



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS AMILOIDES EXPRESADAS POR
Mannheimia haemolytica

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

JUAN FERNANDO MONTES GARCÍA

TUTOR:

DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

COMITÉ TUTOR:

DR. SERGIO VACA PACHECO

DR. FRANCISCO AGUILAR ROMERO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

México, D.F. Enero 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

*El presente trabajo se realizó en el
Laboratorio de Genética en la
Unidad de Morfología y Función de la
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
De la Universidad Nacional Autónoma
De México con el financiamiento de PAPIIT IN222313 y PAPCA-FESI, UNAM*

Índice

Resumen.....1

Abstract.....	2
1.-Introduccion.....	3
1.1- Familia <i>Pasteurellaceae</i>.....	3
1.2- <i>Mannheimia haemolytica</i>.....	4
1.3- Factores de virulencia.....	5
1.4- Patogenia.....	6
1.5- Patología.....	7
1.6- Proteínas amiloides.....	8
2. -Antecedentes.....	12
3. -Justificación.....	13
4. -Hipótesis.....	13
5.- Objetivos.....	14
6.- Materiales y Métodos.....	15
6.1. -Cepas bacterianas	
6.2.-Medios de cultivo	
6.3.-Unión de Rojo Congo a <i>M. haemolytica</i>	
6.4.-Obtención de proteínas de membrana externa (PME)	
6.5.-Obtención de proteínas secretadas al medio (PS)	
6.6.-Aislamiento de proteínas amiloides	
6.7.-Curva de calibración de Rojo Congo	
6.8.-Electroforesis (SDS-PAGE)	
6.9.-Unión de rojo Congo	
6.10.- Anticuerpos policlonales	
6.11.- Inmunoreconocimiento (Western blotting)	
6.13.-Microscopía electrónica	
6.14.-Inmunomarcaje	
6.15.- Identificación de la proteína amiloide	
7.- Resultados.....	20
8.- Discusión.....	30
9.- Conclusiones.....	35

10.- Perspectivas.....	36
11.- Anexo.....	37
12.- Literatura citada.....	38

Resumen

Mannheimia haemolytica (Mh) produce pérdidas económicas significativas a la industria pecuaria debido a que causa afecciones respiratorias en bovinos. Diferentes factores de virulencia, tales como la leucotoxina, el lipopolisacárido, cápsula, adhesinas, formación de biopelículas y varias proteasas, son expresadas por Mh durante la infección y contribuyen a la enfermedad, debido a que Mh es un patógeno oportunista. La expresión de estos factores de virulencia está sujeta a señales específicas del medio ambiente. En las biopelículas, las proteínas amiloides son el componente proteico mayoritario, funcionan como andamios que ayudan en la adherencia y confieren resistencia contra una variedad de agresiones ambientales. Las proteínas amiloides son altamente resistentes a la digestión por proteasas y a la desnaturalización física y química. Entre sus características destacan su capacidad de teñirse con colorante rojo Congo. El propósito de este proyecto fue caracterizar una proteína amiloide de aproximadamente 40 kDa expresada por Mh que se une al colorante rojo Congo, resiste a la digestión con ácido fórmico y es termo estable a la ebullición. Ésta proteína fue purificada a partir de cultivos incubados durante 48 horas a 37°C; fue reconocida por anticuerpos policlonales anti-curli de *Escherichia coli* (una proteína amiloide ampliamente caracterizada), anti-proteína amiloide de 40 kDa de *Gallibacterium anatis* y por sueros de conejos inmunizados con Mh, lo cual sugiere que tiene capacidad inmunogénica. Por inmunomarcaje y observaciones mediante microscopía electrónica de transmisión, se aprecia que los anticuerpos se asocian con fibras delgadas y largas unidas a la superficie bacteriana. La identidad de esta proteína obtenida por espectrometría de masas, indica que se trata de una proteína de membrana que presenta similitud con proteínas P2 de membrana externa de Mh y otros microorganismos miembros de la familia *Pasteurellaceae*. El análisis *in silico* de esta secuencia indica que esta proteína posee propiedades autoagregativas y que cuenta con 8 péptidos amiloides en su secuencia. Las proteínas amiloides expresadas por Mh podrían ser importantes en la patogenicidad, así como en la formación de biopelículas.

Abstract

Mannheimia haemolytica (Mh) causes significant economic losses to the livestock industry because it produces respiratory disease in cattle. Different virulence factors, such as leukotoxin, lipopolysaccharide, capsule, adhesins, biofilm formation and several proteases are expressed by Mh during the infection and contribute to the disease. Because Mh is an opportunistic pathogen, expression of virulence factors is subject to specific environmental signals. In biofilms, amyloid proteins are the major protein component. They function as scaffolds that aid in the adhesion and confer resistance against a variety of environmental insults. Amyloid proteins are highly resistant to protease digestion and to physical and chemical denaturation. Among their features is the ability to be stained with Congo red dye. The aim of this project was to characterize a 40 kDa Mh amyloid protein that binds Congo red dye, resists formic acid digestion and is stable to boiling heat. This protein was purified from 48 hours cultures grown at 37°C; it was recognized by polyclonal sera anti-curli from *Escherichia coli* (a widely characterized amyloid protein), 40 kDa anti-amyloid protein from *Gallibacterium anatis* and sera from Mh infected animals, suggesting that it is immunogenic. By immunolabeling and transmission electron microscopy, it is noted that the antibodies are associated with long, thin fibers attached to the bacterial surface. The identity of this protein obtained by mass spectrometry indicates that it is a Mh membrane protein which exhibits similarity to outer membrane proteins P2 from different members of the family *Pasteurellaceae*. Sequence *in silico* analysis indicates that this protein has auto aggregative properties and presents 8 amyloid peptides into its sequence. Amyloid proteins expressed by Mh could be important in pathogenicity and biofilm formation.

Keywords: *Mannheimia haemolytica*, Congo Red, β -amyloid

1.- Introducción

1.1.- Familia *Pasteurellaceae*

La familia *Pasteurellaceae* comprende un grupo grande y diverso de Proteobacterias, formado por bacterias Gram-negativas cuyos miembros pueden ser patógenos importantes de seres humanos, tales como *Haemophilus influenzae*, o de animales, como *Pasteurella multocida*, u otros comensales de mucosas de animales y humanos. La mayoría de estos microorganismos vive como comensales en las superficies mucosas de las aves y los mamíferos, especialmente en el tracto respiratorio superior y genital. Los miembros de la familia *Pasteurellaceae* son típicamente cocobacilos anaerobios facultativos. Ellos se pueden distinguir de las enterobacterias relacionadas por la producción de oxidasa, y de la mayoría de otras bacterias similares, por la ausencia de flagelos (Bisgard, 1993).

Las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* se han clasificado en una serie de géneros basados en las propiedades metabólicas, pero estas clasificaciones no son por lo general un reflejo exacto de las relaciones evolutivas entre las diferentes especies. *H. influenzae* fue el primer organismo cuyo genoma fue secuenciado y se ha estudiado intensamente por metodologías genéticas y moleculares (Hogg *et al.*, 2007). Muchos miembros de la familia *Pasteurellaceae* son excelentes modelos naturales para el estudio de la patogénesis bacteriana y de interacciones huésped-patógeno, dando así información valiosa sobre enfermedades de interés veterinario (Christensen, 2005).

La familia *Pasteurellaceae* incluye 38 especies debidamente clasificadas, además de 24 especies no tipificables. La mayoría de los taxones se han aislado a partir de animales enfermos en granjas de producción. Estas bacterias son parásitos obligados o comensales de vertebrados, que principalmente colonizan las superficies de las mucosas de las vías respiratorias superiores, la orofaringe y el aparato reproductor y posiblemente también partes del tracto intestinal. La mayoría de los taxones representa patógenos potenciales y han sido reportados tanto en las infecciones sistémicas como en las locales. La información sobre la diversificación de taxones dentro de la familia sólo puede ser obtenida por la reconstrucción filogenética (Christensen and Bisgaard, 2008).

Los análisis comparativos de genomas de miembros de la familia *Pasteurellaceae* han permitido identificar un gran número de proteínas importantes que son

compartidas por todas las especies/cepas de *Pasteurellaceae* secuenciadas, pero que no se encuentran en ninguna otra bacteria. Sobre la base de muchas regiones conservadas de ADN que son específicas para subgrupos de especies de la familia *Pasteurellaceae*, se ha propuesto dividir a esta familia en al menos dos clados. Uno de los clados propuestos incluye *Aggregatibacter*, *Pasteurella*, *Actinobacillus succinogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Histophilus somni* y *Mannheimia succiniciproducens*; mientras que el otro incluye *Actinobacillus minor*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus parasuis* y *Mannheimia haemolytica* (Bonaventura *et al.*, 2010).

1.2.- *Mannheimia haemolytica*.

Mannheimia (Pasteurella) haemolytica es uno de los agentes bacterianos de la neumonía en el complejo respiratorio bovino (CRB). La bacteria es un habitante normal de las criptas de las tonsilas del bovino sano, además es considerado oportunista del tracto respiratorio, debido a que comúnmente coloniza la parte alta de éste y, bajo ciertas condiciones de inmunosupresión del huésped, se afectan los mecanismos de defensa del mismo, lo cual permite que la bacteria se establezca y se multiplique rápidamente, penetrando a los pulmones durante la inhalación e iniciando una infección activa del epitelio alveolar (Fedorova *et. al.*, 1997).

M. haemolytica anteriormente conocida como *Pasteurella haemolytica*, es un pequeño cocobacilo Gramnegativo, anaerobio facultativo que muestra ligera β -hemolisis en placa de agar sangre bovina. Normalmente es oxidasa positivo, indol negativo, fermentativo e inmóvil (Lekeu, 1996). El género *Mannheimia* es parte de la clase alfa-Proteobacteria, orden Pasteurellales, familia *Pasteurellaceae*. En 1999, un nuevo género, *Mannheimia*, fue formado para incluir a los miembros-trehalosa negativos del subconjunto *P. haemolytica*. *Mannheimia spp* se diferencia del género *Pasteurella* por la fermentación de manitol y la incapacidad de fermentar D-manosa. Además, aplicando herramientas como la secuenciación de los rARN 16S, se ha concluido que la filogenia del género *Mannheimia* contiene actualmente 5 especies: *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis*, *Mannheimia glucosida*, *Mannheimia ruminalis* y *Mannheimia varigena* (Griffin, 2000; Christensen, 2005).

M. haemolytica se divide en 12 serotipos capsulares basados en las asignaciones de *P. haemolytica* originales de A1 , A2 , A5 , A6 , A7 , A8 , A9 , A12 , A13 , A14 , A16 , y A17. Los serotipos A1 y A2 son conocidos por colonizar el tracto

respiratorio superior de los bovinos y ovinos (Jaworski *et al.*, 1998; Katsuda *et al.*, 2007). Se ha sugerido que *M. haemolytica* mantiene una relación comensal con el hospedero hasta que las condiciones cambian como resultado del estrés o la coinfección con otros patógenos virales ó bacterianos. Una vez que esta relación comensal se interrumpe, el serotipo A1 crece rápidamente y es el colonizador predominante y responsable de la pleurobronconeumonía característica en bovinos. Se ha observado que la neumonía fibrinosa por *M. haemolytica* puede ser inducida experimentalmente sólo si la bacteria se encuentra en la fase de crecimiento exponencial y se inyecta directamente en los pulmones (vía intratraqueal o por administración transtorácica) en número suficiente ($> 10^9$ unidades formadoras de colonias en los terneros no inmunes), lo que sugiere que *M. haemolytica* puede ser un patógeno primario en el CRB (Rice *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2011).

1.3.- Factores de virulencia.

Los factores de virulencia de *Mannheimia haemolytica* incluyen una cápsula, que participa en la adherencia y la invasión; proteínas de membrana externa con funciones diversas; adhesinas utilizadas para la colonización; una neuraminidasa que reduce la viscosidad del moco de las vías respiratorias, lo que permite el establecimiento de la infección; un lipopolisacárido que causa choque endotóxico, edema, hipoxemia y la inflamación aguda; la leucotoxina responsable de la lisis de leucocitos y plaquetas de rumiantes, y un sistema de *quorum sensing* que se cree que regula la expresión de factores de virulencia (Trigo, 1987; Murphy *et al.*, 1993. Lo, 2001).

Estos factores de virulencia juegan un papel esencial en la capacidad de *M. haemolytica* para evadir su eliminación y evitar las defensas del huésped mientras se reproduce rápidamente en la parte baja del tracto respiratorio. La leucotoxina parece ser el principal factor de virulencia. Esta, es una proteína de 104-kDa que se secreta durante la fase de crecimiento logarítmico. Se trata de una citotoxina formadora de poros, miembro de la familia RTX, que interactúa con las integrinas $\beta 2$ de leucocitos. La principal función de las integrinas $\beta 2$ de leucocitos es dirigirlos a las áreas de inflamación, además de la fagocitosis, la presentación de antígenos, y la citotoxicidad de CD18. La subunidad β es común en las integrinas $\beta 2$, se ha demostrado que es utilizada por la leucotoxina de *M. haemolytica* como un receptor específico en los macrófagos y neutrófilos de leucocitos de rumiantes. Hay una respuesta dependiente de la concentración de leucotoxina en los leucocitos de bovinos; la leucotoxina en bajas concentraciones dentro del hospedero puede inducir apoptosis mediante la activación de los leucocitos para

aumentar la absorción de calcio; la liberación de intermediarios reactivos de oxígeno, eicosanoides y citoquinas pueden intensificar la inflamación local. Esto ayuda a explicar la inflamación severa observada en la pleurobronconeumonía fibrinosa. Mientras que concentraciones aún mayores inducen la muerte celular por necrosis, resultando directamente en lesiones de pulmón (Narayanan *et al.*, 2002; Trigo, 1991).

