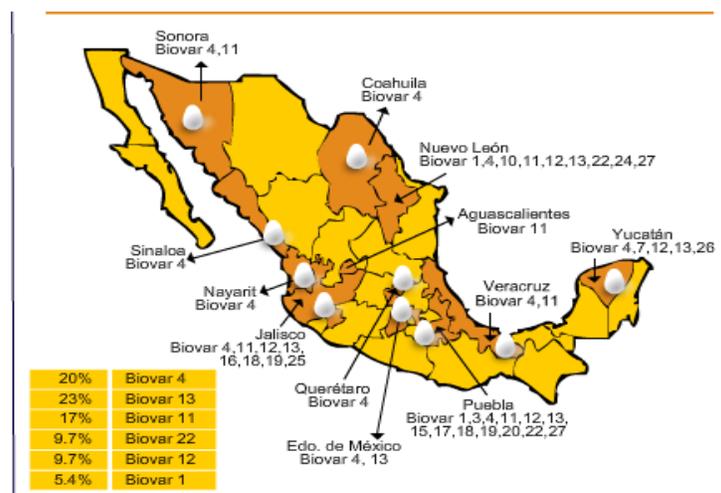
## 4 EPIDEMIOLOGIA.

### 4.1 Distribución en el mundo.

En el mundo se ha identificado a *G. anatis* en avifauna local y en gallinas ponedoras en 16 países en casi todos los continentes. Se ha encontrado como flora indígena así como en casos que presentan patología (Fig. 5).



**Figura 5.** Distribución Mundial de *G.anatis* (hasta 2006). Se enlistan los 16 países donde ha sido reportado. <http://www.gallibacterium-anatis.com.mx>



**Figura 6.-** Distribución de *G. anatis* en México. Se ha identificado en 11 estados. En los estados de Puebla y Nuevo León se ha identificado el mayor número de biovares. <http://www.gallibacterium-anatis.com.mx>

#### **4.2 Distribución en México.**

En México se ha detectado la presencia de 15 diferentes biovares (Fig. 6) de los 24 identificados, a su vez se incluyeron 3 nuevos biovares a la clasificación original, se les asignó como biovares 25, 26 y 27, únicamente reportados en México. De los biovares identificados, los 3 más predominantes son: el Biovar 13 presente en el 23% de los casos; el Biovar 4 (cabe recordar que la cepa 12656-12 liver pertenece a este biovar) presente en un 20% de los casos y el biovar 13 presente en el 17% (Fig. 6).

## 5 ANTECEDENTES.

No hay trabajos previos en la bibliografía que estudien la respuesta a estrés por hierro en *G. anatis*. Sin embargo hay trabajos que abordan diferentes factores de virulencia de esta bacteria:

**García-Gómez et al., 2005.** Obtuvieron y caracterizaron diferentes metaloproteasas secretadas al sobrenadante del cultivo por cepas de campo y de referencia de *G. anatis*; observaron proteínas de más de 100kDa de peso molecular que presentaron actividad proteolítica. Su actividad se observaba en pH alcalino y se veía inhibida en presencia de EDTA. Su actividad fue estable hasta los 50°C, las proteasas eran capaces de degradar IgG de pollo tras 24 horas de incubación. Las metaloproteasas secretadas podrían jugar un rol importante en el proceso de colonización bacteriana y el posterior desarrollo de una patogenicia.

**Zepeda et al., 2009.** Determinaron la actividad hemoaglutinante de 7 cepas de referencia, 9 cepas mexicanas y 3 aislamientos daneses de *Gallibacterium*, mediante el uso de eritrocitos frescos de diferentes especies: pollo (de engorda, gallos y gallinas de postura), pavo, paloma, codorniz, pato, halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*), gorrión (*Carpodarcus mexicanus*) bovino, oveja, caballo, perro, conejo, cerdo y humano (grupos A, B, AB, y O, Rh<sup>+</sup>). Sus resultados indicaron que algunas cepas de *Gallibacterium* son capaces de aglutinar eritrocitos de ave, de mamífero o ambos. Sin embargo los mecanismos y estructuras inherentes a este proceso no se conocen.

**Bojensen et al., 2011.** Identificaron y caracterizaron la resistencia a tetraciclina en 22 cepas de *G. anatis* usando primers específicos para *tet* (A, B, C, D, E, G, H, K, L, M y O), observando la prevalencia de *tet* (B) en las cepas mexicanas y danesas. Sin embargo, cerca del 41% de las cepas que presentan resistencia no pudieron ser asignadas a algún genotipo del gen *tet*. Se comprobó que *tet* es común en *G. anatis* aisladas de pollos de diferentes sistemas de producción y localidades.

**Kristensen et al., 2010.** Caracterizaron la producción de citotoxinas activas contra diferentes variedades de células de pollo, como los macrófagos (HD11), describiendo una toxina que denominaron GtxA y determinaron su homología con toxinas RTX presentes en otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Hay que destacar que la cepa utilizada en este estudio fue 12656-12 liver, y la presencia de esta citotoxina fue asociada con su capacidad hemolítica.

**Kristensen et al., 2011 (en prensa).** Investigaron las bases de la variación en la actividad hemolítica entre las diferentes especies de *Gallibacterium* y sus cepas. Usando PCR y Blotting encontraron que GtxA está ausente en las cepas no hemolíticas. Sin embargo en *G. anatis* se observó su presencia en los biovares hemolíticos y no hemolíticos. Sin embargo en las variantes no hemolíticas *gtxA* está interrumpido por la inserción de otra secuencia. También se observó la existencia de un nuevo sistema de secreción necesaria para la exportación de GtxA. Comprobando así que las diferencias en las propiedades hemolíticas de las cepas pueden explicarse por las diferencias genotípicas y su expresión diferencial.

**Vaca et al., (2011)** Evaluaron la capacidad de *G. anatis* para adherirse a superficies inertes como posible mecanismo para la formación de una biopelícula, así como la participación de proteínas en el proceso de formación de la biopelícula.

## 6 JUSTIFICACIÓN.

La industria avícola genera en México aproximadamente 1 millón 140 mil empleos, de los cuales 190 mil son directos y 950 mil indirectos, con una amplia distribución en las zonas rurales; sin embargo, estos datos solo representan a la industria formalmente establecida, no hay datos exactos acerca de los productores que no se encuentran en el padrón de la Asociación Nacional de Avicultores, así como de la práctica avícola para el autoconsumo.

En México la producción avícola en el año 2009 fue de: 2,354 millones de toneladas de huevo; 2,789 millones de toneladas de carne de pollo y 11 mil 422 toneladas de carne de pavo, este sector industrial aporta el 63.5% del PIB del sector pecuario y este a su vez participa con el 38.5% del PIB nacional.

Por lo que las enfermedades que afecten a las aves representan una seria amenaza para este sector. Por ejemplo; durante la producción de huevo (del que México es el quinto productor mundial) la aparición de una patología causada por *G. anatis* aun en estado subclínico afecta a las aves disminuyendo la postura de huevo de un 12 a un 70%, lo que equivaldría, si suponemos una afectación de solo el 10% de la industria una pérdida de 230 millones de toneladas de huevo. Es de sumo interés proteger actividades que participan de manera directa en la producción de alimentos de la canasta básica: en México se calcula que el consumo per cápita de huevo es de 22.19 Kg al año. Por consiguiente es necesario obtener información de organismos patógenos que representan una fuerte amenaza a la industria avícola.

La deficiencia de Hierro puede iniciar la expresión de diferentes factores de virulencia en las bacterias tales como receptores de membrana externa o la secreción de toxinas por mencionar algunos. En *G. anatis* no ha sido estudiada la respuesta a estrés por Fe, por lo que se tiene como objetivo caracterizar los cambios subsecuentes a la deficiencia por Fe.

## 7 OBJETIVOS.

### Objetivo general:

- Caracterizar la respuesta a estrés por Fe en *G. anatis*.

### Objetivos particulares:

- Determinar el efecto de la deficiencia de Fe en el crecimiento bacteriano.
- Observar las diferencias entre los patrones proteicos de cultivos en condiciones normales y cultivos con deficiencia de Fe.
- Identificar la presencia de proteínas involucradas en la adquisición de Fe realizando pruebas de Inmunoreconocimiento.
- Corroborar la expresión *in vivo* de las proteínas de membrana externa mediante pruebas de inmunoreconocimiento.
- Determinar la identidad de alguna(as) de la(as) proteína(s) inducidas por estrés por Fe mediante el análisis de fragmentos obtenidos por análisis MALDI-TOF.
- Determinar la posible secreción de compuestos quelantes (posiblemente sideróforos) al medio de cultivo restringido en hierro.

## **8 MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **8.1 Bacteria.**

Se trabajo con *G. anatis* 1265612-liver (Biovar 4) aislada de pollo con signos clínicos de septicemia en Dinamarca (*Bojensen et al., 2003a*), forma parte del cepario del laboratorio. Como control positivo en la prueba de sideróforos se utilizó a *Pseudomonas aeruginosa* del cepario del laboratorio.,

### **8.2 Material.**

Para eliminar el exceso de hierro en el material a emplear, éste se sumergió durante toda la noche (TN) en un recipiente con una solución de Ethylnediaminetetraacetic acid trisodium salt (EDTA) al 0.5%. Posteriormente el material se enjuago con H<sub>2</sub>O desionizada. (*Zhao et al., 1995*).