1.4. Patogenia

En una visión general de la patogénesis de la neumonía en el ganado de engorda, se describe sólo *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* como patógenos bacterianos en el CRB. Aunque actualmente, *Histophilus somni*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Mycoplasma bovis* y *Bibersteinia trehalosi* también han sido reconocidos como agentes bacterianos adicionales asociados a la neumonía bacteriana bovina grave (Blackall *et al.* 2007, Welsh *et al.* 2004). Estas bacterias son omnipresentes en la población bovina como comensales nasofaríngeos y, después de un estrés ambiental e infecciones virales tales como las debidas a herpes virus bovino (BHV-1), virus sincitial respiratorio (RSV), o virus parainfluenza (PI), *M. haemolytica* pueden proliferar y ser inhalado en los pulmones donde causa la destrucción del tejido, e inicia una respuesta inflamatoria intensa (Confer AW, 2009).

El proceso que da como resultado final la neumonía por *M. haemolytica*, está asociado a sus factores de virulencia como la endotoxina que tiene efectos tanto locales como generales. De manera local producen alteración de la membrana de las células del endotelio vascular, provocando edema, hiperemia y hemorragia pulmonar. De manera general, inducen fiebre, hipoxia, hipotensión y mayor densidad del surfactante pulmonar, provocando lesión, esto lo hace promoviéndola adhesividad de los neutrofilos al endotelio vascular, complementado con un aumento en la producción de radicales del oxígeno y liberación de enzimas lisosomales por el neutrofilo, además, la endotoxina activa el complemento por las vías alterna y la clásica, por la cual se liberan factores quimiotacticos para neutrófilos, exacerbando así la intensidad de la respuesta inflamatoria tanto en las vías respiratorias altas como en las bajas, y finalmente en pulmón, que da lugar a una neumonía (Rice *et al.*, 2007). También se encuentra la leucotoxina que es activa contra leucocitos y plaquetas de rumiantes. A altas concentraciones causa lisis celular, y a concentraciones sublétricas induce diversos efectos: estallido respiratorio y degranulación de macrófagos y neutrofilos; daño funcional de linfocitos; inducción de citosinas inflamatorias y apoptosis celular (Thumbikat *et al.*, 2003).

Como esta enfermedad es compleja y aguda, existe el riesgo de muerte en un lapso corto de tiempo. Es importante que los tratamientos sean aplicados de inmediato, aunque lo ideal sería tener medidas preventivas como el uso de vacunas antes del momento de la transportación de los animales o previo a cambios climáticos severos que predisponen a padecer esta enfermedad. CRB es un tema muy amplio en todos los sentidos, por lo que en este escrito solamente se mencionará superficialmente, ya que el objetivo de este trabajo es caracterizar proteínas amiloides expresadas por *M. haemolytica*.

1.5.- Patología

La neumonía fibrinosa es la principal lesión que desarrollan los bovinos que mueren por esta enfermedad respiratoria. Hodgins y Shewen en 2004 describieron las lesiones causadas en el pulmón de bovino *posmortem*. A la necropsia, los pulmones muestran una consolidación bilateral con una textura firme y pesada. Los lóbulos tienen un aspecto jaspeado, que denota las diversas etapas del proceso neumónico. Se aprecian láminas de fibrina unidas a la pleura parietal y visceral así como la acumulación de fibrina y el edema extendido en las áreas afectadas. Grandes volúmenes de líquido torácico pajizo se observan ocasionalmente, lo que indica exudación grave. En las infecciones crónicas, se observa necrosis en el tejido fibroso. Se forman extensas adherencias por la acumulación de los depósitos de fibrina en las cavidades pleural y pericárdica. Las lesiones histológicas varían con la progresión de la enfermedad; las etapas tempranas muestran edema y deposición de fibrina con la congestión y hemorragia en los alvéolos, junto con el aumento de neutrófilos y macrófagos. En etapas posteriores, los alvéolos contienen macrófagos oscuros con núcleos picnóticos e hiper cromáticos que indican la toxicidad y la muerte celular. Las bacterias se observan en focos de necrosis rodeadas por tejido fibroso. Las lesiones crónicas suelen presentar trombosis del bazo linfático septal (Hodgins *et al.*, 2004; Fulton, *et al.*, 2002).

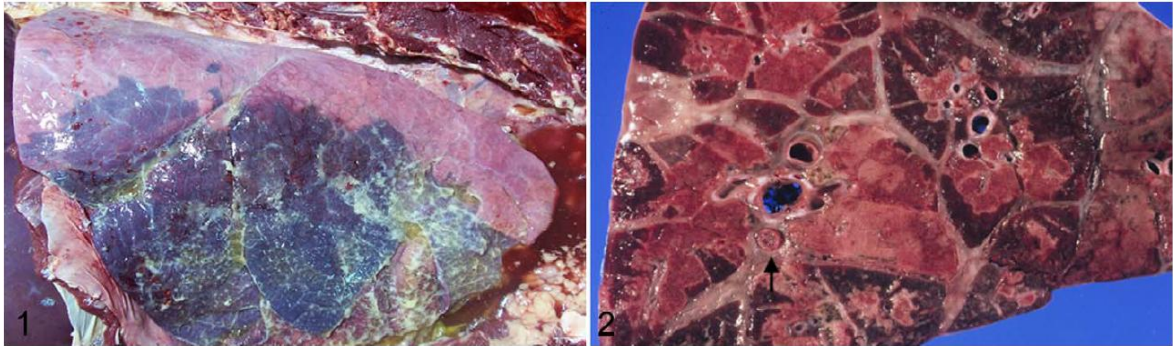


Figura 1. Pulmón bovino, que muestra las lesiones provocadas por *M. haemolytica*. Corte de pulmón bovino que muestra las lesiones internas características de la pleuroneumonía. El patrón lobular se ve acentuado por un edema de los septos interlobulares y necrosis. Las vías aéreas muestran un patrón de mármol característico en el centro (Tomado de Singh, *et al.*, 2011).

1.6.- Proteínas amiloides

Las proteínas amiloides bacterianas presentan las propiedades estructurales y bioquímicas de las proteínas amiloides descritas en eucariontes; es decir, unen colorantes tales como el rojo Congo (RC) y la thioflavina T (Th). El análisis estructural de las proteínas amiloides bacterianas muestra unas fibras ricas en láminas β en su estructura secundaria (Zhou *et al.*, 2012).

El colorante rojo Congo es un compuesto hidrofóbico que se une a proteínas amiloides, las muestras teñidas con este colorante, indican la presencia de fibras amiloides. Las fibras amiloides son agregados de proteínas resistentes a la desnaturalización química, a la digestión ácida y a tratamientos físicos como la ebullición; asimismo resisten la desnaturalización con SDS o digestión por proteinasa K) (Kimizuka *et al.*, 2009). También se ha descrito que los monómeros de estas fibras son altamente auto agregables (Collinson *et al.* 1993, 1999).

Las proteínas amiloides en seres humanos se asocian generalmente con enfermedades neurodegenerativas, incluyendo las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson; y en animales a la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (Cooper, *et al.* 1987; Glenner, *et al.* 1984; Prusiner, 1996). Sin embargo, recientemente se describió una clase de proteínas amiloides "funcionales" en bacterias, lo que indica que el pliegue amiloide, que en estas enfermedades se describe como un defecto de ensamble, puede ser funcional en procariontes (Barnhart *et al.*, 2006). Hasta ahora, se sabe que la mayoría de las proteínas amiloides funcionales en bacterias, realizan tareas fisiológicas en la superficie celular, incluyendo la formación de biofilm, en el que recientemente se ha demostrado que conforman hasta el 40% de la biomasa (Zhou *et al.*, 2012).

Existe actualmente un conocimiento amplio acerca de la proteína amiloide denominada curli, generada por *Escherichia coli* o *Salmonella spp.* (Collinson, *et al.* 1991, Chapman *et al.*, 2002) y fibras TasA producidas por *Bacillus subtilis* (Romero *et al.*, 2010); estas son proteínas amiloides funcionales por medio de las cuales estos microbios establecen interacciones interbacterianas. A diferencia de las proteínas amiloides asociadas a enfermedades, en eucariotas, las proteínas amiloides bacterianas son ensambladas por vías biosintéticas altamente reguladas (Chapman *et al.*, 2002).

Las fibras curli tienen capacidad adherente e interaccionan con moléculas del hospedero como láminina, fibronectina, plasminógeno y el complejo principal de histocompatibilidad clase I. Esta habilidad sugiere que las fibras curli participan en la mediación de la invasividad de estas bacterias, además de que promueven la evasión del sistema inmune al tener la capacidad de recubrirse con fibronectina; también es probable que esta capacidad de interaccionar con moléculas de la matriz extracelular del hospedero facilite el establecimiento del biofilm (Gophna *et al.*, 2002).

Uno de los temas de mayor interés entre los investigadores, en la formación de biopelícula, es la participación de las fibras amiloides, ya que se ha visto que hay una variedad de morfo tipos en enterobacterias, según su capacidad de producir celulosa y curli, con distinta coloración cuando se crecen en medios sólidos con colorante RC. Se sabe que el principal componente de la biomasa de la biopelícula corresponde a la proteína curli y en segundo lugar se encuentra la celulosa (Figura 2). La diferencia entre estas proporciones de componentes incide directamente en la capacidad de infectar al hospedero (Zogaj *et al.*, 2003).



Figura 2.- Morfo tipos de *Salmonella typhimurium* cultivadas sobre placas con rojo Congo durante 48h a 37°C (tomado de Zogaj *et al.*, 2003).

Con respecto a las propiedades estructurales de las fibras curli, lo que las hace una proteína amiloide es algo fascinante. Curli muestra muchas características bioquímicas distintivas de fibras amiloides de eucariontes; también a nivel estructural mantiene la formación de láminas β -plegadas de forma paralela al eje de la fibra y los pliegues individuales de manera perpendicular. Recientes modelos computacionales muestran que el monómero de la fibra curli está formado principalmente por glicina, glutamina y asparagina, estos dos últimos aminoácidos proveen de una muy buena estabilidad química; además en contraste con las proteínas amiloides eucariontes, la glicina sólo está presente en las fibras amiloides bacterianas (Figura 3) (Perutz *et al.*, 1994; 2002).

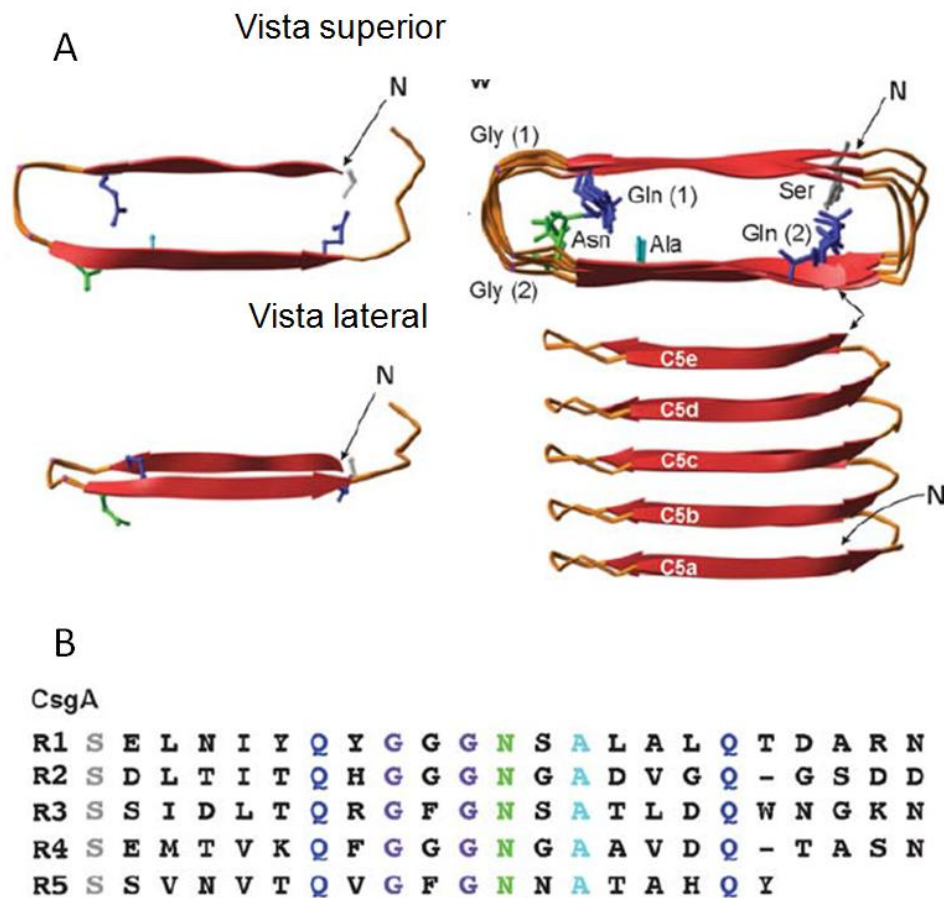


Figura 3.- A) Modelo del monómero de la fibra curli en el que se muestra la conformación que podría adquirir. Se muestra la forma en la que las láminas β se repiten en cinco segmentos que se encuentran unidos por motivos conformacionales que le ayudan a adquirir el giro β plegado que formaría la fibra. B) Secuencia de aminoácidos de un monómero de la fibra curli en la que se muestra la presencia de residuos altamente conservados (adaptado de Perutz *et al.*, 2002).