### **8.3 Crecimiento de la bacteria.**

Para el crecimiento de la bacteria se preparó medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) con H<sub>2</sub>O desionizada en el material previamente tratado con EDTA. Se realizo un precultivo de la bacteria en un tubo de ensaye con 10ml de BHI y se dejo creciendo en agitación (200 rpm) a 37°C durante 24 horas. Este precultivo se utilizo para inocular (1% inoculo) matraces (tratados con EDTA) con 100-250ml de BHI.

### **8.4 Cinética de crecimiento bacteriano.**

Matraces tratados con EDTA y con BHI se inocularon con un cultivo de TN al 1%. Se incubaron en agitación a 200 rpm y 37°C. Se obtuvieron las densidades ópticas cada hora. Cuando se alcanzo una densidad óptica de 0.06-0.09<sub>600</sub> se agrego al cultivo bacteriano el quelante de hierro 2,2-Bipyridil para una concentración final de 0.25mM (*Larios, 2006*). Las mediciones se realizaron a partir de las 2 horas hasta las 12 horas, adicionalmente se midió también a las 24 horas.

Un cultivo bacteriano al que no se le agrego 2,2-Bipyridil se uso como control. Los cultivos de 24 horas de crecimiento se centrifugaron a 11000 rpm durante 20 minutos para obtener la pastilla celular. Las células empastilladas se resuspendieron en un volumen adecuado de Tris-HCl 20mM pH 7.5 para su uso inmediato. O se guardaron sin líquido en congelación a -4°C para su almacenamiento.

### **8.5 Obtención de proteínas de membrana externa (OMP's)**

Una vez obtenidas las células se resuspendieron en 1ml de HEPES 10mM pH 7.4 adicionado con lisozima (0.5mg/ml). Se incubaron 15 minutos a 37°C a 200 rpm. Posteriormente las células se sonicaron durante 8 ciclos (10 segundos de sonicación y 10 segundos de pausa) todo el tiempo en hielo. Después de la sonicación las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 2 minutos para desechar las células que no se rompieron. El sobrenadante se centrifugo a 14000 rpm durante 30 minutos. La pastilla se resuspendió en 200µl de HEPES 10mM y se agrego 200 µl de HEPES 10mM con 2% de Tritón X-100, las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 30 minutos. Se lavaron sin resuspender en 500 µl de HEPES, nuevamente se centrifugo 2 minutos a 14000 rpm, la pastilla se guardo en congelación sin líquido. (*Blackall et al., 1990*).

### **8.6 Obtención de proteínas secretadas.**

El sobrenadante libre de células obtenido tras 24 horas de crecimiento se precipito utilizando Sulfato de amonio al 70% de saturación, se mantuvo en refrigeración a 4°C mínimo 2 horas o durante TN (*Deneer y Potter, 1989b*). Las proteínas que se precipitaron, se recuperaron por centrifugación a 11 000 rpm durante 10 minutos, la pastilla se resuspendió en un volumen mínimo de Tris-Hcl 20mM pH 7.5.

### **8.7 Electroforesis.**

Para visualizar las OMP's que se expresan diferencialmente se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

al 10% bajo condiciones desnaturalizantes desarrollada por Laemmli en 1970. La técnica se uso con geles separadores al 10% (Tabla 4), cargando en cada pozo 20-25  $\mu$ l de muestra, dejando un carril para el marcador de peso molecular (10-250 kDa). Se añadió 5 $\mu$ l de buffer de muestra y 1.5  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol, se procedió a mezclar y se coloco en baño María durante 5 minutos a partir de que el agua entro a ebullición. La electroforesis se realizo en una cámara vertical a 90-95 volts durante 2 horas y media.

**Tabla 4.** Gel de poliacrilamida.

<b>Gel separador 10%</b>	<b>MI</b>
Agua destilada	4.0
Acrilamida 30%, bis-acrilamida 2.7%	3.3
Tris-HCl 1.5M, pH 8.8	2.5
SDS 10%	0.1
NaCl 20%	0.2
PSA	0.04
TEMED	0.01
<hr/>	
<b>Gel concentrador</b>	
Agua destilada	1.4
Acrilamida 30%, bis-acrilamida 2.7%	0.33
Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	0.25
SDS 10%	0.02
PSA	0.02
TEMED	0.01

Al término de la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de Azul de Coomasie R-250 0.1%, metanol 40% y acido acético 10% hasta observar una coloración uniforme y consistente, posteriormente el exceso de colorante se elimino utilizando una solución de acido acético al 10 %.

### **8.8 Análisis mediante Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI-TOF)**

Se realizaron geles de poliacrilamida al 12% usando las muestras de OMP's de cultivos adicionados con quelante. La banda de interés fue cortada y electroeluida, posteriormente se realizó una digestión con tripsina, los polipéptidos fueron sometidos a análisis MALDI-TOF en el Instituto de Salud Pública de Cuernavaca, Morelos.

### **8.9 Inmunoreconocimiento.**

Para determinar si las proteínas que se expresan por estrés por hierro eran inmunogénicas se separaron electroforéticamente en 2 geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%. Uno de los geles se tiñó con el colorante de Coomassie utilizándose para observar el patrón de proteínas, el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 100V, 270mA constantes por 120 minutos. Una vez transferidas las proteínas, las membranas se bloquearon con PBS-Tween con 2.5% de leche durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación, o guardados en refrigeración a 4°C durante TN. Posteriormente las membranas se lavaron con PBS-Tween 3 veces durante 10 minutos en agitación. Después de haber sido lavadas se incubaron con diferentes antisueros primarios; (Tabla 5) durante 2 horas en agitación, o en refrigeración TN, en seguida se lavo la membrana de la misma manera con PBS-Tween, y se agregó el 2° anticuerpo (Tabla 6) marcado con peroxidasa. Se incubo en agitación 2 horas o TN en refrigeración.

La reacción antígeno-anticuerpo se puso en evidencia usando una solución de 10ml de Acido fosfórico con pH 7.4 con diamino benzidina y 500µl de solución Cloruro de Níquel/Cloruro de Cobalto. La membrana se colocó en esta solución y se agregó 20µl de Peróxido de Hidrogeno. Se colocó en agitación hasta que se observó la reacción. Se detuvo la reacción secando las membranas (*Towbin et al., 1979*).

**Tabla 5.** Listado de antisueros primarios utilizados.

<b>Antisueros primarios</b>	<b>Concentración</b>
Suero de aves infectadas con <i>Avibacterium paragallinarum</i>	1:1000
Suero de aves infectadas con <i>G. anatis</i> (Donado por el Dr. Víctor M. Pérez Márquez, BIOVETSA, Tehuacán, Puebla.)	1:1000
Anti-TbpB de <i>Av. paragallinarum</i>	1:1000
Anti-TbpA de <i>Av. paragallinarum</i>	1:1000
Anti-68KDa implicada en transporte de Fe	1:1000
Anti-TbpB soluble de 60KDa <i>Av. paragallinarum</i>	1:1000

**Tabla 6.** Listado de antisueros secundarios utilizados.

<b>Antisueros secundarios</b>	<b>Concentración</b>
IgG anti-pollo acoplado con peroxidasa	1:1000
IgG anti-rata acoplado con peroxidasa	1:1000

## **8.10 Detección de sideróforos por espectrofotometría.**

### **8.10.1 Crecimiento en Medio Mínimo.**

Para la detección de sideróforos se requirió crecer a las bacterias, *G. anatis* y *Pseudomonas aeruginosa*, en un medio mínimo, para esto se utilizo el medio M9 y se adecuo para el crecimiento de la bacteria. (Tabla 7). Se prepararon tubos de ensaye con 5 y 10ml de medio M9 modificado. El material recibió el tratamiento anteriormente descrito para la eliminación de Fe. Se utilizo un precultivo en BHI de TN para inocular (inoculo al 1%) los tubos. Se incubo en agitación a 200 rpm a 37°C durante 48 horas.

Se utilizo a *P. aeruginosa* como control positivo, y como control negativo se utilizo un tubo con adición del quelante a 0.25mM de concentración final. El quelante 2,2-Bipyridil fue adicionado una vez que los cultivos alcanzaron las condiciones previamente descritas.

**Tabla 7.** Medio mínimo M9 modificado, cantidades para preparar 100ml, la glucosa y los casaminoácidos se esterilizaron por separado.

<b>Reactivos</b>	<b>gr</b>
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	0.7
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>5</sub></i>	0.3
<i>Na<sub>3</sub>Citrato</i>	0.1
<i>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</i>	0.01
<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	0.2
<i>Polipeptona</i>	0.1
<i>Glucosa</i>	0.2
<i>Casaminoacidos</i>	0.15

Se realizaron 6 cultivos;

- Blanco: se sometió a las mismas condiciones que los demás, pero no se agrego ningún inóculo,
- *P. aeruginosa* control: con un inóculo al 1% pero sin la adición del quelante.
- *P. aeruginosa* con quelante: se agrego el quelante a una concentración final de 0.25mM.
- *G. anatis* control: con un inóculo al 1% pero sin la adición del quelante.
- *G. anatis* con quelante: se agrego el quelante a una concentración final de 0.25mM.

### **8.10.2 Prueba de FeCl<sub>3</sub> para detectar sideróforos.**

Se obtuvieron los sobrenadantes libres de células. Las células se eliminaron por centrifugación a 14000 rpm durante 5 minutos, adicionalmente se filtro el sobrenadante utilizando filtros de nitrocelulosa con una apertura de 0.45 µm. 2ml de este sobrenadante fue mezclado con 2ml de solución de FeCl<sub>3</sub> al 2% (p/v). Posteriormente se realizaron lecturas en un espectrofotómetro modelo GENOME de la marca Jenway desde los 400nm hasta los 600 nm midiendo cada 10 nm (Neilands, 1981).

## **8.11 Ensayo de OMP's que unen hemoglobina de *Gallus gallus*.**

### **8.11.1 Obtención de la sangre de Pollo (*Gallus gallus*)**

Se obtuvo sangre por punción en la arteria yugular o en la arteria femoral. Como anticoagulante se utilizó Citrato de Sodio dihidratado a una concentración final de 0.5%.

### **8.11.2 Purificación de Hemoglobina.**

La hemoglobina se purificó utilizando la metodología descrita por Drabkin en 1946. Se adicionó NaCl a la sangre hasta obtener una concentración de 0.9% y se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm y se retiró el sobrenadante.

La pastilla celular se resuspendió en una solución de NaCl al 1.2% y  $\text{AlCl}_3$  0.0025M. Se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm y se retiró el sobrenadante. Se repitió el procedimiento 3 veces para finalmente obtener la pastilla de eritrocitos.

Los eritrocitos se lisaron resuspendiéndolos en 2 volúmenes de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada durante toda la noche en refrigeración. Se eliminaron las membranas celulares mediante centrifugación durante 5 minutos a 2000 rpm y se recuperó el sobrenadante a un tubo nuevo.

Se realizó un fraccionamiento del sobrenadante obtenido utilizando Sulfato de amonio. Para esto se agregó sulfato de amonio hasta llegar a 35% de saturación, se almacenó en refrigeración toda la noche. Las proteínas que precipitaron se eliminaron por centrifugación a 11 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y le fue adicionado sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración de 50% de saturación y se almacenó en refrigeración toda la noche. Se repitió el procedimiento hasta alcanzar una concentración final de 70% de saturación. Las proteínas que precipitaron a 70% de saturación se colectaron por centrifugación a 11 000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó esta fracción de proteínas y se guardó en congelación a  $-20^\circ\text{C}$ , posteriormente se liofilizaron para su almacenamiento y transporte.

### 8.11.3 Ensayo de adhesión de OMP`s a hemoglobina de *G. gallus*.

Se diluyo hemoglobina de pollo en buffer de carbonato 0.1M a pH 9.6 hasta obtener una concentración final de 50µg en 100µl. Esta solución se utilizó para acoplar 2 cajas de ELISA, exceptuando las 2 primeras filas a las que solo se agrego buffer de carbonato 0.1M pH 9.6 sirviendo como control negativo. Las placas se incubaron en refrigeración a 4°C durante TN.

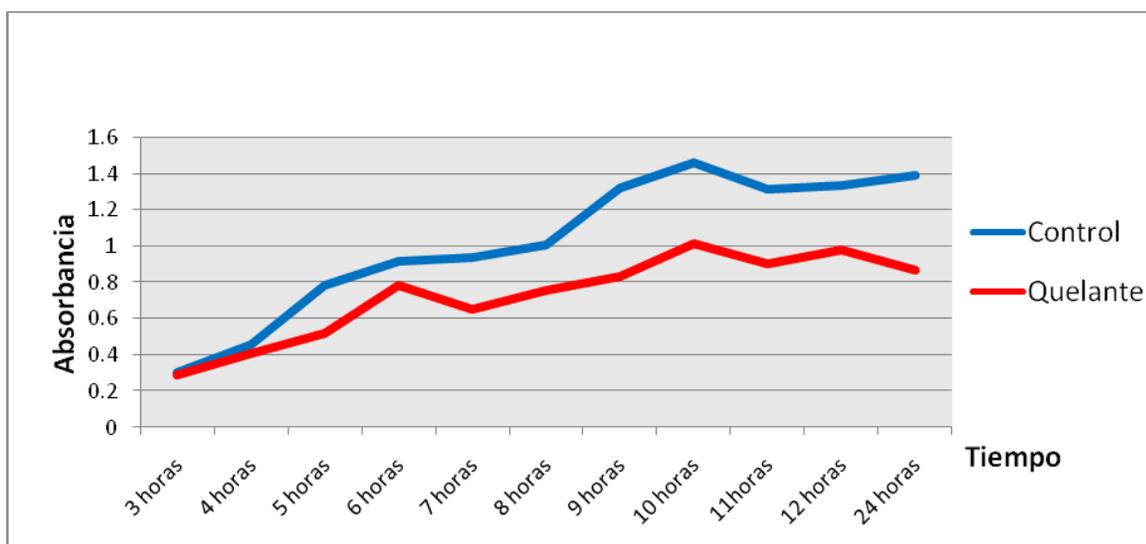
Se retiro la solución de hemoglobina y las placas se lavaron con 200 µl de PBS tres veces para eliminar la hemoglobina que no se unió. Posteriormente se añadió una solución de caseína al 5% para bloquear y se incubo por una hora a 37°C. Se elimino la caseína excedente lavando 5 veces con PBS. 200 µl de las OMP`s de interés fueron diluidas en 10ml de PBS, agregándose 50 µl de esta solución a cada pozo. Se incubo por 3 horas a 37°C. Posteriormente se lavo 5 veces con PBS para remover cualquier OMP que no se hubiera acoplado a la hemoglobina.

Para liberar las OMP adheridas a hemoglobina se añadió a cada pozo 100 µl de SDS al 1% en PBS. Las filas que fungieron como control negativo fueron colectadas por separado. Las OMP`s recuperadas se concentraron por precipitación con Acido tricloroacetico al 10% durante toda la noche. Las OMP`s que precipitaron se colectaron por centrifugación a 11000 rpm durante 30 minutos. La pastilla se lavo con acetona fría para remover el acido tricloroacetico. Se centrifugo 10 minutos a 11000 rpm (*Lo et al., 2007*). Se seco la pastilla a temperatura ambiente. Se resuspendió en un volumen mínimo de Tris-HCl 20mM pH 7.5 y se almaceno en congelación hasta su uso. Para observar las proteínas que se unieron a la hemoglobina se corrió una muestra en un gel SDS Page al 10%.

## 9 RESULTADOS.

### 9.1 Cinética de crecimiento bacteriano.

La adición del quelante de hierro tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de *G. anatis* (Grafica 1). El medio de cultivo utilizado como control mostró >75% más de crecimiento con respecto al cultivo que fue suplementado con el quelante después de 24 horas de incubación.

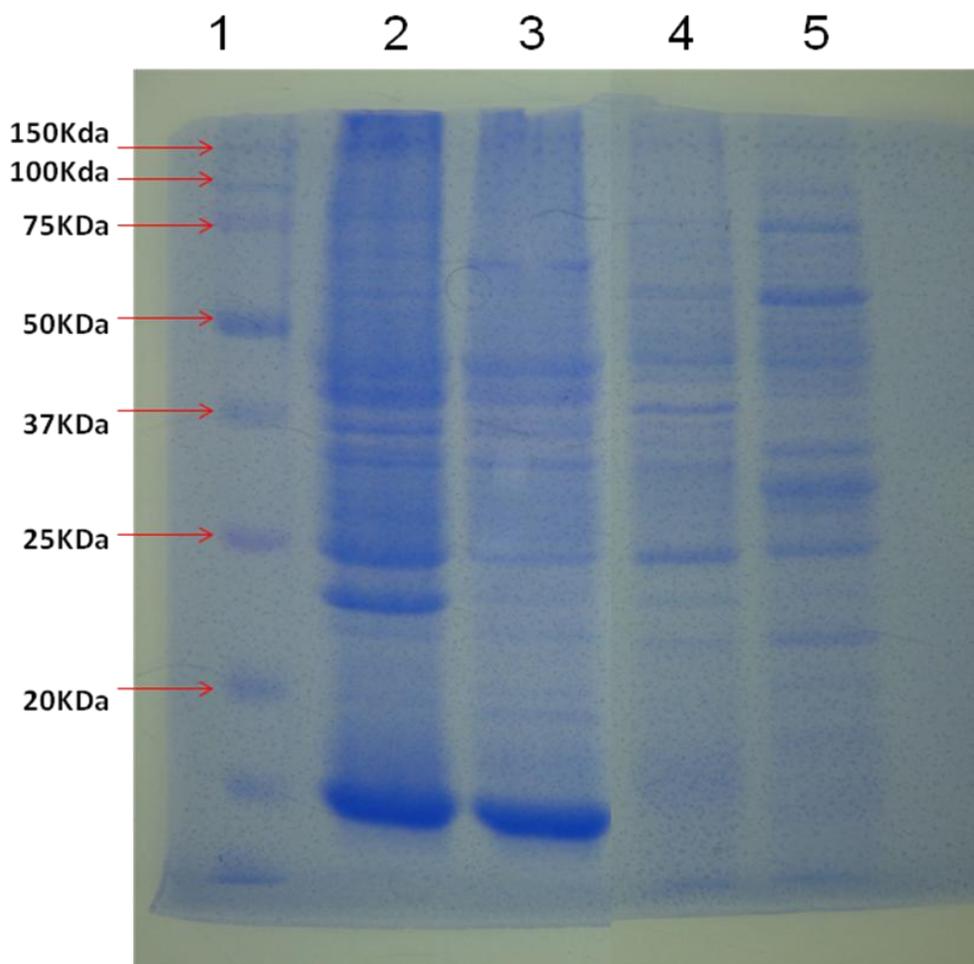


**Grafica 1.** Cinética de crecimiento bacteriano en concentraciones normales (control) o niveles bajos de hierro (quelante) por presencia del agente quelante de Fe 2,2-Bipyridil.