Actualmente se sabe que la formación de fibras amiloides por bacterias está altamente regulada por factores ambientales, ya que a baja temperatura y mínima humedad se favorece su expresión, pero en el hospedero los factores del ambiente extracelular juegan un papel importante en la formación de biopelícula (Evans & Chapman, 2013).

En *E. coli* se han descrito los genes responsables de la formación de las fibras curli. Se trata de los operones *csgBA* y *csgDEFG*, de transcripción divergente (Figura 4), que codifican para seis proteínas que participan en la estructuración de la fibra. Se han encontrado operones homólogos en *Salmonella spp* llamados *agfBA* y *agfDEFGH*; en esta bacteria la fibra se llama *Tafi* (Hammar *et al.*, 1995 y 1996.). El operón *csgBA* codifica para la sub unidad estructural CsgA y la proteína nucleadora CsgB, parte fundamental de la formación de la fibra, ya que es prioritaria para la polimerización de los monómeros de CsgA que son secretados a la superficie de la bacteria (Figura 4) (Chapman *et al.*, 2002).

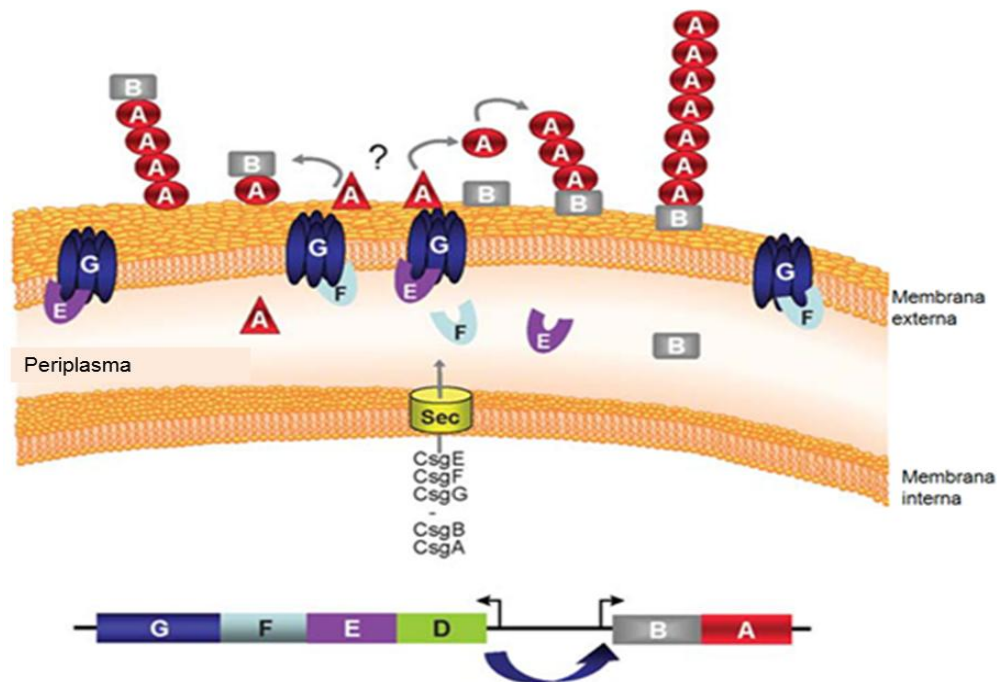


Figura 4.-Modelo de ensamblaje de curli. Este diagrama muestra los dos operones de transcripción divergente que codifican las proteínas necesarias para formar curli e ilustra que la proteína CsgD funciona como un regulador transcripcional positivo del operón CsgBA. Todas las proteínas codificadas por los operones *csg*, excepto CsgD, cuentan con una secuencia señal para translocación que se encuentra en el periplasma. CsgG se requiere para la secreción de las subunidades CsgA y de la proteína nucleadora CsgB. CsgE y CsgF interactúan con CsgG y son necesarias para el ensamblaje eficiente de curli. (Adaptado de Chapman *et al.*, 2002)

2.- Antecedentes.

En 2010, Xicohtencatl-Cortes *et al.*, describieron en *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) y *E. coli* entero-patógena (EPEC) macro-estructuras con forma de cuerda que tenían propiedades de proteínas amiloides. Estas ejercieron efectos citopáticos en cultivos de células epiteliales; también mostraron por microscopía confocal que sirven como un sustrato para la adherencia bacteriana y la formación de biopelículas. Las biopelículas son estructuras que favorecen la agregación de bacterias en comunidades gregarias, que incluso pueden estar formadas por asociaciones de bacterias diferentes. Además de contribuir al establecimiento de la infección, las biopelículas les proporcionan a las bacterias protección contra las condiciones ambientales y las protegen del efecto de compuestos antimicrobianos; también mostraron que los monómeros aislados de estas fibras tienen la capacidad de auto agregarse.

En 2011, Negrete-Abascal *et al.*, describieron en *Gallibacterium anatis* F149^T, un miembro de la familia *Pasteurellaceae*, una proteína con propiedades amiloides que se localiza en la superficie bacteriana. Esta proteína tiene un peso de 42 kDa, resiste la desnaturalización con ácido fórmico concentrado y es termo resistente; además se tiñe con colorante RC. Por microscopía electrónica se observó que la proteína purificada tiene una estructura fimbrial, es reconocida por anticuerpos anti-curli de *E. coli* y por suero de aves infectadas con *G. anatis*, lo que sugiere su participación en el proceso de infección *in vivo*.

En el 2012, Blanco *et al.*, realizaron una revisión del avance en el conocimiento de las proteínas amiloides (fibras curli) funcionales ampliamente descritas para *E. coli* y otras *Enterobacteriaceae*. Ellos muestran que aunque las fibras amiloides sean el principal componente estructural del biofilm, su función no está limitada sólo a darle soporte, sino que pueden interactuar con estructuras celulares del hospedero. Se ha demostrado que estas fibras participan en la adhesión a superficies y tejidos. También pueden intervenir en funciones o procesos de proteínas específicas y la forma oligomérica de estas fibras tiene propiedades citotóxicas.

En años recientes el estudio de las proteínas amiloides funcionales en bacterias ha generado un amplio conocimiento sobre su formación, estructura y función. Para ello se han desarrollado diversas metodologías de estudio. En 2012 Zhou *et al.*, presentaron los enfoques básicos para el estudio de las proteínas amiloides bacterianas, centrándose en las fibras amiloides que han sido ampliamente descritas en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Las técnicas

desarrolladas por estos autores aprovechan las propiedades biofísicas y de tinción específicas de las proteínas amiloides, que pueden ser adaptadas para el estudio de proteínas amiloides producidas por otras bacterias.

3.- Justificación

M. haemolytica causa pérdidas económicas significativas a la industria pecuaria, debido a que es uno de los agentes causales del complejo respiratorio bovino, enfermedad que produce afecciones respiratorias tanto en bovinos productores de carne, como de leche. Por ello las pérdidas económicas son altas ya que se tienen reportes de que en corrales de engorda, con alta densidad de población, hasta un 50% de las muertes son por mannhemiosis bovina.

La eficiencia de un tratamiento oportuno está estrechamente ligada al entendimiento de los mecanismos de patogenicidad; en especial de los procesos de expresión y secreción de proteínas. Es por eso que el estudio de proteínas amiloides bacterianas aporta un nuevo conocimiento de los componentes subcelulares con los que *M. haemolytica* desarrolla su patogenia además que aún no se comprenden por completo los mecanismos de la formación de biopelículas, ni su estructura donde este tipo de proteínas se encuentran presentes.

4.- Hipótesis.

Mannheimia haemolytica produce proteínas amiloides en su superficie, que podrían tener formas fibrilares y estas podrían estar asociadas a la formación de biopelícula.

5.- Objetivos.

General.

Identificar las proteínas amiloides presentes en las cepas de *Mannheimia haemolytica*.

Particulares.

- Demostrar la presencia de la proteína amiloide en la superficie de tres cepas de *M. haemolytica* (una de referencia y dos aislados de campo) cultivándolas en medio con RC y medio YESCA.
- Purificar las proteínas amiloides por digestión en ácido fórmico.
- Determinar la reactividad cruzada con sueros hiperinmunes vs. las proteínas purificadas contra otras proteínas amiloides bacterianas por Westernblot.
- Mostrar mediante el uso de microscopía electrónica la presencia de proteínas amiloides en la superficie bacteriana.
- Identificar por medio de análisis MALDI-TOF, las proteínas amiloides purificadas.

6.- Material y métodos.

6.1.- Cepas bacterianas.

Se utilizaron tres cepas de *M. haemolytica*; dos aislados de campo de casos de neumonía en bovino y ovino: A1 y A2, respectivamente, donados por el Dr. Francisco Morales (INIFAP, Palo Alto, Cuajimalpa, DF) y una cepa de referencia *M. haemolytica* ATCC 31612 donada por el Dr. Edgar Zenteno (Facultad de Medicina, UNAM) se utilizaron como cepas control positivo *E. coli* ETEC y *Staphylococcus aureus* y negativo *E. coli* DH5 α .

6.2.- Medios de cultivo.

Para el desarrollo de los diferentes ensayos, así como para el mantenimiento de las cepas se utilizó Caldo y Agar de Infusión de Cerebro y Corazón (BD Bioxon, Becton Dickinson, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, México). Los medios de cultivo líquidos fueron inoculados con 1% de un precultivo a partir de las cepas congeladas a -70°C e incubados en agitación a temperatura constante (175 rpm, 37°C). Se realizó una prueba de pureza a partir de la observación de la morfología colonial sobre placas de agar sangre y estas fueron incubadas a 37°C durante 24 h (Samaniego *et al.*, 2012).

6.3.- Unión de Rojo Congo a *M. haemolytica*.

Se prepararon placas de agar BHI adicionadas con 20 mg/l de colorante rojo Congo (RC) (Hammar *et al.*, 1996), en las cuales se sembraron las cepas de *M. haemolytica*. Como controles positivos se sembraron las cepas de *E. coli* ETEC y *Staphylococcus aureus* para observar la coloración de las colonias que desarrollan después de ser incubadas a 21, 37 y 40 °C durante 24 y 48 horas (Hou *et al.*, 2012). La morfología colonial se comparó con los morfotipos reportados para *Salmonella typhimurium* al crecer en presencia de rojo Congo, para determinar si la coloración presentada por estos microorganismos se debía a la presencia de proteínas amiloides, celulosa, o ambos (Zogaj *et al.*, 2003). Se utilizó el medio YESCA para confirmar la presencia de proteínas amiloides (para 1000ml de agua destilada: ácidos casamino 10 g, extracto de levadura 1 g, bacto agar 20 g, rojo congo 20 mg, azul brillante G de Cumassie 10 mg) (Goulter *et al.*, 2010).

6.4.- Obtención de proteínas de membrana externa (PME).

Las cepas de *M. haemolytica* se cultivaron en medio líquido BHI-RC, durante 48 horas a 37°C, en condiciones estacionarias. Posteriormente las células se

concentraron por centrifugación a 10200 g/15 min. Las células se resuspendieron en amortiguador de lisis (HEPES 10 mM pH 7.4, lisozima 1mg/ml) y se incubaron durante 30 min a 37°C en agitación. Enseguida las células se rompieron por sonicación (equipo Sonics vibra-cell) (15 ciclos de 10 segundos, en baño de hielo). Las muestras sonicadas se centrifugaron a 16,300 g/2 min para separar las células que no se rompieron. El sobrenadante que contenía los restos de bacterias rotas se centrifugó a 16,300 g/30 min. La pastilla obtenida por esta centrifugación se homogenizo en 200 µl de HEPES 10 mM y 200 mM de HEPES con Tritón-X100 1%, se incubo a 37°C/30 min con agitación esporádica. Por último se centrifugo a 16,300 g/30 min., se conservó la pastilla obtenida que corresponde a la fracción enriquecida de proteínas de membrana externa está se lavó dos veces agregando 200 µl de HEPES, homogenizando y centrifugando a 16,300 g/5 min., las proteínas obtenidas se mantuvieron en congelación a -20°C, hasta su utilización (Abascal *et al.*, 2009).

6.5- Obtención de proteínas secretadas al medio (PS).

A los sobrenadantes libres de células, provenientes de cultivos en medio líquido, se les adicionó sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70% de saturación (472 gr/L) y se mantuvieron en refrigeración durante 24 h para precipitar las proteínas en solución. Las proteínas precipitadas se colectaron por centrifugación a 11, 400 g/30 min., se recuperó la pastilla y se homogenizo en Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM pH 7.5, se mantuvo en congelación hasta su uso (Negrete-Abascal *et al.*, 1998).