### 9.2 Proteínas de membrana externa y proteínas secretadas.

Al crecer *G. anatis* en presencia del agente quelante se observó la disminución en la expresión en dos OMP's de 25 y 36 kDa (Fig. 7, carril 2 y 3). Y la expresión se vio suprimida en OMP's de 37 y 23kDa (Fig. 7, carril 2 y 3) obtenidas de cultivos con quelante. De forma evidente una OMP de 13kDa (Fig. 7, carril 2 y 3) no mostró cambio alguno en su expresión pese a la adición del quelante. Así mismo se observó la expresión de una OMP de 70kDa (Fig. 7, carril 3) que no se visualizaba en condiciones normales de hierro.

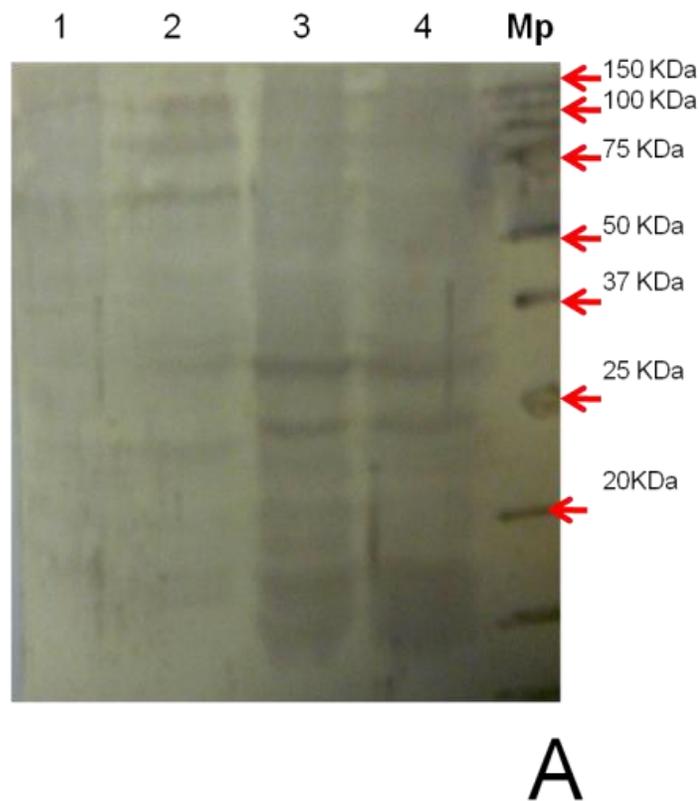
Los cambios en la expresión diferencial entre proteínas secretadas y OMP's fueron más evidentes en las primeras (Fig. 7). En las proteínas secretadas se pudo observar la supresión, en cultivos suplementados con el quelante, de la expresión en proteínas de 39 (Fig. 7, carril 4 y 5). Contrariamente proteínas secretadas de 76, 58 y 22kDa incrementaron su expresión (Fig. 7, carril 4 y 5). Muchas proteínas secretadas no mostraron cambios evidentes en su expresión, tal es el caso de las proteínas de 40 y 25kDa (Fig. 7, carril 4 y 5). Adicionalmente se observo la expresión de una proteína de 30kDa (Fig. 7, carril 5) que no se presenta en las proteínas secretadas del cultivo control.



**Figura 7.** Patrón de proteínas de membrana externa (OMP's) de *G. anatis* 12656-12 liver en gel de Poliacrilamida-SDS al 10%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2 OMP's del control, carril 3 OMP's del cultivo bacteriano crecido en presencia de 2,2-Bipyridil, carril 4 proteínas secretadas del control y carril 5 proteínas secretadas del cultivo bacteriano crecido en presencia de 2,2-Bipyridil.

### 9.3 Inmunoreconocimiento

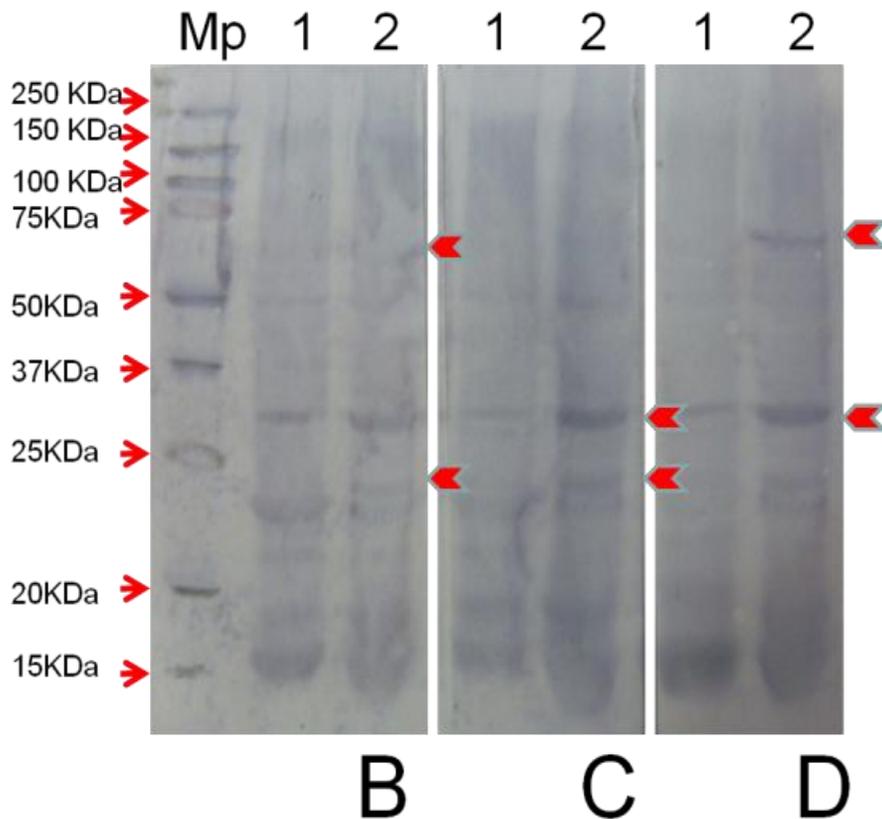
Al emplear sueros de aves desafiadas con *G. anatis* se observó reconocimiento de OMP's (Fig. 8, carril 1 y 2) en ambos grupos: Control y quelante. Adicionalmente en las OMP's obtenidas del cultivo bacteriano crecido en presencia del quelante se pudo observar el reconocimiento de una OMP de 70kDa (Fig. 8, carril 2) tal reconocimiento no es observado en las OMP's del cultivo control. Empleando el mismo suero en las proteínas secretadas se observó el reconocimiento de proteínas de 30, 25, 17 y 15kDa en muestras del cultivo control y con quelante. (Fig. 8, carril 3 y 4.) No se observaron diferencias en proteínas secretadas.



**Figura 8.** Inmunoreconocimiento de las OMP's y proteínas secretadas expresadas diferencialmente debido a estrés por hierro, usando suero de aves infectadas con *G. anatis* (A); 1) OMP's del cultivo control sin 2,2-Bipyridil, 2) OMP's del cultivo con 2,2-Dipyridil, 3) proteínas secretadas del control sin quelante, 4) proteínas secretadas del cultivo con quelante y Mp: marcador de peso molecular.

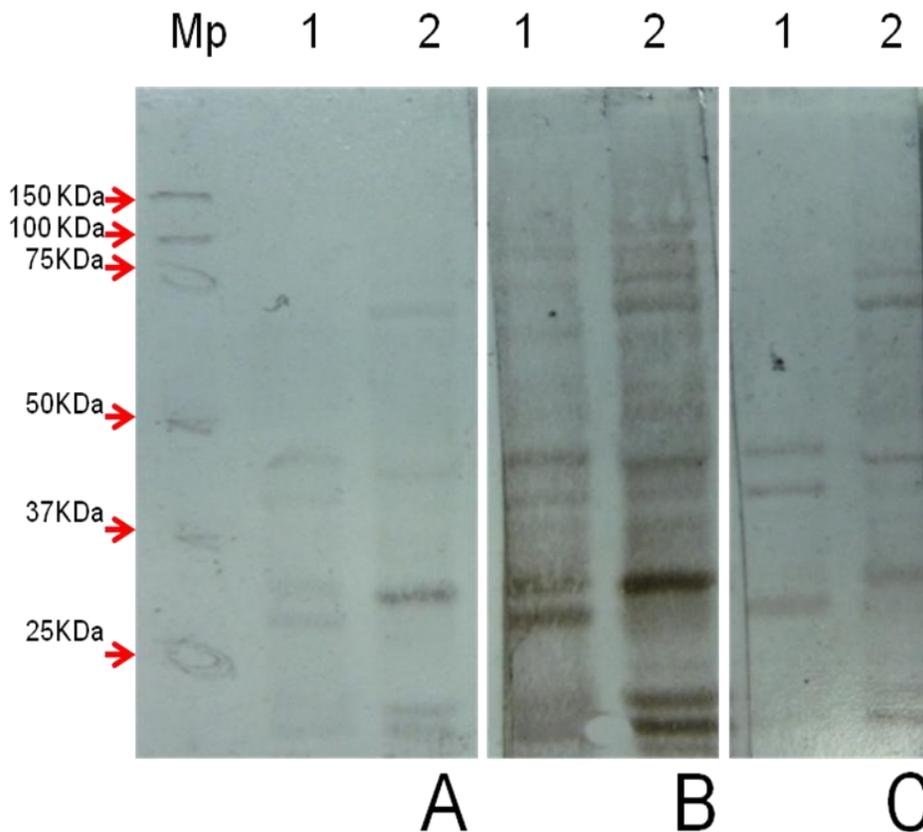
Se emplearon sueros anti TbpA (Fig. 9, B) y anti TbpB (Fig. 9, C) en OMP's del grupo control y OMP's del cultivo con 2,2-Dipyridil, observándose inmunoreconocimiento, sin embargo ninguna de las bandas observadas corresponde a los pesos moleculares reportados para TbpA y TbpB.

Al emplear suero contra una proteína de 68KDa (Fig. 9, D) de *Av. paragallinarum* involucrada en el transporte de Fe se observo reconocimiento diferencial en una OMP de 70kDa (Fig. 9, D: carril 2) obtenida de cultivos adicionados con el quelante de Fe además de el reconocimiento en otras OMP's de 30 y 13 kDa en ambas muestras de OMP's (Fig. 9, D: carril 1 y 2).



**Figura 9.** Inmunoreconocimiento de las OMP's expresadas diferencialmente debido a estrés por hierro, utilizando suero anti-TbpB (B), anti-TbPA(C) y suero contra una proteína de 68kDa secretada que participa en la captación de Fe (D), todos sueros derivados de *Av. paragallinarum*. 1) OMP's del cultivo control sin 2,2-Bipyridil, 2) OMP's del cultivo con 2,2-Dipyridil y Mp: marcador de peso molecular.

Al utilizar anti suero contra TbpB soluble de *Av. Paragallinarum* (Fig. 10, A) se observó el reconocimiento diferencial de una banda de aproximadamente 70kDa en las OMP's (Fig. 10, A: carril 2) obtenidas del cultivo adicionado con quelante de Fe, también hubo reconocimiento en OMP's de 30 kDa y 2 OMP's menores a 25kDa (Fig. 10 A: carril 1 y 2). Además una OMP de aproximadamente 29kDa solo fue reconocida en las OMP's del grupo control. (Fig. 10. B: carril 2)



**Figura 10.** Inmunoreconocimiento de las OMP's expresadas diferencialmente debido a estrés por Fe: utilizando suero contra TbpB soluble de *Av. paragallinarum* (A), suero contra *Gallibacterium anatis* (B) y suero contra *Av. paragallinarum* (C). 1: OMP's del cultivo control sin 2,2-Dipyridil, 2: OMP's del cultivo con 2,2-Bipyridil

Al emplear sueros de aves infectadas con *G. anatis* (Fig. 10, B) y *Av. paragallinarum* (Fig. 10, C), se observó reacción cruzada para OMP's de 70, 40 Y 30kDa en muestras del cultivo con quelante (Fig. 10, B y C: carril 2). La OMP de 70kDa (Fig. 10, B y C: carril 2) solo fue reconocida en OMP's del cultivo con quelante

#### 9.4 MALDI-TOF

La OMP de aproximadamente 70kDa que se sobre expresaba por estrés por deficiencia de hierro y que fue reconocida por los anti sueros de una proteína de 60kDa de *Av. paragallinarum* involucrada en el transporte de Fe, anti suero contra TbpB soluble de *Av. paragallinarum* y sueros de aves infectadas con *G. anatis* y *Av. paragallinarum*, fue sometida a un análisis tipo MALDI-TOF para conocer su identidad. Los fragmentos trípticos obtenidos (Tabla 8) fueron ingresados a una base de datos donde indicaron similitud con la proteína CirA de *Manheimia succiniproducens* (Fig. 11) 4 de los fragmentos trípticos secuenciados de la proteína de 70 kDa (Tabla 8) cubren el 8% de la secuencia de residuos de la proteína CirA (Fig. 11).

```

1  MKKLIKISLLP  LTAFVAATVH  AETLDTIDVV  SDNFSPQAEN  IAAKGVTKVR
51  QATKMSDVIR  GVPGVNVNGA  RSTVERYNIR  GVSEEYLNVT  VDGARQNGYS
101 FHHNGNYGID  PEILKRVDID  VGSNSVSTGA  GSLGGSMKFE  TVDAADMLEE
151 GENFGGKVKY  GYGSNGNSNQ  GTAMLYGRRG  NLDLLGYFNY  RHQRDGEDGN
201 GLKNKNKGHL  SNYLFKTKYN  ISNEQWIKAS  AERYTNTALS  CYRANMGMCL
251 GDVPQPGEPG  YVETNHGKAY  TELTRKTYTL  SYGFNPEHNN  WVNIKANAYN
301 TETEVA SMGS  PKSKVRTVGG  TLSNTSEFEL  GVTSHQFLVG  GEYYNSKAQA
351 LGSVNNAYVA  DMDSTSVYVE  DKIALGNLMI  IPGVRFDHYK  ADLASDFDKS
401 YHRFSKALGL  KYSLTDNLIV  FANYTELFKG  PDAGEIYLRG  TRAYDGNLEA
451 ARGDNKEVGF  SYAKDGLFSD  IDGFSFTAKY  FKTDYDNINQ  TVSASRCVNT
501 SAISSGSIYC  NLGKVDIKGV  EAQAKYRYED  TSFVSRYARA  RSEQKSTGLA
551 AFADTGDRYN  FTLSQYISSA  QVELGWNTMY  VRAIDVDDST  LKESYAVSNM
601 YVSWSPAQAK  GLELTFGIDN  IFDKAYKDHS  TQYYGSVDLD  PGRNYKLSVS
651 YKF

```

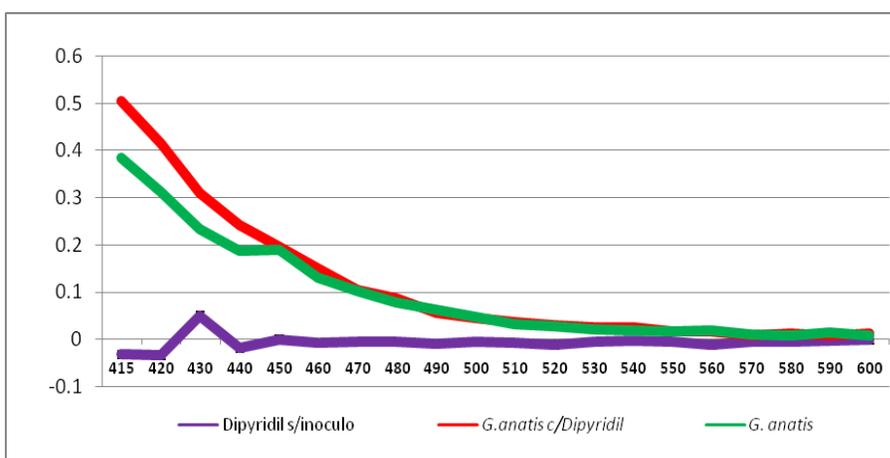
Figura 11. Secuencia de residuos de la proteína CirA de *M.a succiniproducens* en la que se muestran en rojo los fragmentos peptídicos identificados por MALDI-TOF a partir de la OMP de 70kDa sobreexpresada por estrés por Fe.

Tabla 8. Secuencia de aminoácidos de los fragmentos trípticos de la OMP de 70KDa expresada diferencialmente en cultivos de *G. anatis* adicionados con el quelante 2,2-Dipyridil.

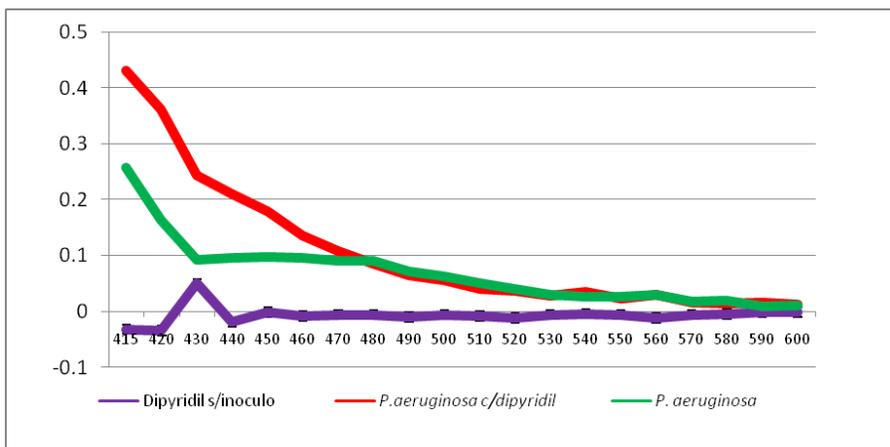
Masa mono isotrópica( Da)	Posición del aminoácido	Secuencia peptídica
442.6923	63-71	<b>PGVNVNGAR</b>
798.3784	81-95	<b>GVSEEYLNVTVDGAR</b>
540.2457	208-216	<b>GHL</b> <b>SNYLFK</b>
545.7786	430-439	<b>GPDAGEIYLR</b>

### 9.5 Detección de posibles sideróforos.

La presencia de un posible sideróforo en el sobrenadante de cultivo de *G. anatis* se puede deducir mediante la absorbancia presentada por el sobrenadante adicionado con  $\text{FeCl}_3$  (Grafica 2) de manera similar a como es observado en *P. aeruginosa* (Grafica 3). En los sobrenadantes de cultivo de *G. anatis* adicionados con el quelante (Grafica 2, c/Dypiridil) se observó una mayor absorbancia, en comparación los que no contenían dypiridyl, indicando la posible presencia de sideróforo(s).



**Grafica 2.** Detección de sideróforos por espectrofotometría. Curva de absorbancia de 400 a 600nm de los sobrenadantes de cultivos de *G. anatis* crecida en presencia/ausencia del quelante 2,2-Bipyridyl. Como control negativo se utilizó un cultivo sin inculo con 2,2-Bipyridyl.