6.6.- Aislamiento de proteínas amiloides.

Las muestras de proteínas de membrana externa y las proteínas secretadas al medio se sometieron a un tratamiento selectivo, utilizando muestras de 200 µL a las cuales se les agregó el mismo volumen de ácido fórmico. Las mezclas se homogeneizaron y se incubaron en baño María a 95°C durante 15 minutos, después se centrifugaron a 16,300 g/5 min. Las pastillas restantes se lavaron tres veces con acetona, suspendiendo en 500 µL de acetona y centrifugando a las condiciones mencionadas anteriormente. Las muestras finalmente se homogenizaron en Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM pH 7.5, y se mantuvieron en congelación hasta su uso (Negrete-Abascal E. *et al.*, 2011).

6.7.- Electroforesis (SDS-PAGE).

Para determinar si se contaba con una o varias proteínas y para conocer su peso molecular relativo, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-

PAGE) al 10%. Previo a ser cargadas en el gel, las muestras se hirvieron durante 5 minutos en presencia de amortiguador de carga 6X y 5% de β -mercaptoetanol (β -ME). Previamente se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se cargaron 20 μ g de proteína por carril y se corrieron los geles a 90 V durante 120 min. Posteriormente las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie durante 15 min. El exceso de colorante se eliminó con solución desteñidora: ácido acético, metanol y agua (2:2:6) (Laemmli, 1970).

6.8.- Curva de calibración de Rojo Congo.

Para determinar la capacidad de unir el colorante RC por las cepas de *M. haemolytica*, se preparó una solución stock de colorante RC (5 mg/ mL) en amortiguador PBS. A partir de este stock se realizaron diluciones para tener concentraciones en el rango de 5 a 50 μ g/mL, estableciéndose concentraciones de RC a intervalos de 5 μ g/ mL. La absorbancia de cada dilución fue determinada por triplicado a 480 nm (Goulter *et al.*, 2010).

6.9.- Unión de rojo Congo.

De un cultivo de 24 h a 37°C, se realizó una suspensión bacteriana ajustando a una densidad óptica de 1.0 (\pm 0.2) a 600 nm. De esta suspensión se tomaron alícuotas de 1 ml, se centrifugaron a 16,300 g / 2 min, la pastilla se homogenizó en 1 ml de PBS/RC (50 μ g/ml) y se mantuvo en agitación constante durante media hora, posteriormente se centrifugó a 16,300 g/5 min. y se recuperó el sobrenadante, midiendo su absorbancia a 480 nm, los valores se interpolaron en la gráfica de calibración a fin de determinar la cantidad de colorante restante, para cada cepa se realizaron 10 repeticiones (Goulter *et al.*, 2010).

Adicionalmente, se realizaron ensayos de unión de RC a tiempos de 12, 24, 36 y 48 horas de cultivo con lo que se determinó la influencia del tiempo sobre la cantidad de unión de colorante.

6.10.- Anticuerpos policlonales.

Con el fin de contar con un antisuero policlonal contra las proteínas amiloides purificadas de *M. haemolytica*, se utilizaron conejos Nueva Zelanda Blancos proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Las condiciones de mantenimiento de los animales fueron de acuerdo a la NOM-062-Z00-1999. Los conejos se inocularon por vía subcutánea intraperitoneal: una inmunización y tres refuerzos a intervalos de 2 semanas. Las proteínas amiloides que se inocularon fueron obtenidas como se describió anteriormente y se

separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, se evidenciaron con una solución de KCl 0.5 M, en frío durante 5 minutos y se cortaron las bandas con proteínas. Las bandas se trituraron y deshidrataron a 37° C por 24 h; de cada muestra se tomaron 200 µg y se resuspendieron en 150 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) para la inmunización o adyuvante incompleto (Sigma-Aldrich) para los refuerzos y 300 µl de agua destilada estéril. Dos semanas después del último refuerzo, los conejos se anestesiaron con Pentobarbital sódico (40mg/Kg de peso corporal) administrado por vía intraperitoneal, para la obtención de la sangre de la vena cava (Montes-García, 2012).

6.11.- Inmunoreconocimiento (Western blotting)

Después de realizar SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 2 h a 280 mA con voltaje constante. Pasado este tiempo la membrana se incubó toda la noche en el refrigerador en una solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween 0.05%, para bloquear las uniones inespecíficas. Posteriormente la membrana se lavó en agitación tres veces en PBS-Tween con el fin de retirar el excedente de leche descremada. A continuación, se incubó en agitación durante 2 horas con el anticuerpo primario; se utilizaron anticuerpos policlonales anti-curli de *E. coli* (Xicoténcatl-Cortes *et al.*, 2010), anti- 42kDa de *G. anatis* (Negrete-Abascal *et al.*, 2011), el suero inmune que se obtuvo para estas proteínas y suero de conejos infectados con *M. haemolytica* A1, aislado de campo (Colín *et al.*, 1987). Todos los sueros se usaron a una dilución 1:1000 en PBS-Tween (Negrete-Abascal *et al.*, 2011).

Terminada la incubación se recuperó el anticuerpo y la membrana se lavó tres veces en agitación durante 10 minutos cada vez con PBS-Tween a temperatura ambiente. Enseguida la membrana de nitrocelulosa se incubó por 2 h en agitación a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 en PBS-Tween, después se lavó 3 veces y se procedió a evidenciar el reconocimiento con una solución de ácido fosfórico (50 mM, pH 7.4) que contenía 3, 3´ diaminobencidina (10 mg) y CoCl₂ y NiCl₂ (6 mg), la membrana se sumergió en esta solución y se le agregaron 30 µl de peróxido de hidrógeno (2.5 % p/v). La reacción se detuvo con agua destilada (Negrete-Abascal *et al.*, 1998, 1999).

6.13.- Microscopía electrónica.

Las bacterias cultivadas en placas con medio BHI-RC, durante 48 horas a 37°C y las proteínas amiloides purificadas se fijaron con glutaraldehído al 5% durante 2 horas y después se lavaron con PBS para retirar el excedente. Las muestras se

colocaron en rejillas de cobre recubiertas con carbón y Formvar; se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico de pH 7.4 al 1% P/V y fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM 2000 EX a 80 V (Negrete-Abascal *et al.* 2003).

6.14.- Inmunomarcaje

Las muestras previamente fijadas y colocadas en las rejillas de cobre, se mantuvieron inmersas en una gota de 1% de albúmina sérica de bovino, durante 2 horas con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, después se lavó la rejilla, colocando 50µl de PBS filtrado (Millipore 0.22 µm) y retirando por absorción con papel filtro, esto se repitió tres veces. Se utilizaron como anticuerpos primarios anti-curli de *E. coli* y el anticuerpo policlonal que se obtuvo en conejos contra las proteínas purificadas, en una dilución 1:20 en PBS filtrado. Las rejillas se incubaron toda la noche manteniéndolas inmersas en una gota de aproximadamente 50 µl. Posteriormente las muestras se lavaron y se incubaron toda la noche con anti-conejo acoplado a partículas de oro coloidal 1: 25, se lavaron y se les aplicó tinción negativa (Kai-Larsen *et al.*, 2010).

6.15.- Identificación de la proteína amiloide.

La proteína purificada se envió para su análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF) a la Unidad de Proteómica del CINVESTAV Unidad Irapuato. Posteriormente, al obtener los fragmentos peptídicos y el análisis de identidad, se realizó un análisis bioinformático. Primero se utilizó la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), para determinar si la proteína tenía homología con otras que tuvieran relación con proteínas amiloides. Adicionalmente se realizaron análisis bioinformáticos con la herramienta AGGREGSCAN (<http://bioinf.uab.es/aggrescan/>) para determinar capacidad de formar agregados por esta proteína y con la herramienta WALTZ (http://www.switchlab.org/training/itc#WALTZ_amyloid_prediction) para predecir la presencia de péptidos amiloides dentro de la secuencia de la proteína.

7.- RESULTADOS.

Unión de colorante rojo Congo.

Una de las principales propiedades de las proteínas amiloides es su capacidad de teñirse con colorante RC. Para demostrar la existencia de proteínas de este tipo en *M. haemolytica*, las diferentes cepas utilizadas se cultivaron en presencia de este colorante, y se utilizaron cepas de *Salmonella typhimurium* y EPEC como controles positivos de la expresión de proteínas amiloides (figura 5).

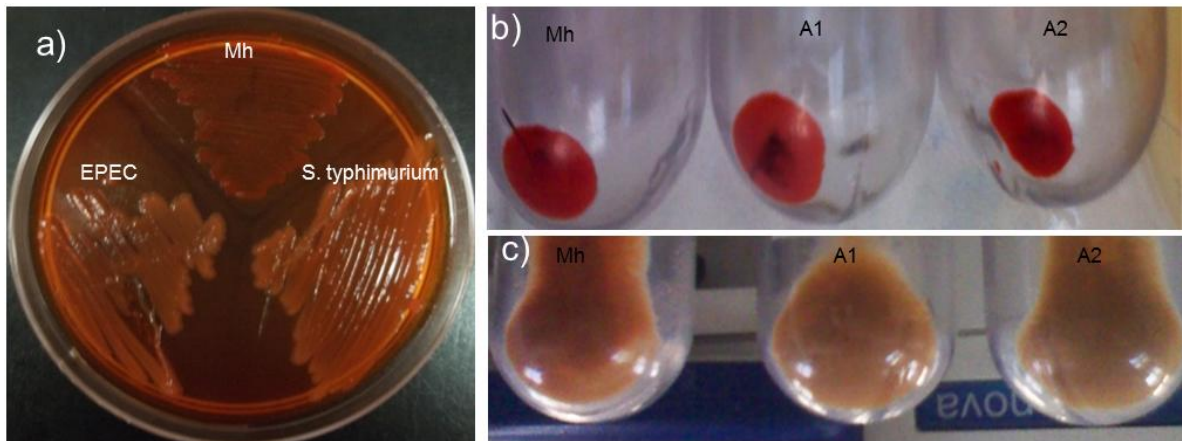


Figura 5.- a) Crecimiento en agar con RC de *M. haemolytica* ATCC 31612 (Mh). *S. typhimurium* y EPEC fueron usadas como control positivo de la expresión de proteínas amiloides. b) *M. haemolytica* ATCC 31612 (Mh) y cepas aisladas de bovino (A1) y ovino (A2) durante 48 h a 37 °C en medio líquido con RC, c) proteínas secretadas en el medio. El color rojo es indicio de la presencia de proteínas amiloides.

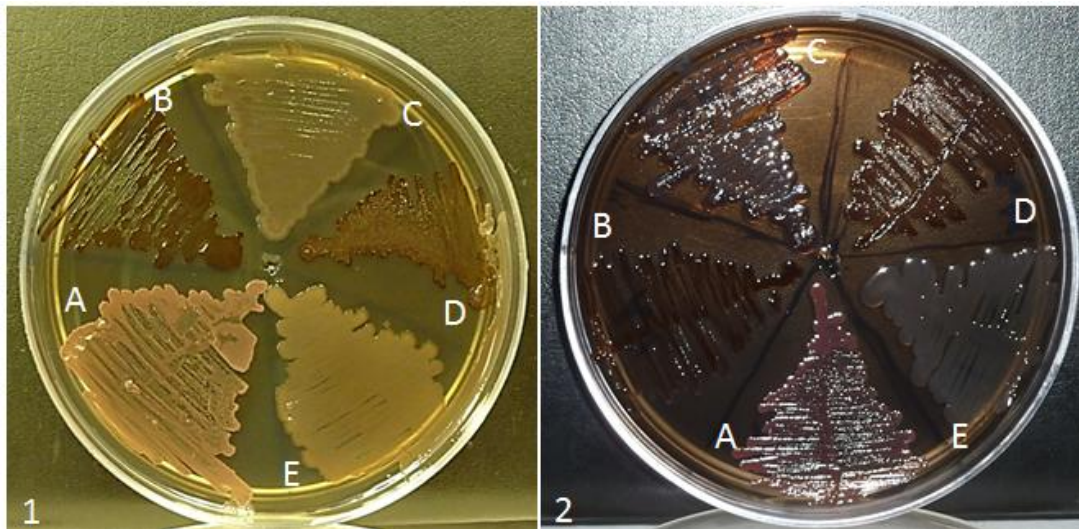


Figura 6.- Crecimiento de *M. haemolytica* durante 48 h a 37 °C para determinar la naturaleza del componente que une RC. 1) Agar BHI-RC y 2) agar YESCA; A) *E. coli* DH5- α (control negativo), B) *M. haemolytica* (cepa A1), C) *M. haemolytica* (cepa A2), D) cepa *M. haemolytica* (cepa ATCC 31612) y E) ETEC (control positivo).

Purificación de proteínas amiloides a partir de PSM y PS.

Una vez que se demostró la unión de RC por *M. haemolytica* se procedió a obtener proteínas de membrana externa de las diferentes cepas así como a concentrar las proteínas secretadas al medio, encontrándose que el colorante permanece unido a una proteína de aproximadamente 40 KDa, aún después de ser separada electroforéticamente (Figura 7).