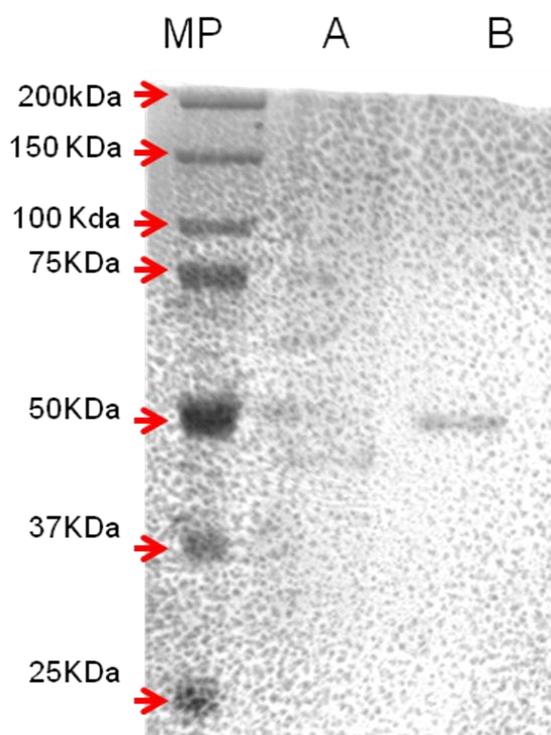


**Grafica 3.** Detección de sideróforos por espectrofotometría. Curva de absorbancia de 400 a 600nm de los sobrenadantes de cultivos de *P. aeruginosa* crecida en presencia/ausencia del quelante 2,2-Bipyridyl, Como control negativo se utilizó un cultivo sin inculo con 2,2-Bipyridyl.

Se descarto que el incremento en la absorbancia fuese producido por la adición del quelante utilizando medio de cultivo sin inóculo y con 2,2-Bypiridil. Su presencia no interfiere con la metodología (Grafica 2 y 3, Dypiridil s/inoculo).

### 9.6 Proteínas de Membrana externa que unen hemoglobina.

Una OMP de aproximadamente 50kDa fue observada en geles de poliacrilamida al 10% (Fig. 12, Carril B) después del ensayo de purificación con hemoglobina. Debido a que no se purificó el control, no es posible saber si esta proteína también se expresa en condiciones normales. Sin embargo en los inmunoreconocimientos fue observada de manera muy tenue utilizando el suero de aves infectadas con *G. anatis* (Fig. 10, B: carril 1) proveniente de los cultivos adicionados con el quelante.



**Figura 12.** Gel de poliacrilamida al 10% en el que se observa una proteína purificada de ~50kDa por unión a hemoglobina de pollo a partir de OMP's expresadas diferencialmente debido a estrés por Fe. Control negativo (A) y proteína purificada (B), marcador de peso molecular: Mp.

## 10 Discusión.

Los factores de virulencia, como ya se abordó antes, permiten la colonización y crecimiento de las bacterias en diferentes tejidos del hospedero. Entre los factores de virulencia encontramos la adquisición de nutrientes. El patógeno puede adquirir todos sus nutrientes que necesita de los tejidos del hospedero, excepto uno, el Fe (Ratlegde y Dover 2000). Este catión no se encuentra de manera libre sino que está asociado a proteínas de transporte y almacenamiento. Por esta razón es que los mecanismos utilizados para obtener hierro por un microorganismo patógeno son considerados un mecanismo de virulencia.

Las bacterias poseen reservas de Fe, que en el caso de *E. coli*, se han podido cuantificar en rangos que oscilan entre  $10^5$ - $10^6$  átomos de Fe por célula (Abdul-Tehrani et al, 1999). También se ha documentado que los niveles internos de Fe son mayores al 1.8% del peso seco de una bacteria (Rouf, 1964).

A excepción de algunos lactobacilos todos los microorganismos requieren de Fe para su crecimiento. Cuando *G. anatis* fue sometido a condiciones de estrés por falta de hierro presentó una disminución en su crecimiento, esto fue observado después de una hora de la adición del quelante. Después de 24 horas de crecimiento el cultivo mantenido en condiciones normales presentaba un 75% más de crecimiento. El tiempo de respuesta al cambio de las condiciones ambientales, en este caso por deficiencia de Fe, ha sido evaluado en otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*; Pulchalski, et al., en 2010 reportó la inducción de nuevas proteínas en *P. multocida* serotipo A3 después de 30 minutos de la adición del agente quelante 2,2-Bipyridil y Roehrig et al., en 2007 observaron la expresión de diferentes genes en *Manheimia haemolytica* a los 15, 30 y 60 minutos después del establecimiento de las condiciones de estrés por deficiencia de Fe, algunos de estos genes expresan OMP's que funcionan como receptores de transferrina, hemoglobina y sideróforos.

La expresión de diferentes proteínas se realiza en función de las necesidades de la bacteria así como en respuesta a cambios en su entorno. Los factores ambientales podrían estar regulando la expresión de OMP's. En *G. anatis* se observó el cambio en la expresión de OMP's de 70, 37, 36, 25 y 23kDa. En otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* sometidos a condiciones de estrés por deficiencia de Fe también ha sido observado cambios en la expresión de OMP's; Abascal *et al.*, en 2009 observaron la expresión diferencial de OMP's de 60, 68 y 90kDa en *Av. paragallinarum*, Pulchalski *et al* en 2011 describieron 18 nuevas proteínas en *P. multocida* con pesos entre 30 y 160kDa, además centraron su estudio en las proteínas de 68, 75 y 86 kDa, asignándoles una participación activa en la adquisición del Fe del hospedero. Deener y Potter en 1989 describieron 2 proteínas en *A. pleuropneumoniae* de 105 y 76kDa respectivamente que asociaron como posibles receptores para complejos quelantes de Fe secretados por la bacteria o la otra alternativa era su participación directa como receptores de transportadores de Fe del hospedero. El cambio en la expresión de OMP's podría indicarnos que se encuentran reguladas por la disponibilidad de Fe. De las OMP's observadas, solo la OMP de 70kDa se expresaba únicamente en condiciones de deficiencia de Fe. Litwin, *et al.*, en 1993 ya habían señalado que ambientes con una baja concentración de Fe fungen como inductores de genes de virulencia.

Los organismos patógenos responden con alteraciones coordinadas en la expresión de sus genes a cambios en los factores ambientales (Ratledge y Dover, 2000). En *G. anatis* se observa como posible respuesta a la deficiencia de Fe el cese de la expresión de las proteínas secretadas de ~37 y ~23 kDa, además se observó el incremento en la secreción de una proteína de 58kDa, coincidiendo con una proteína del mismo peso molecular de *Av. paragallinarum* descrita en el laboratorio, esta proteína ya está caracterizada como un receptor de transferrina catalogada como TbpB soluble e igualmente es secretada al medio de cultivo (datos no publicados).

Ante una infección bacteriana, el proceso de secuestro de Fe es un importante mecanismo de defensa del hospedero (*Ratledge y Dover, 2000*). La expresión de OMP's para la adquisición de Fe y su consiguiente exposición en la membrana las hacen blanco de los anticuerpos generados por el sistema inmune del hospedero. Las OMP's de los cultivos sometidos a estrés por Fe fueron reconocidas por los sueros de aves infectadas con *G. anatis* lo cual nos sugiere que también se presentan en condiciones *in vivo*. Así mismo el suero de aves infectadas con *Av. paragallinarum* tuvo reacción cruzada con OMP's de *G. anatis*, sugiriendo homología entre las OMP's.

Se observó que la OMP de 70 kDa solo presentó reconocimiento por parte del suero contra *Av. paragallinarum* en las OMP's obtenidas bajo condiciones de estrés. Pero al utilizarse suero de aves infectadas con *G. anatis* se observó un incremento en su reconocimiento en condiciones de estrés por Fe. Esto nos indica que se sobreexpresa en condiciones de deficiencia por Fe, y que además se encuentra en la membrana externa en condiciones normales. Boyce y Adler en 2006 establecieron en *P. multocida* que los genes que se encuentran involucrados en la adquisición de Fe durante la infección podrían expresarse de manera constitutiva y su regulación solo se daría durante las etapas iniciales de la infección o en su defecto cuando los niveles del nutriente disminuyeran más allá de los límites de su detección. Esto explicaría la presencia de OMP's que participan en la adquisición de Fe en condiciones favorables de disponibilidad. Sin embargo esto conllevaría a pensar en una saturación de iones de Fe en el interior celular provocando así toxicidad por formación de radicales libres mediante la reacción de Fenton (*Ratledge y Dover 2000*). Al contrario de lo que ocurre con otros iones, es escasa la información acerca de la expulsión de hierro hacia el exterior celular y de las condiciones ambientales en las que esta tiene lugar (*Grass, 2006*).

No hubo inmunoreconocimiento de OMP's en los pesos moleculares reportados para TbpA y TbpB por parte de los sueros anti TbpA y TbpB de *Av. paragallinarum*.

Además de la expresión de mecanismos de captación de hierro en la membrana externa, se necesitan proteínas en el espacio periplasmático involucradas en la internalización del Fe que trabajan en conjunto con proteínas de la membrana interna, comúnmente estos mecanismos son de tipo ABC (Higgins, 1992). Se observó el reconocimiento de una OMP de ~70kDa al utilizar suero contra la proteína de 68kDa implicada en el transporte de Fe (ya descrita en *Av. paragallinarum*, datos no publicados), el reconocimiento nos sugiere homología entre la OMP de 68kDa de *G. anatis* y la OMP descrita en *Av. paragallinarum*. Esto sugiere que los mecanismos involucrados en el transporte de Fe son compartidos. En *Manheimia haemolytica* Roehrig et al., en 2007 reportaron la expresión de genes que codifican para transportadores tipo ABC que participaban con receptores de transferrina, hemoglobina y sideróforos durante el crecimiento en condiciones limitantes de Fe.