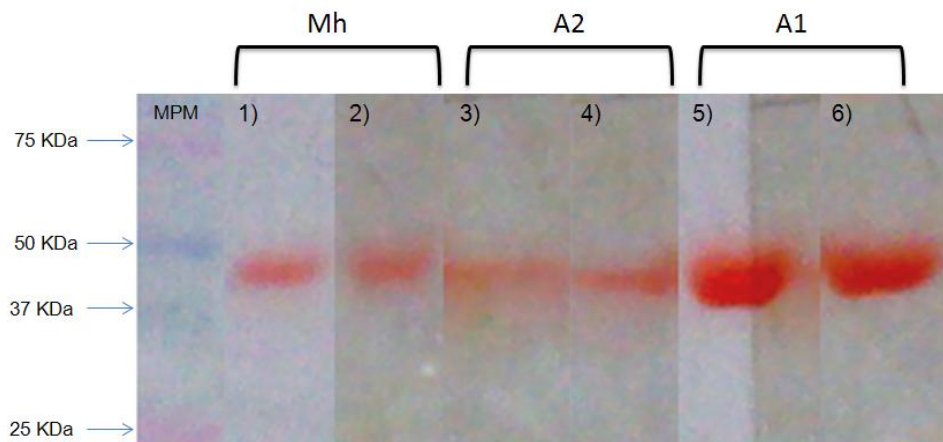


Figura 7.- Gel SDS-PAGE 10%, sin pintar con azul de Coomassie en los que se observa la separación de bandas de aproximadamente 40 KDa, teñidas con RC, provenientes de proteínas de membrana externa (carriles nones) de las cepas Mh, A2 y A1 y las proteínas concentradas del sobrenadante (carriles pares).

Después de observar que entre las proteínas de membrana externa (PME) existía una que unía rojo Congo, las muestras de PME se trataron con ácido fórmico, con el fin de determinar si esta correspondía a una de tipo de proteína amiloide, ya que las proteínas de este tipo resisten la digestión con ácido fórmico. Después de este tratamiento y de la separación de las proteínas resistentes por SDS-PAGE, se pudo observar una de aproximadamente 40 kDa (Figura 7) para las muestras provenientes de las tres cepas de *M. haemolytica*. Una banda de tamaño similar también fue observada en la muestra de ETEC utilizada como control positivo (Figura 8), sometida al mismo tratamiento. Además de la banda de 40 kDa, se observó un agregado de alto peso molecular en el gel concentrador de todas las muestras procesadas (óvalo), sugiriendo un aglomerado de proteína que no pudo entrar en el gel. Como una forma de determinar la relación entre las proteínas de *E. coli* y Mh como proteínas amiloides, se pudo observar una reactividad cruzada al utilizar un suero hiperinmune de conejo que reconoce a la proteína curlina (proteína amiloide de *E. coli*) en un Western blot. Este antisuero también presentó reactividad cruzada con las proteínas de alto PM de las cepas Mh y A1, que no lograron entrar al gel (Figura 8).

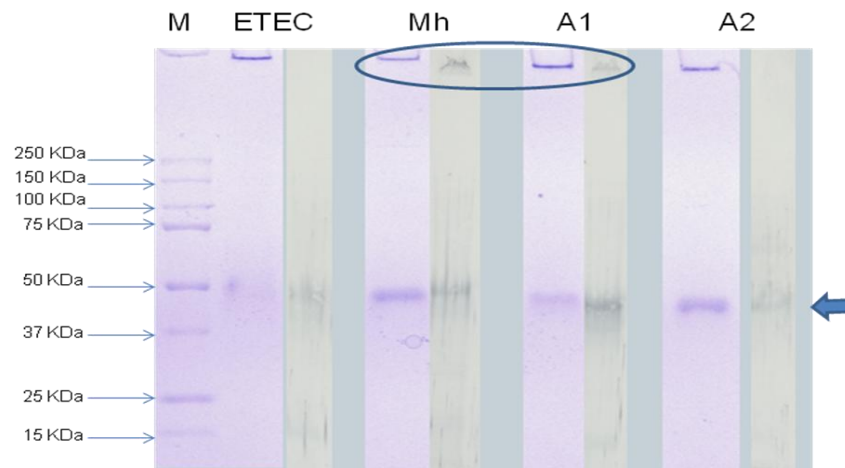


Figura 8.- Proteína amiloide purificada de ETEC y de las cepas de *M. haemolytica*: Mh, A1 y A2 de izquierda a derecha, obtenidas por tratamiento con ácido fórmico y su inmunoreconocimiento por suero anti-curli de *E. coli* (flecha). El óvalo muestra qué parte de la proteína forma agregados de alto peso molecular.

Cuantificación de la capacidad de unión de rojo Congo.

Teniendo evidencia de que las cepas de *M. haemolytica* expresan una proteína amiloide, se procedió a determinar de manera indirecta la etapa de crecimiento del cultivo en la que las cepas de *M. haemolytica* unen la mayor cantidad de colorante RC. La capacidad de unir RC por parte de las diferentes cepas de *M. haemolytica* se realizó por un ensayo en líquido. La cepa A1 fue la que mostró una mayor capacidad de unir RC. Todas las cepas tuvieron su máxima unión al colorante, en la fase estacionaria del cultivo (Figura 9).

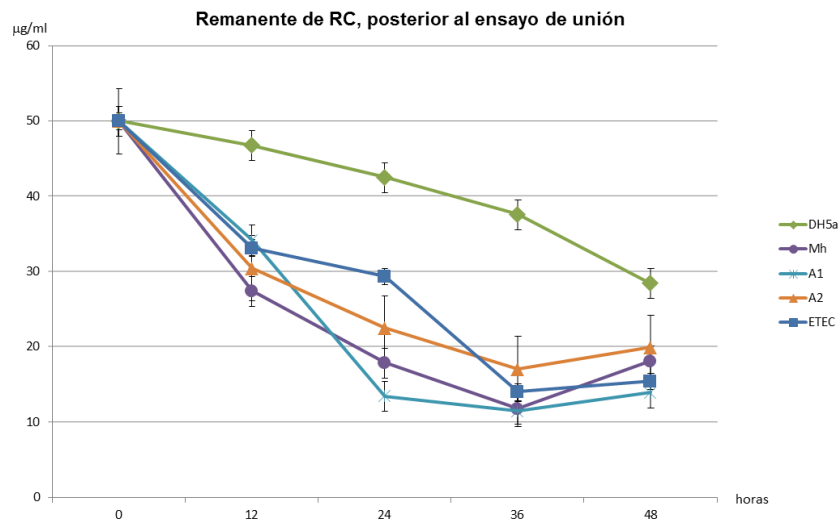


Figura 9.- Ensayo de la capacidad de unión de rojo Congo por las cepas de *M. haemolytica*. Las bacterias se cultivaron en BHI a 37°C, en agitación constante durante 48 horas se utilizó como control positivo la cepa ETEC y como control negativo *E. coli* DH5α.

Inmunoreconocimiento (Western blotting)

La proteína amiloide se purificó en cantidad suficiente para inmunizar conejos con el fin de obtener sueros contra ella. Con este anti-suero se procedió a probar su especificidad. Como controles del inmuno reconocimiento se utilizaron sueros de conejo anti curli de *E. coli* y suero de conejo contra una proteína amiloide de *G. anatis*. Este inmunoreconocimiento se realizó utilizando proteínas totales, proteínas de membrana externa y proteínas obtenidas del sobrenadante. Se determinó que los anti-sueros reconocían una sola proteína de aproximadamente 40 KDa en las tres mezclas de proteínas (figuras 10,11 y 12).

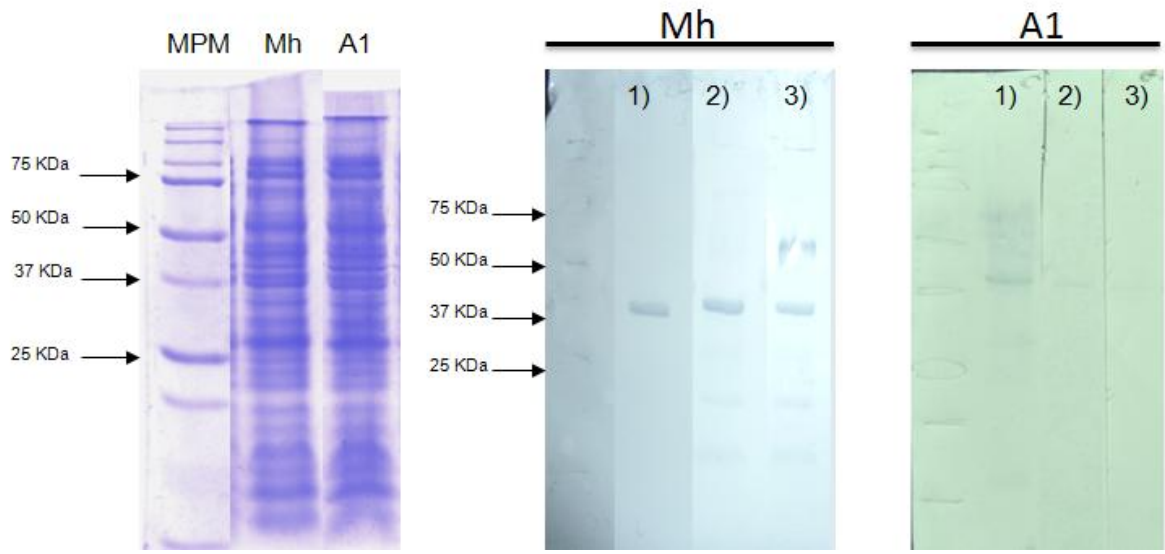


Figura 10.- SDS-PAGE al 10%, mostrando el patrón de proteínas de extractos totales a partir de las cepas *M. haemolytica* ATCC 31612 (Mh) y la cepa de campo *M. haemolytica* A1. Inmunoreconocimiento por sueros anti-curli (1), anti proteína amiloide de *G. anatis* (2) y por el suero obtenido contra la proteína fimbrial amiloide de *M. haemolytica* ATCC 31612 (3).

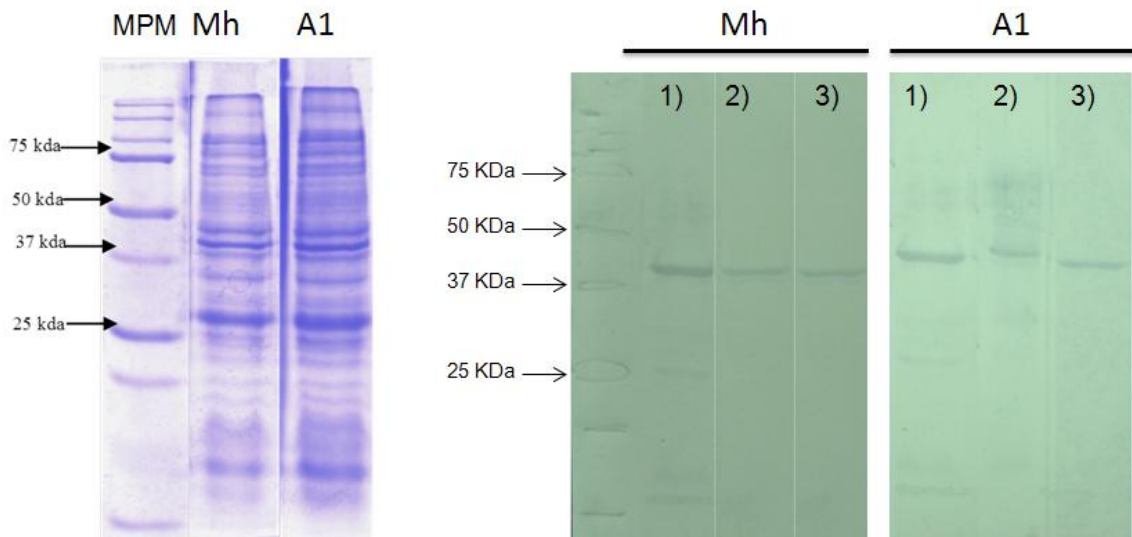


Figura 11.- SDS-PAGE al 10%, mostrando el patrón de proteínas de membrana externa a partir de las cepas *M. haemolytica* ATCC 31612 (Mh) y la cepa de campo *M. haemolytica* A1. Inmunoreconocimiento por sueros anti-curli (1), anti proteína amiloide de *G. anatis* (2) y por el suero obtenido contra la proteína fimbrial amiloide de *M. haemolytica* ATCC 31612 (3).

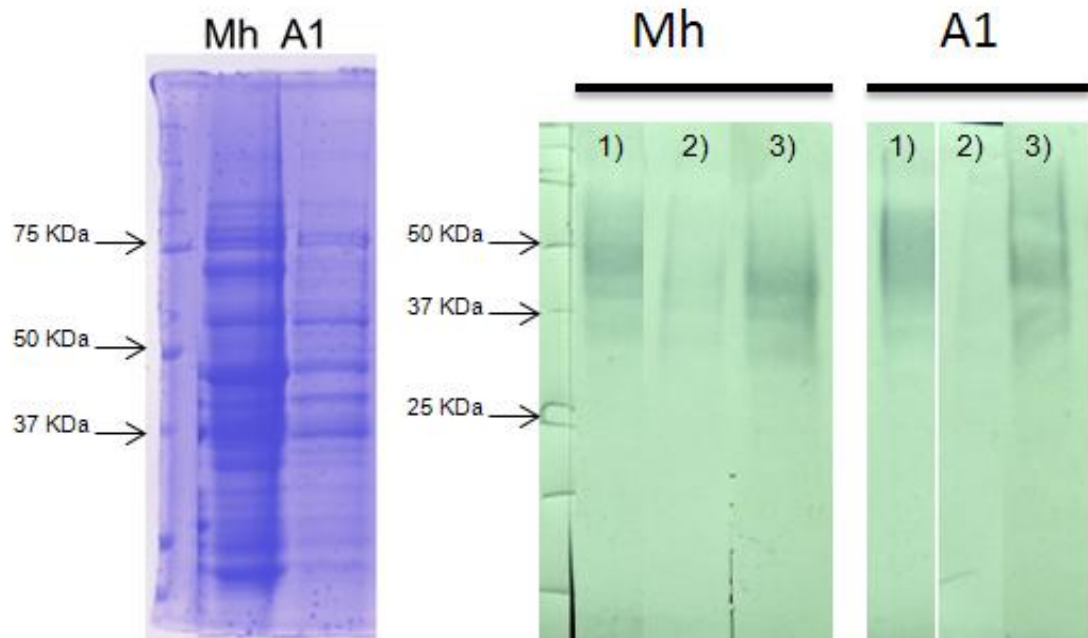


Figura 12.- SDS-PAGE al 10%, mostrando el patrón de proteínas secretadas al medio a partir de las cepas *M. haemolytica* ATCC 31612 (Mh) y la cepa de campo *M. haemolytica* A1. Inmunoreconocimiento por sueros anti-curli (1), anti proteína amiloide de *G. anatis* (2) y por el suero obtenido contra la proteína fimbrial amiloide de *M. haemolytica* ATCC 31612 (3).

Adicionalmente se realizó un inmunoreconocimiento de la proteína purificada utilizando suero de conejo inmunizado con *M. haemolytica* A1 aislado de campo (Colín et al., 1987). Las proteínas purificadas de las cepas *M. haemolytica* ATCC 31612 y las cepas de campo serotipos A1y A2 fueron reconocidas por el suero; esto sugiere que esta proteína tiene propiedades inmunogenicas (figura 13).

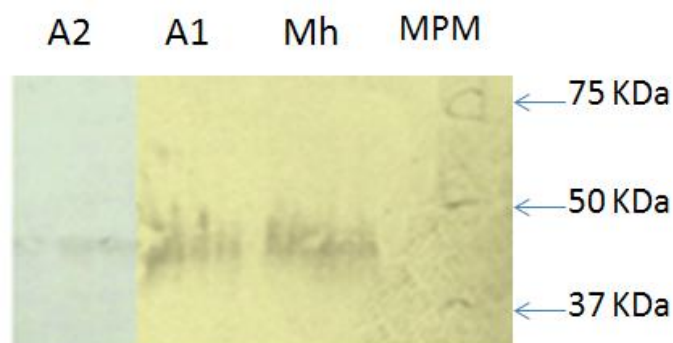


Figura 13.- Proteínas amiloides purificadas de *M. haemolytica* ATCC 31612(Mh), cepas de campo serotipos A1 (A1) y A2 (A2) reconocida por suero de conejo inmunizado con *M. haemolytica* A1, aislado de campo.

Microscopía electrónica e inmunomarcaje.

Para determinar la presencia de la proteína amiloide y conocer la forma en la que se encuentra en la superficie de la bacteria se realizaron observaciones por microscopía electrónica de transmisión. Para ello se empleó el antisuero contra la proteína amiloide de *M. haemolytica* ATCC 31612 y anticuerpos anti-conejo acoplados a partículas de oro coloidal. En las siguientes figuras se observa que la proteína forma filamentos de diferentes extensiones y que son muy delgados; además a un mayor aumento se puede observar que también existen agregados amorfos rodeados por el anticuerpo (Figuras 14).

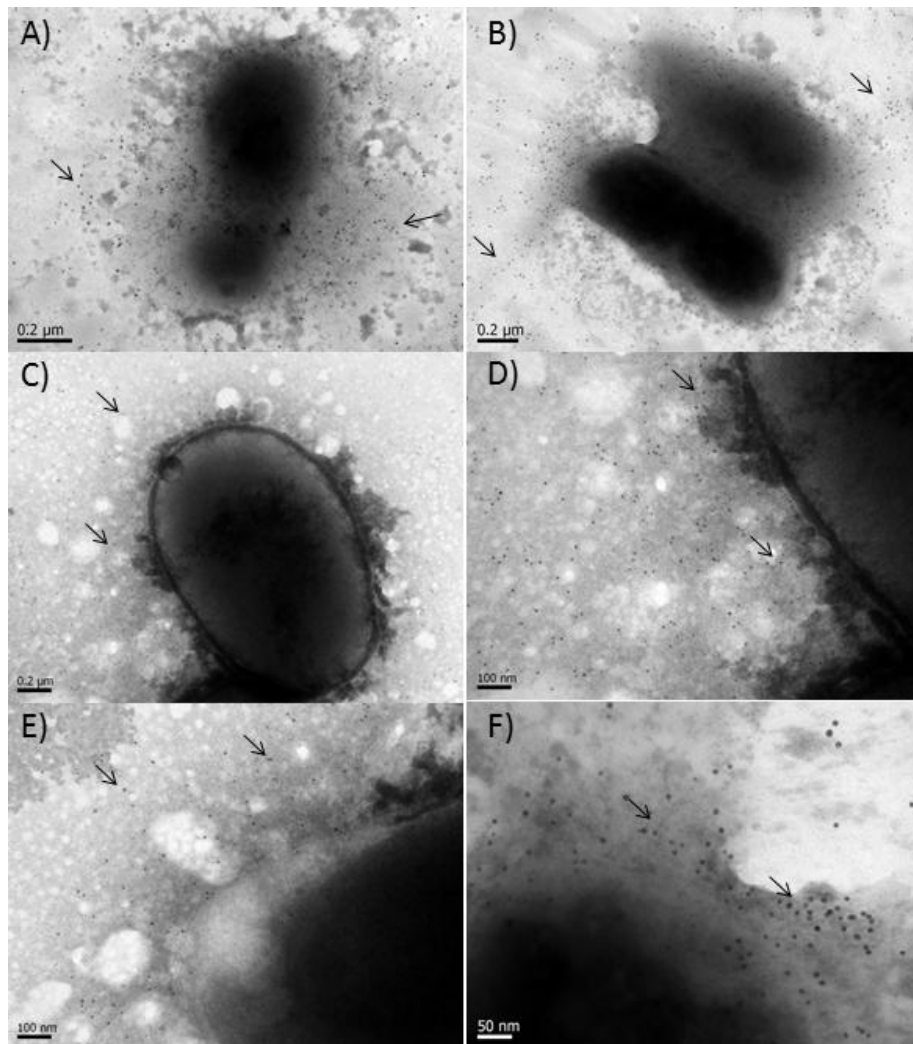


Figura 14.- Imágenes de microscopía electrónica de transmisión con flechas que indican el inmunomarcaje sobre estructuras filamentosas y amorfas, utilizando como anticuerpo primario el suero contra la proteína OmpP2-like de *M. haemolytica* ATCC 31612. (A y E) cepa *M. haemolytica* ATCC 31612, (B y D) *M. haemolytica* serotipo A1 y (C y F) *M. haemolytica* serotipo A2.

Análisis MALDI-TOF

El análisis por espectrometría de masas de la proteína purificada indicó que presenta identidad con una proteína de membrana de *M. haemolytica* ATCC 31612 de 353 aminoácidos (Figura 16). Un análisis adicional utilizando la herramienta informática BLAST indicó que esta secuencia presenta identidad con una proteína de membrana denominada P2 (Figura 17) que ha sido descrita en diversos miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

```
1 MKKTLVALAV TAF AASASAT TVYDAEGSKV DFDGSLRIVL DRTNSKELDN
51 HNVVTKKDA HTGIRNTGSR FGVRVKHDLA QDFYALGRVE FRFNKNTSDD
101 GFGDLYTKRA YVGLGSKQYG ELTFGRQVTI ADDLSQSVDY NYGINPKGDY
151 IQTDGNQVIR YNYRGENLH VSANYNFAQD RKDGEVLANK LQNAYGIGAL
201 YTVDNWDLRA AYGHTNYKTA TDSTKHKDGD VLGSVGYKFG DLKLSVDSGY
251 RHEKVENKKG NAFYVSPNFE YQVVPASKVY GNYLYEREKV KKSKEKTHG
301 FLLGVVDYQFH KQVVAFVEGS YTRTKDYNKV TNGYEYTGKS TNKAIGVGMR
351 VYW
```

Figura 15.- Secuencia reportada por el análisis MALDI-TOF de la proteína amiloide purificada de *M. haemolytica* ATCC 31612. Las letras en rojo corresponden a los péptidos obtenidos en éste análisis.

Especies	Proteína	Identidad (%)	Acceso NCBI
<i>Mannheimia haemolytica</i> D35	membrane protein	100	WP_021280575.1
<i>Mannheimia haemolytica</i> serotype A2 str. OVINE	membrane protein	99	WP_006250496.1
<i>Mannheimia haemolytica</i> USDA-ARS-USMARC-185	Outer membrane protein P2-like protein	91	WP_015484625.1
<i>Mannheimia varigena</i>	Outer membrane protein P2-like protein	91	WP_025217393.1
<i>Actinobacillus suis</i>	membrane protein	66	WP_014991497.1
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	membrane protein	61	WP_009874692.1
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	membrane protein	58	WP_005698635.1

Figura 16.- Proteínas homólogas de diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae* con las cuales presenta identidad la proteína amiloide de *M. haemolytica* ATCC 31612 analizada por BLAST.

Análisis *in silico*.

Por medio de un análisis, utilizando la herramienta bioinformática AGGRESCAN, se identificaron 8 péptidos de la proteína que pudieran conferirle la capacidad de formar agregados (Figura 18) y utilizando la herramienta bioinformática WALTZ, se determinó la presencia de 9 péptidos con propiedades amiloides (Figura 19).

Posición en la secuencia	Fragmento peptídico agregativo
1-20	MKKTLVALAVTAFASASAT
86-90	LGRVE
106-111	YTKRAY
195-205	YGIGALYTVDN
232-242	LGSVGYKFGDL
268-282	NFEYQVVPASKVYGN
302-319	LLGVDYQFHKQVVAFVEG
346-353	GVGMRVYW

Figura 17, resultado del análisis con la herramienta bioinformática AGGDESCAN, que muestra los péptidos que tienen propiedades agregativas de la proteína amiloide de *M. haemolytica* ATCC 31612.

```
>gi|528821638|gb|EPY98621.1|
MKKTLVALAVTAFASASATTVYDAEGSKVDFDGLRIVLDRITNSKELDNHNVVKTKKDA

HTGIRNTGSRFGVRVKHDLAQDFYALGRVEFRFNKNTSDDGFGDLYTKRAYVGLGSKQYG
*****
ELTFGRQVTIADDLSQSVDYNYGINPKGDYIQTDGNQVIRYNYRQVENLHVSANYNFAQD
*****
RKDGEVLANKLQNA YGIGALYTVDNWDLRAAYGHTNYKTATDSTKHKRKGVLGSGVYKFG
*****
DLKLSVDSGYRHEKVENKKGNAFYVSPNFEYQVVPASKVYGNLYEREKVKKVSKEKTHG
*****
FLLGVDYQFHKQVVAFVEGSYTRTKDYNKVTNGYEYTGKSTNKAIGVGMRYW
*****
```

Figura 18.- Resultado del análisis con la herramienta bioinformática WALTZ, que muestra los 8 péptidos con propiedades amiloides (asteriscos) dentro de la secuencia de la proteína amiloide de *M. haemolytica* ATCC 31612.

8.- Discusión.

Mannheimia haemolytica, es reconocida como uno de los agentes causales de la neumonía en bovinos (Lo R.Y., 2001). Aunque ya se ha secuenciado su genoma, lo que brinda mayor información acerca de sus componentes celulares en la información con la que se cuenta sobre sus factores de virulencia, no se describen genes homólogos que codifiquen a las proteínas amiloides del tipo curli, pero esto no descartaría la presencia de alguna proteína fibrilar con propiedades amiloides.

La adhesión y colonización de tejidos es uno de los eventos clave de cualquier infección, lo que le permitirá a cualquier microorganismo resistir los mecanismos de “limpieza” o “desalojo”, inmunes o no, permitiendo con ello la persistencia microbiana en un hospedero (Clarke *et al.*, 2001); sin embargo, aún no se describen los mecanismos específicos de esta adhesión. En el caso de las proteínas curli de *E. coli* se sabe que tienen capacidades de adhesión y que esa es una de sus funciones en las bacterias (Larsen *et al.*, 2007). También se ha demostrado que la excreción de estas proteínas está regulada en las bacterias. En el caso de *E. coli* su excreción está determinada por las condiciones del medio ambiente; por ejemplo, bajas temperaturas, baja tención de oxígeno y largos periodos de incubación favorecen la expresión de estas fibras, ayudando a la supervivencia de la bacteria al favorecer la formación de biopelícula (Barnhart and Chapman, 2006). En este trabajo se encontró que la incubación a 37°C por 48 horas implica una baja temperatura para *M. haemolytica*, puesto que la temperatura corporal de su hospedero bovino es 39°C (Posadas *et al.*, 2005).