Los receptores que unen la glicoproteína Transferrina (Transferrin binding protein o Tbp) están ampliamente distribuidos en las familias *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae* (Calmettes et al 2011). Alguno de los ejemplos en la familia *Pasteurellaceae* son: *Pasteurella haemolytica* (Deener y Potter, 1989b), *P. multocida* (Zhao et al 1995) y *A. pleuropneumoniae* (Deener y Potter, 1989a). Así mismo la TbpB es un elemento que posee una estructura conservada en los organismos que la presentan. Se ha descrito que hay una correlación entre la severidad de la infección presente con el genotipo presente de Tbp, tal como lo observaron Danilowicz et al en 2010 en *A. pleuropneumoniae*

En el caso de las proteínas secretadas se observó el reconocimiento de una OMP de 68kDa por los sueros contra *G. anatis* y *Av. paragallinarum* que asimismo reaccionó a un suero anti TbpB soluble (descrita para *Av. paragallinarum* por Abascal et al., en 2009) lo cual sugiere su expresión *in vivo*. A diferencia de la OMP de 70kDa, la proteína secretada de 68kDa solo se observó en los

sobrenadantes de los cultivos sometidos a la acción del quelante. Lo cual nos sugiere que su expresión está regulada por la concentración de Fe.

El análisis *in silico* de la secuencia de los fragmentos trípticos de la OMP de 70kDa demostró homología con una proteína Cir A (grupo de proteínas involucradas en la adquisición de Fe) de *M. succiniproducens* (Hong, et al., 2004), donde funge como receptora de sideróforos, lo cual conlleva a suponer que *G. anatis* tiene la capacidad de secretar sideróforos, o en su defecto la capacidad para utilizarlos. Ya ha sido descrita la producción de sideróforos en la familia *Pasteurellaceae*; Hu, et al., en 1986 describieron la producción de sideróforos en *P. multocida*, en *A. pleuropneumoniae* Klitgaard et al., en 2010 describieron un gen putativo con una secuencia similar a los genes Cir A y además documentaron que su expresión se vio alterada en respuesta a condiciones limitantes de Fe; adicionalmente Archambault, et al., en 1999 observaron en *A. pleuropneumoniae* la capacidad para utilizar sideróforos exógenos.

La expresión de sideróforos se ve suprimida cuando en el medio hay cantidades suficientes de Fe (Hider y Kong 2009). En el caso de *G. anatis* no ha sido publicado ningún estudio sobre la producción de sideróforos o la capacidad para utilizarlos. El ensayo realizado para la detección de sideróforos por espectrofotometría mostró que existía un compuesto capaz de unirse a Fe, la secreción de este compuesto fue mayor en condiciones de ausencia de Fe, también se constató que el uso del quelante 2,2-Bipyridil no interfería. Estos resultados proponen que la secreción de este compuesto quelante se encuentra regulada por la biodisponibilidad del hierro. En *Haemophilus influenzae* se ha descrito por Morton et al., en 2010 la capacidad para utilizar sideróforos/hemoforos producidos por otros microorganismos, además describieron la presencia de un locus reprimible por Fe responsable de esa capacidad. También denotaron que *H. influenzae* carece de los genes que codifican para las proteínas involucradas en la síntesis de sideróforos.

Se observo que una de las OMP's expresadas en deficiencia de Fe puede unirse a hemoglobina de *G. gallus*, esta OMP de 50kDa aun no ha sido confirmada debido a que no se observa su expresión en los Geles y es muy tenue su reconocimiento en los Western blots. Pero al igual que los mecanismos de adquisición de Fe no ha sido descrito en *G. anatis* la capacidad de utilizar el grupo hemo y su ion Fe como fuente de Hierro. Hay que destacar que el biovar utilizado es beta hemolítico, lo cual nos lleva a pensar en la posibilidad de que *G. anatis* podría utilizar la hemoglobina como fuente de Fe. En otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* han sido descritos genes involucrados en la expresión de receptores de hemoglobina, en *A. pleuropneumoniae* Klitgaard et al en 2010 describieron 3 genes que presentan homología con el gen hmbR catalogado como receptor de hemoglobina de *Neisseria meningitidis*. Y en el caso de *M. haemolytica* (Roehrig et al en 2007) describen la presencia de los genes hmbR1 y hmbR2, así como la expresión de hmbR2 en *P. multocida*. Asociado a la expresión de hmbR2 en ambos organismos, se observo la inducción de genes involucrados en los sistemas de transporte de Fe en el espacio periplasmático; los sistemas yfeABCD y fbpABC. La expresión de estos genes fue observada cuando los organismos (*P. multocida* y *M. haemolytica*) fueron crecidos en condiciones limitantes de Fe. (Roehrig et al en 2007)

La producción *in vivo* y la posibilidad de la expresión *in vitro* de la OMP de 70 kDa y la proteína secretada de 68kDa hacen a estas proteínas, que podrían estar participando participan en la adquisición de Fe, excelentes candidatos para ser el objetivo de una vacuna que se desarrolle por la inducción de anticuerpos para prevenir la adquisición de Fe de *G. anatis* (Abascal et al, 2009). En el caso de la OMP de 70kDa podría ser un buen candidato debido a sus características; tales como su exposición en la membrana celular así como su sobreexpresión en el proceso de colonización El conocimiento de estas proteínas de membrana externa nos permite la selección de blancos para el desarrollo de vacunas (Alteri et al., 2009).

## 11 CONCLUSIÓN.

*Gallibacterium anatis* induce la expresión diferencial de proteínas implicadas en la captación de Fe cuando se crece en condiciones de bajo hierro.

El reconocimiento cruzado por parte de otros sueros nos indica la presencia de epitopos conservados en las proteínas inducidas en miembros de la familia *Pasteuralleaceae*.

Los péptidos obtenidos de la proteína de 70kDa que se analizó por MALDI-TOF presentaron similitud con un receptor de sideróforos.

*Gallibacterium anatis* puede poseer más de un mecanismo para la adquisición de Fe.

## 12 LITERATURA CITADA.

- **Abascal, E. N., Guerra, A. C., Vázquez A. S., Tenorio, V. R., Cruz, C. V., Zenteno, E., Contreras, G. P. y Pacheco, S. V.** (2009) Identification of iron-acquisition proteins of *Avibacterium paragallinarum*. Avian Pathol 38: 209-213.
- **Abdallah, F. B. and El Hage Chahine, J. M.** (1999) Tranferrins, the mechanism of iron release by ovotransferrin. Europ J Biochem 263:912-920.
- **Abdul-Tehrani, H., Hudson, A. J., Chang, Y. S., Timms, A. R., Hawkins, C., Williams, J. M., Harrison, P. M., Guest, J.R. and Andrews, S.C.** (1999) Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. J Bacteriol 181, 1415-1428.
- **Albert, B.** Ed. (2002) Molecular Biology of the Cell. Garland Science, New York.
- **Alteri, C. J. and Mobley, H. L.** (2009) Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. Infect Immun 75:2679-2688.
- **Ames, G. L.** (1986) Bacterial periplásmica transport systems: structure, mechanism, and evolution. Ann Rev Biochem 55:397-425.
- **Andrews S.C., Robinson, A. K., Rodriguez-Quiñones, F.** (2003) Bacterial Iron Homeostasis. FEMS Microbiol Rev 27: 215-237.
- **Archambault, M., Rioux, S. and Jacques. M.** (1999) Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. FEMS Microbiol Lett 173:17–25.
- **Bélanger, M., Bégin, C. and Jacques, M.** (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. Infect Immun 63:656–662.
- **Bisgaard, M. and Dam, A.** (1981). Salpingitis in poultry. II. Prevalence, bacteriology, and possible pathogenesis in egg-laying chickens. Nord Vetr Med 33: 81-89.

- **Bisgaard, M.** (1977) Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis. Characterization of 213 strains. Avian Pathol 6: 285-292.
- **Bisgaard, M., Korzack D. M., Busse, H., Kunhert, P., Bojensen, A. M. and Christensen, H.** (2005 ) Classification of the taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard within *Gallibacterium* and description of *Gallibacterium melopsittaci* sp. nov., *Gallibacterium trehalosifermentans* sp. nov. and *Gallibacterium salpingitis* sp. nov. Int J Syst Evo Microbiol 59:735-744.
- **Blackall, P.J., Rogers, D. G. & Yamamoto, R.** (1990). Outer Membrane Proteins of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 34: 871-877.
- **Bojensen, A. M., Vazquez, M. E., Robles, F., Gonzalez C., Soriano E. V., Olsen J. E., and Christensen, H.** (2007) Specific identification of *Gallibacterium* by PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S rRNA genes. Vet Microbiol 123: 262-268.
- **Bojensen, A. M., Bager, R. J., Ifrah, D. and Aarestrup, F. M.** (2011) The rarely reported *tet* (31) tetracycline resistance determinant is common in *Gallibacterium anatis*. Vet Microbiol 149: 497-499
- **Bojensen, A. M., Torpdahl, M., Christensen, H., Olsen, E. J. and Bisgaard, M.** (2003a) Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* isolates from different chicken flocks. J Clin Microbiol 41:2737-2740.
- **Bojesen, A. M., Nielsen, S.S. and Bisgaard, M.** (2003b). Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. Avian Pathol. 32: 503-510.
- **Boyce, J. D. and Adler, B.** (2006) How does *Pasteurella multocida* respond to the host environment? Curr Opin Microbiol 9:117-122.
- **Bullen, J. J., Rogers, H. J. and Griffiths, E.** (1978) Role of iron in bacterial infection. Curr Top Microbiol Immunol 80:1-35.