Con respecto a la morfología colonial en presencia del colorante RC, se muestra que las colonias adquieren un color rojo carmín intenso, además que su textura se vuelve pastosa, con mucha plasticidad, esto se ve acentuado en la cepa A1 y menos en la cepa A2. La cepa ATTC 31612 de *M. haemolytica*, muestra una coloración intermedia (Figura 5), pero las cepas de A1 y A2 son claramente más coloridas que nuestros controles de *E. coli* y *Salmonella typhimurium.*, lo cual podría ser un indicador de que la proteína amiloide está presente en mayor cantidad en las cepas de *M. haemolytica*, bajo estas condiciones ensayadas. Esta relación entre coloración y cantidad de proteína ya fue descrita por Blanco *et al.* en 2012 en enterobacterias, ellos hicieron un recuento de la información generada hasta ese momento en el que cabe resaltar que existe una diferencia entre la coloración que adquieren en presencia y ausencia de estas proteínas amiloides, así como debida a la presencia de celulosa, compuesto que también se une al colorante. Con esta información y con los datos obtenidos (Figura 6) se puede aseverar que la tinción de las cepas de *M. haemolytica* son debidas a la

presencia de proteínas amiloides y no de celulosa, ya que en el medio YESCA la presencia de proteínas amiloides resulta en un color púrpura.

Sin embargo, no se ha descrito si la interacción colorante-proteína es permanente. En la Figura 7 se muestra cómo después de la separación electroforética de proteínas de membrana externa y proteínas secretadas, el colorante se mantiene en un peso aproximado de 50 KDa, lo que aparentemente indica que el colorante sirve como indicador de la presencia de proteínas amiloides en un gel SDS-PAGE. Resultados similares fueron observados en un trabajo previo en el que Negrete-Abascal y colaboradores (2011) describieron una proteína amiloide en *G. anatis*.

Se han descrito diferentes maneras de purificar proteínas amiloides bacterianas; sin embargo, un método de separación práctico es utilizar sus propiedades bioquímicas como la resistencia a la desnaturalización por temperatura y pH. En este trabajo se utilizó una variante simplificada del método estandarizado y descrito por Zhou y colaboradores en el 2012. Esta técnica se adecuó de manera simple porque en este trabajo se describen por primera vez proteínas de este tipo en *M. haemolytica* y no se requería de métodos tan específicos como los que se han descrito para aislarlas de bacterias entéricas.

Con respecto a la proteína purificada (Figura 8), ésta frecuentemente tiene un peso aproximado de 40 KDa. Se menciona esta característica porque una de las propiedades de las fibras amiloides bacterianas es que tienen la capacidad de auto agregarse a pH 7.0 (Collinson *et al.*, 1991) lo cual constantemente influye en el peso de la proteína, como se muestra en la Figura 7. En la figura se puede apreciar que además de la proteína purificada, se observan en el pozo del gel SDS-PAGE agregados de alto peso molecular, que a juzgar por el inmunoreconocimiento por suero anti-curli, muestran que son del mismo tipo amiloide. También se sabe que los monómeros que conforman a las fibras amiloides en enterobacterias son de pesos inferiores a los 25 KDa (Goulter, *et al.*, 2010), lo cual nos sugiere que la de *M. haemolytica* no necesariamente es una proteína homóloga a las fibras amiloides descritas en enterobacterias.

También se observó que en el caso del control positivo *E. coli* la cantidad de muestra recuperada es muy poca y el inmunoreconocimiento también es pobre (Figuras 8). Esto se explica debido a que las condiciones del experimento eran óptimas para *M. haemolytica* (37°C); sin embargo, *E. coli* requiere una temperatura de 26°C para expresar curli (Zogaj, *et al.*, 2003).

Debido a que la presencia de fibras curli en *E. coli* (Hammar *et al.*, 1996) y fibras TAF en *Salmonella typhimurium* (Collinson *et al.*, 1991) requieren de amplios periodos de incubación ya que estas estructuras están producidas como estrategia de supervivencia y conducen a la formación de biopelículas, en *M. haemolytica* se procedió a buscar el tiempo necesario para que exprese proteínas amiloides. Encontramos que éstas se expresan en mayor cantidad en la fase estacionaria de crecimiento como se muestra en la Figura 9. Esto sugiere que su producción podría también formar parte de mecanismos de supervivencia y adaptación al medio en el que se encuentra. Para el caso de la cepa A1, que fue la que en ensayos de unión de RC mostró la mayor unión de colorante, a las 36 horas de incubación, al final del tiempo de incubación se observó que aparentemente disminuye la unión de colorante; sin embargo, esto es debido a que a largos periodo de incubación en caldo, las cepas comienzan a formar biopelículas que dificultan mantener la concentración constante de 1.0 DO para la realización de los ensayos, como se indica el método descrito por Goulter y colaboradores en 2010.

Utilizando los anticuerpos policlonales obtenidos en conejo: anti-curli de *E. coli*, anti- proteína amiloide de *G. anatis* y anti-proteína amiloide de *M. haemolytica*, se realizó una serie de inmunoreconocimientos para determinar la reactividad cruzada de los patrones de proteínas de extractos totales, proteínas de membrana externa y proteínas secretadas (Figuras 10,11 y 12), esto con la intención de saber si solo la reactividad cruzada correspondía a la proteína purificada. Encontramos que los anticuerpos reconocen en todos los patrones una proteína de aproximadamente 40 KDa, mismo peso de la proteína amiloide purificada, determinando así la especificidad de los anticuerpos, aunque en el caso de las proteínas secretadas el reconocimiento se mostró difuso debido a la presencia de sales.

Este ensayo además nos permitió establecer que la proteína amiloide purificada de *M. haemolytica* tiene fragmentos de secuencia que comparte con proteínas amiloides como la de *E. coli* o de *G. anatis*. Esto sin embargo no es concluyente debido a que en la naturaleza existe una gran variedad de péptidos que bajo ciertas condiciones podrían formar agregados fibrilares amiloides (Chen *et al.*, 2014).

Adicionalmente se realizó un inmunoreconocimiento utilizando suero de conejos inmunizados con la cepa *M. haemolytica* A1, aislada de campo (Colín *et al.*, 1987), contra la proteína purificada de *M. haemolytica* (Figura 13). El reconocimiento positivo sugiere que la proteína OmpP2-like, tiene propiedades inmunogénicas.

Por observaciones de microscopia electrónica las células muestran filamentos de longitudes variables (Figuras 14); en las imágenes se puede observar que su origen se encuentra en la membrana externa y que pueden estar también en forma de mechones de filamentos de corta longitud, cuya función podría ser recubrir a la célula, ya que se tiene reportado que una de las funciones asociadas a estas fibras es proporcionar una protección contra el medio ambiente, por ser consideradas el soporte estructural de biopelículas, así como también por funcionar como adhesinas (Barnhart *et al.*, 2006). También se pueden observar filamentos de grandes longitudes que al parecer tienen formas más rígidas y rectas que se proyectan de la superficie de la célula y que en la parte periférica se entrelazan para formar fibras de mayor grosor. Esto puede sugerir la participación de esta proteína amiloide en la estructuración y formación de biopelículas, tal como fue descrito por Blanco y colaboradores en 2010, trabajando con *E. coli*.

Los fragmentos obtenidos por MALDI-TOF (Figura 15) fueron analizados por BLAST (Figura 16) para determinar su identidad y con ello identificar de qué proteína se trataba. La secuencia obtenida indica que se trata de una proteína OmpP2-like, proteína que ha sido descrita y agrupada en la familia de las porinas, proteínas membranales que están asociadas con el transporte de iones. También se ha descrito su participación en la variación antigénica de *Haemophilus influenzae* y más recientemente, al analizar las proteínas que forman el biofilm en este microorganismo, se identificó la presencia de OmpP2 como parte del biofilm (Wu *et al.*, 2014). Esta información refuerza nuestra hipótesis de que la proteína encontrada en *M. haemolytica* participa en la formación de biopelícula.

Dado el gran avance en bioinformática, ahora se cuenta con herramientas computacionales capaces de resolver algunas cuestiones relacionadas con la estructura y bioquímica de las proteínas. En el presente trabajo se utilizaron dos herramientas que han resultado ser muy confiables para la determinación de dos propiedades, características de las proteínas amiloides: a) la capacidad agregativa; para lo cual se utilizó el programa AGRESCAN, mediante el cual se determinó que la proteína cuenta con 9 péptidos, a lo largo de su secuencia, con alta capacidad agregativa (Figura 17); b) la capacidad de formar laminas β (Figura 18), para lo cual se utilizó el programa WALTZ. Estos análisis nos indican que la proteína OmpP2-like cuenta con 8 péptidos amiloides en su secuencia. Los resultados obtenidos con estas herramientas bioinformáticas apoyan que esta proteína posee capacidad de formar fibras y mantener su estructura. Las herramientas utilizadas fueron diseñadas para predecir, con base en las propiedades químicas de los aminoácidos, la capacidad de formar láminas β , principal constituyente de las proteínas amiloides, así como la capacidad de los

aminoácidos de interactuar con otros aminoácidos aun después de adquirir su estructura conformacional terciaria (Chen *et al.*, 2014).

La formación de biopelícula es un evento crucial en la patogenicidad bacteriana, la estructuración y los materiales para su formación no son un mecanismo único, las sustancias poliméricas que se han descrito en bacterias corresponden principalmente a polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos; que proporcionan la estabilidad mecánica de las biopelículas, median su adhesión a superficies y forman una red de polímero cohesivo tridimensional que interconecta y transitoriamente inmoviliza las células en la biopelícula (Flemming *et al.* 2010).

Las células en un biofilm están rodeadas de sustancias exopoliméricas (EPS), que constituyen el entorno inmediato de estas células. Algunas EPS, en particular las cápsulas que forman, están asociadas más estrechamente con las superficies celulares, que otras. La formación y el mantenimiento de las comunidades microbianas multicelulares estructuradas, dependen de la producción y la cantidad de EPS. La concentración, cohesión, carga, capacidad de sorción, especificidad y naturaleza de los componentes individuales de EPS, así como la arquitectura tridimensional de la matriz (las áreas densas, poros y canales), determinan el modo de vida en un biofilm dado (Sutherland 2001).

La morfología de la biopelícula resultante puede ser lisa y plana, áspera, suave y esponjosa o filamentosa, y el biofilm también puede variar en su grado de porosidad. Todas estas morfologías tienen el mismo efecto: inmovilizar transitoriamente las células en la biopelícula y permitir la existencia a largo plazo de especies que incluso pueden ser comunidades mixtas, esto proporciona hábitats muy diversos en pequeña escala, lo que favorece la biodiversidad (Romero *et al.*, 2010)

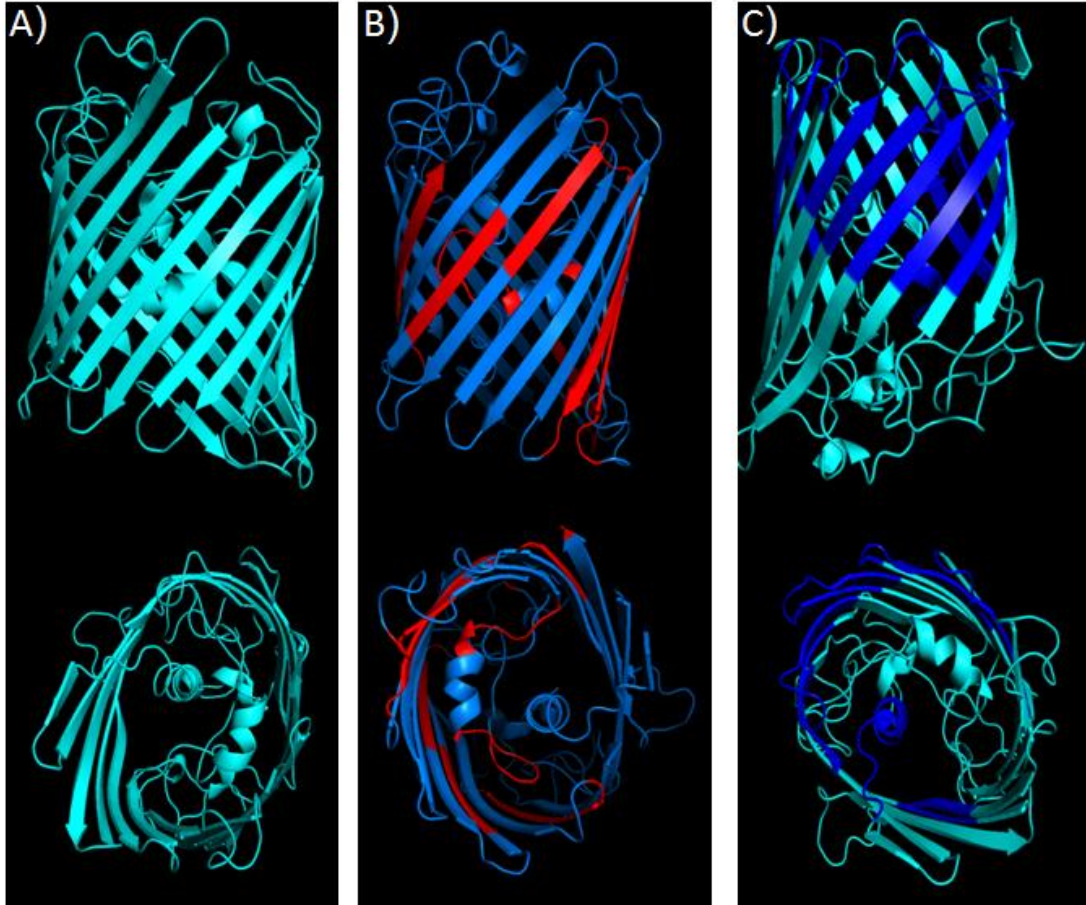
Es posible que la proteína OmpP2-like forme parte de la estructuración de la biopelícula, debido a que sus características bioquímicas nos indican que puede polimerizar en forma de fibras de tipo amiloide, lo cual sería un factor muy importante para la formación de la biopelícula, que en *M. haemolytica* aún no se describe, pero se sabe que forma biopelículas (Olson *et al.* 2002). Debido a que se demostró que la proteína ompP2-like tiene capacidad inmunogénica, es posible que juegue un papel importante en la enfermedad. Un estudio más profundo de esta proteína podría concluir en algún método de prevención de este microorganismo oportunista.

9.- Conclusiones

- 1.- Las cepas de *M. haemolytica* expresan una proteína de aproximadamente 40 KDa que une colorante rojo Congo.
- 2.- La proteína amiloide de *M. haemolytica* presenta reactividad cruzada con sueros anti-curli de *E. coli* y suero contra una proteína amiloide de *G. anatis* y es reconocida por suero de animales inmunizados con *M. haemolytica* A1, aislado de campo, sugiriendo su capacidad inmunogénica.
- 3.- Por Inmunomarcaje y microscopía electrónica, se observó reconocimiento de estructuras fimbriales en la superficie de las cepas de *M. haemolytica* utilizadas en este proyecto.
- 4.- La proteína amiloide de *M. haemolytica* ATCC 31612 presentó identidad con una proteína de membrana externa (P2) de diversos microorganismos y el análisis *in silico* de esta secuencia indicó que la proteína posee capacidad auto agregativa y péptidos amiloides.

10.- Perspectivas

- Comprobar la participación de la proteína Omp2-like de *M. haemolytica* en la formación de biopelículas.
- Evaluar la capacidad inmunogénica y protectora de esta proteína en modelos animales.
- Obtener y caracterizar una cepa mutante carente de OmpP2 y determinar cómo esta proteína participa en la patogénesis.

11. – Anexo. Modelo Computacional 3D de OmpP2-like.

A) Modelo obtenido con Phyre2 a partir de la secuencia de ompP2-like. B) Color rojo indica la distribución de los fragmentos peptídicos amiloides y C) Color azul indica la distribución de los péptidos con propiedades agregativas. (Cartoons realizados con PyMol).

12.- Literatura citada

Abascal EN, Guerra AC, Vázquez AS, Tenorio VR, Cruz CV, Zenteno E, Contreras GP, Pacheco SV. (2009) Identification of iron-acquisition proteins of *Avibacterium paragallinarum*, *Avian Pathol.* 38, 209-213.

Barnhart MM and Chapman MR. (2006) Curli biogenesis and function, *Annu Rev Microbiol.* 60, 131–147

Blackall PJ, Bojesen AM, Christensen H, et al. (2007) Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*; 57:666-674.

Blanco LP, Evans ML, Smith DR, Badtke MP, Chapman MR. (2012) Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends Microbiol*, 20:66-73

Bisgaard M.(1993) Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. *Zentralbl. Bakteriol.* 279, 7-26.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*72:248-254.

Bonaventura M, Lee E, De Salle R and P Planet. (2010). A whole-genome phylogeny of the family *Pasteurellaceae*. *Mol Phylogenet Evol.* 54:950-956.

Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, Normark, S, and Hultgren SJ. (2002). Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation, *Science* 295, 851–855.

Chen S, Gao S, Cheng D, Huang J. (2014). The characterization and comparison of amyloidogenic segments and non-amyloidogenic segments shed light on amyloid formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 447:255-262.

Christensen H. (2005). Systematics of selected members of the bacterial family *Pasteurellaceae* associated with animals. Thesis. Doctoral of Veterinary Science. The Royal Veterinary and Agricultural University Copenhagen.

Christensen H. and Bisgaard M. (2008). Taxonomy and Biodiversity of Members of *Pasteurellaceae*. In Kuhnert P, Christensen H, editors. *Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.

Clarke JM, Morton RJ, Clarke CR, Fulton RW, Saliki JT. (2001) Development of an ex vivo model to study adherence of *Mannheimia haemolytica* serovar 1 to mucosal tissues of the respiratory tract of cattle. *Am J Vet Res* 62:805–811.

Confer AW. (2009) Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev*; 10:145-148.

Colín F, Jaramillo I, Aguilar F, Trigo F, Merino M.(1987) Serotipos de *Pasteurella haemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos en México. *Rev Lati-Am Microbiol*; 29:231-234.

Collinson, SK, Emody L, Muller KH, Trust TJ, and Kay WW. (1991) Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*, *J Bacteriol* 173, 4773–4781.

Collinson SK, Doig PC, Doran JL, Clouthier S, Trust TJ, and Kay WW. (1993). Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin, *J Bacteriol.*175, 12–18.

Collinson SK, Parker JM, Hodges RS, and Kay WW. (1999). Structural predictions of AgfA, the insoluble fimbrial subunit of *Salmonella* thin aggregative fimbriae, *J Mol Biol.* 290, 741–756

Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, and Reid KB. (1987) Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients, *Proc Natl Acad Sci USA.* 84, 8628–8632.

Czuprynski CJ. (2009) Host response to bovine respiratory pathogens. *Anim Health Res Rev*; 10:141-143.

Evans ML, Chapman MR. (2013). Curli biogenesis: Order out of disorder. *Biochim Biophys Acta.*1843, 1551–1558.

Fedorova ND and Highlander SK. (1997). Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin. *Infect Immun.* 65:2593-2598.

Flemming H, Wingender J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 8:623–633.

Fulton RW, Cook BJ, Step DL, et al. (2002). Evaluation of health status of calves and impact on feedlot performance: assessment of retained ownership program for postweaning calves. *Can J Vet Res*;66: 173–180.

Glenner GG and Wong CW. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem Biophys Res Commun.* 120, 885–890.

Gophna U, Oelschlaeger TA, Hacker J, Ron EZ (2009). Role of fibronectin in curli-mediated internalization. *FEMS Microbiol Lett.* 212, 55-58.

Goulter RM, Gentle IR, Dykes GA. (2010). Characterisation of Curli Production, Cell Surface Hydrophobicity, Autoaggregation and Attachment Behaviour of *Escherichia coli* O157. *Curr Microbiol.* 61:157-162.

Griffin D. (2000) Bovine pasteurellosis and other bacterial infections of the respiratory tract. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 26, 57-71.

Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsen A, Normark S. (1995). Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 18:661–670.

Hammar M, Bian Z, Normark S. (1996). Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6562–6566

Hodgins DC, Shewen PE. (2004). *Pasteurella* and *Mannheimia* spp. infections. In: Coetzer JAW, Tustin RC, editors. 2nd edition, *Infectious disease of livestock*, 3. Cape Town (South Africa): Oxford University Press. p. 1672–1676.

Hogg JS, Hu FZ, Janto B, Boissy R, Hayes J, Keefe R, Post JC, Ehrlich GD. (2007) Characterization and modeling of the *Haemophilus influenzae* core and supragenomes based on the complete genomic sequences of Rd and 12 clinical nontypeable strains. *Genome Biol.* 8:R103.

Hou W, Sun X, Wang Z, Zhang Y. (2012). Biofilm-Forming Capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from Ocular Infections. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53:5624-5631

Jaworski MD, Hunter DL and Ward AC, (1998). Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. *J. Vet. Diagn. Inv.* 10:49-55.

Kai-Larsen Y, Lüthje P, Chromek M, Peters V, Wang X, et al. (2010) Uropathogenic *Escherichia coli* Modulates Immune Responses and Its Curli Fimbriae Interact with the Antimicrobial Peptide LL-37. *PLoS Pathog* 6: 1-16.

Katsuda K, Kamiyama M, Kohmoto M, Kawasshima K, Tsunemitsu H and Eguchi M. (2007). Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia:1987-2006. *Vet J.* 178:146-148.

Kimizuka R, Kato T, Hashimoto S, Yamanaka-Okada A, Okuda K, Ishihara K. (2009). Congo Red-binding Protein in Rough-phenotype *Aggrgatibacter actinomycetemcomitans* is Amyloid-like fiber. *Bull Tokyo Dent Coll.* 50:23-29.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Larsen P, Nielsen JL, Dueholm MS, Wetzel R, Otzen D, Nielsen PH. (2007) Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ. Microbiol.* 9, 3077–3090

Lekeu P. (1996). Bovine respiratory disease complex. *Ann Med. Vet.* 140: 101-105.

Lo RY. (2001). Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet. Microbiol.* 83:23-35.

Montes García J. Fernando. (2012). Determinación de condiciones de movilidad *in vitro* de *Gallibacterium anatis*. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios superiores Iztacala, UNAM.

Murphy GL, Robinson LC and Burrows GE. (1993). Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. *J. Clin. Microbiol.* 31:2303-2308.

Narayanan S, Nagaraja T, Chengappa M and Stewart G. (2002). Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet. Microbiol.* 84:337-356.

Negrete-Abascal E, Tenorio VR, Guerrero AL, García RM, Reyes ME and M. de la Garza. (1998). Purification and characterization of protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Can J Vet Res.* 62: 183-190.

Negrete-Abascal E, Tenorio VR and M. De la Garza. (1999). Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Curr Microbiol.* 38:64-67.

Negrete-Abascal E, Reyes ME, García RM, Vaca S, Girón JA, García O, Zenteno E, De La Garza M. (2003) Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol.* 185: 664-668.

- Negrete-Abascal E., Montes García F., Vaca S., Villamar T. and Vázquez C.** (2011). Expression of amyloid proteins type curly by *Gallibacterium anatis*. International Pasteurellaceae conference. 24-27 August. Elsinore, Denmark.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR.** (2010). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.*66:86-92.
- Perutz MF, Finch JT, Berriman J, Lesk A.** (2002). Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5591–5595.
- Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch J.** (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5355–5358
- Posadas E.** et. al. (2005). Sistema de Producción Animal I volumen 2 Bovinos. Edit. DSUAEC 6-8.
- Prusiner SB.** (1996) Molecular biology and pathogenesis of prion diseases, *Trends Biochem Sci.* 21, 482–487
- Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE** (2007) *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev.* 8:117-28
- Romero D, Aguilar C, Losick R and Kolter R.** (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms, *Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 2230–2234.
- Samaniego B., María Luisa, Contreras J., José Luis, Jaramillo Arango, Carlos Julio, Aguilar Romero, Francisco, Vázquez Navarrete, Jesús, Hernández Castro, Rigoberto, Suárez Güemes, Francisco, Trigo Tavera, Francisco.** (2012). Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Mannheimia haemolytica* aisladas de exudado nasal de bovinos productores de leche. *Vet Méx OA;* 43, 2.
- Singh K, Ritchey JW and Confer AW.** (2011). *Mannheimia haemolytica*: Bacterial–Host Interactions in Bovine Pneumonia. *Vet Pathol.* 48. 338-348
- Sutherland IW.** (2001). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9, 222–227
- Thumbikat P, Briggs RE, Kannan MS, Maheswaran SK.** (2003) Biological effects of two genetically defined leukotoxin mutants of *Mannheimia haemolytica*. *Microb. Pathog.*; 34:217-26.

Trigo TF. (1991). Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. *Vet. Méx.* 22:131-134.

Trigo TF. (1987). El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *C. Vet.* 4:1-36.

Welsh RD, Dye LB, Payton ME, et al. (2004) Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994–2002. *J Vet Diagn Invest*; 16:426.

Wu S, Baum MM, Kerwin J, Guerrero D, Webster S, Schaudinn C, VanderVelde D, Webster P. (2014). Biofilm-specific extracellular matrix proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Phatol Dis.* 0, 1–18.

Xicohtencatl-Cortes J, Saldaña Z, Deng W, Castañeda E, Freer E, Tarr PI, B. Brett Finlay, Puente JL, and Girón J. (2010). Bacterial Macroscopic Rope-like Fibers with Cytopathic and Adhesive Properties. *J. Biol. Chem.* 285. 42, 32336–32342.

Zhou Y, Blanco LP, Smith DR, Chapman MR. (2012). Bacterial Amyloids. *Methods in Molecular Biology. Methods and Protocols Amyloid Proteins* 2nd ed. 2012 *Methods Mol Biol.* 849:303-320.

Zogaj X, Bokranz W, Nimtze M, Romling U. (2003). Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 71:4151–4158.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://bioinf.uab.es/aggrescan/>

http://www.switchlab.org/training/itc#WALTZ_amyloid_prediction

<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>

<http://www.pymol.org/>