- **Calmettes, C., Yu, R. H., Silva, L. P., Curran, D., Shriemer, D. C., Schryvers A. B. and Moraes, T.F.** (2011) Structural variations within transferrin binding site on transferrin-binding protein B, TbpB. J Biol Chem 286: 12683-12692
- **Choi-Kim, K., Maheswaran, S.K., Felice, L. J. and Molitor, T. W.** (1991) Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of *in vivo* grown *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 28: 75–92.
- **Christensen, H., Bisgaard, M., Bojesen, A. M., Mutters, R. and Olsen, J.E.** (2003). Genetic relationships among strains of biovars of avian isolates classified as “*Pasteurella haemolytica*”, “*Actinobacillus salpingitidis*” or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., sp. nov. Int Syst Evo Microbiol 53: 275-287.
- **Danilowicz, E., Martinez-Arias, R., Dolf, G., Singh, M., Probst, I., Tümmler, B., Höltig, D., Waldmann, K. H., Gerlach, G. F., Stanke, F., Leeb, T; Futago-consortium IRAS.** (2010) Characterization of the porcine transferrin gene (TF) and its association with disease severity following an experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. Anim Genet 41: 424-427
- **De la Garza, M. and Vaca Pacheco, S.** Eds. (2010) La lucha por el Hierro. Patógeno vs hospedero. CINVESTAV. México, DF
- **Deneer, H. G., Potter, A. A.,** (1989a) Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Infect Immun 57:798–804.
- **Deneer, H. G. and Potter, A. A.,** (1989b) Iron-repressible outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica*. J Gen Microbiol 135: 435-443.
- **Drabkin, D. L.** (1946) Spectrophotometric studies: XIV. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. J Biol Chem 164:703-723.

- **García-Gómez, E., Vaca, S., Pérez-Méndez, A., Ibarra-Caballero, J., Pérez Márquez V., Tenorio, V. R., and Negrete-Abascal, E.** (2005) *Gallibacterium anatis*-secreted metalloproteases degrade chicken IgG. Avian Pathol. 34: 426-429.
- **Gerlach, G. F., Klashinsky, S., Anderson, C., Potter, A. A. and Wilson, P. J.** (1992) Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. Infect Immun 60:3253–3261.
- **Gerlach, H.** (1977). Significance of *Pasteurella haemolytica* in poultry. Prakt Tierartz. 58: 324-328.
- **Gonzalez, G. C., Yu, R. H., Rosteck, P. R., and Jr-Schryvers, A. B.** (1995) Sequence analysis and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes. Microbiology 141:2405–2416.
- **Grass, G.** (2006) Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. Biometals 19: 159-172.
- **Harry, E. G.** (1962) A haemolytic coccobacillus recovered from poultry. Vet Rec 74: 640.
- **Hart, R. C., Kadis, S. and Chapman, WL. Jr.** (1982) Nutritional iron status and susceptibility to *Proteus mirabilis* pyelonephritis in the rat. Can J Microbiol 28:713-717.
- **Hider, R. C. and Kong, X.** (2010) Chemistry and biology of siderophores. Nat Prod Rep 27: 637-657.
- **Hong, S. H., Kim, J. S., Lee, S. Y., In Y. H., Choi, S. S., Rih, J. K., Kim, C. H., Jeong, H., Hur, C. G. and Kim J. J.** (2004) The genome sequence of the canophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. Nat Biotechnol 22: 1275-1281.
- **Hu, S. P., Felice, L. J., Sivanandan, V. and Maheswaran, S. K.** (1986) Siderophore production by *Pasteurella multocida*. Infect Immun 54: 804-810.

- **Jacques, M.** (2004) Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can J Vet Res 68:81-85.
- **Jordan, F. T. W., Williams, N. J., Wattret, A. and Jones, T.** (2005). Observations on salpingitis, peritonitis and salpingoperitonitis in a layer breeder flock. The Vet Rec 157: 573-577.
- **Kjos-Hanssen, B.** (1950). Oviduct peritonitis in hens due to pathogenic "cloacal bacteria". Nord Vet Med 2: 523-531.
- **Klitgaard, K., Friis, C., Angen, O. and Boye M.** (2010) Comparative profiling of the transcriptional response to iron restriction in six serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with different virulence potential. BMC Genomics 9: 698.
- **Kohlert, R.** (1968) Untersuchungen zur Ätiologie der Eileiterentzündung beim Huhn. Mon Vet 23: 392-395.
- **Kristensen, B. M., Frees, D. and Bojensen, A. M.** (2010) GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organization. Vet Res 41: 25.
- **Kristensen, B. M., Frees, D. and Bojensen, A. M.** (2011) Expression and secretion of the RTX-toxin GtxA among members of the genus *Gallibacterium*. Vet Microbiol (En prensa) doi: 10.1016/j.vetmic.2011.05.019.
- **Larios, N. A.** (2006) Expresión de proteínas reguladas por Hierro en *Avibacterium paragallinarum*. Tesis de Licenciatura. UNAM.
- **Litwin, C. M. and Calderwood, S. B.** (1993) Role of Iron in Regulation of Virulence Genes. Clin Microbiol Rev 6: 137-149.
- **Lo, R. Y. C. and Sorensen, L. S.** (2007) The outer membrane protein OmpA of *Mannheimia haemolytica* A1 is involved in binding to bovine bronchial epithelial cells. FEMS Microbiol Lett 274: 226-231

- **Matthes, S. and Hanschke, J.** (1977). Experimentelle Untersuchungen zur Übertragung von Bakterien über das Hühnerei. Ber Münch Tier Wochens 90: 200-203.
- **May, B. J., Zhang, Q., Li, L.L., Paustian, M. L., Whittam, T. S. and Kapur, V.** (2001) Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. Proc Natl Acad Sci USA 98: 3460–3465.
- **Mirle, C., Schongarten, M., Meinhart, M. and Olm, U.** (1991). Studies into the incidence of *Pasteurella haemolytica* infections and their relevance to hens, with particular reference to diseases of the egg laying apparatus. Monatsh. Vetmed. 45:545-549
- **Mráz, O., Vladík, P. and Boháček, J.** (1976). *Actinobacilli* in domestic fowl. Zen Bakt Hy Orig. A: 294-307.
- **Mushin, R., Weisman, Y. and Singer, N.** (1980). *Pasteurella haemolytica* found in respiratory tract of fowl. Avian Dis 24:162-168.
- **Neilands, J. B.** (1981) Microbial iron compounds. Annu Rev Biochem 50: 715-731
- **Oberai, A., Ihm, Y., Kim, S. y Bowie, J.** (2006) A limited universe of membrane protein families and folds. Protein Sci 15: 1723-1734.
- **Ogunnariwo, J. A. and Schyvers, A. B.** (2001) Characterization of a novel transferring receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. J Bacteriol 183: 890-896.
- **Payne, S. M.** (1993) Iron acquisition in microbial pathogenesis. Trends Microbiol 1:66-69.
- **Pulchalski, A., Dec, M., Wernicki, A., Urban-Chmiel, R. and Gieral, A.** (2010) Characterization of outer membrane proteins participating in iron transport in *Pasteurella multocida* serotype A3. Pol J Vet Sci 13: 121-127
- **Ratlegde, C. and Dover, G. L.** (2000) Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria. Annu Rev Microbiol 54:881-941.

- **Roehrig, S. C., Tran, H. Q., Spehr, V., Gunken, N., Selser, P. M. and Ullrich, H. J.** (2007) The response of *Manheimia haemolytica* to iron limitation: implications for the acquisition of iron in the bovine lung. Vet Microbiol 121: 316-329.
- **Rouf, M.A.** (1964) Spectrochemical analysis of inorganic elements in bacteria. J Bacteriol 88: 1545-1549.
- **Shaw, D. P., Cook, D. B., Maheswaran, K., Lindeman, C. J. and Halvorson, D. A.** (1990). *Pasteurella haemolytica* as a co-pathogen in pullets and laying hens. Avian Dis 34: 1005-1008.
- **Snipes, K. P., Hansen, L. M., and Hirsh, D. C.** (1988) Plasma and iron regulated expression of high molecular weight outer membrane proteins by *Pasteurella multocida*. Am J Vet Res 49: 1336–1338.
- **Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Aca Sci USA 76: 4350-4354.
- **Vaca, P. S., Sánchez, E. C., Monroy, P. E. and Rojas L.** (2011) Adherence of *Gallibacterium anatis* to inert surfaces. J Anim Vet Adv 10: 1688-1693.
- **Vazquez, M. E., Gonzalez, C. H., De la Mora, R. and Bojensen, A. M.** (2006) Prevalence of *Gallibacterium anatis* in Mexico and their effect in laying hens. En: Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Veterinary and Diagnostic Conference, Oslo.
- **Winston, J. L., Chen, C. K., Neiders, M. E. and Dyer, D. W.** (1993) Membrane protein expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in response to iron availability. J Dent Res 72: 1366-1373.
- **Zepeda, A., Ramirez, S., Vega, V., Morales, V., Talavera, M., Salgado, M. C., Simon, M., J., Bojensen, A. M. and Soriano V. E.** (2009) Hemagglutinating activity of *Gallibacterium* Strains. Avian Dis 53: 115-118.

- **Zhao, G., Pijoan, C., Choi, K., Maneswaran, K. S. and Trigo, E. (1995)**  
Expression of Iron-Regulated outer membrane proteins by porcine strains of *Pasteurella multocida*. *Can J Vet Res* 59: 46-50.