



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

---

---



**“Respuesta al estrés por hierro de *Actinobacillus seminis*”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGO**

PRESENTA

**EDMUNDO REYES MALPICA**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL**

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2018



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.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por haberme permitido llegar hasta aquí, por su confianza, cariño y todo el apoyo que he recibido de ellos, muchísimas gracias.

A mi familia Judith y Naone, por la paciencia y el gran apoyo que he recibido de ustedes, son una parte importante de este logro.

A mis hermanas, en particular a Graciela, por rifarse y apoyarnos a los tres para concluir nuestra licenciatura.

Al señor Bulmaro y la señora Susana, por el apoyo brindado estos últimos años, a mi cuñado Daniel gracias por la ayuda y buenos consejos.

Al Dr. Erasmo por el apoyo, la paciencia, consejos y todas sus enseñanzas durante mi estancia en el laboratorio de Genética de la UMF.

Al Dr. Sergio y la Maestra Alina, por todo su apoyo y sabios consejos, muchas gracias.

A mis compañeros de Laboratorio Fernando, Omar, Pamela, por toda la ayuda y consejos, Maestro Fernando gracias por compartir tus conocimientos con todos nosotros.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética de la UMF de la FES Iztacala, UNAM con el apoyo de DGAPA-UNAM PAPIIT IN215616 y PAPCA FESI-UNAM-2016-3.

## INDICE

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1. Epididimitis ovina.....	7
2.2. Descripción de <i>A. Seminis</i> .....	7
2.3. Factores de virulencia.....	8
2.4. Importancia del hierro.....	9
2.5. Mecanismos bacterianos de captación de hierro.....	10
2.6. Mecanismos directos de captura de hierro.....	11
2.7. Mecanismos indirectos de captura de hierro.....	12
3. ANTECEDENTES.....	13
4. JUSTIFICACIÓN.....	15
5. OBJETIVOS.....	15
5.1. Objetivo general.....	15
5.2. Objetivos particulares.....	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1. Cultivos.....	16
6.2. Crecimiento a diferentes concentraciones de 2,2-dipiridil.....	16
6.3. Cinética de crecimiento bacteriano.....	16
6.4. Obtención de proteínas de membrana externa (OMP's).....	16
6.5. Obtención de proteínas secretadas.....	17
6.6. Electroforesis.....	17
6.7. Inmunoreconocimiento.....	17

6.8. Identificación de proteínas mediante Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDITOF).....	18
7. RESULTADOS.....	18
8. DISCUSIÓN.....	23
9. CONCLUSIONES.....	28
10. PERSPECTIVAS.....	28
11. BIBLIOGRAFÍA.....	29

## 1. RESUMEN

La epididimitis ovina es una enfermedad infecciosa que ocasiona atrofas en los testículos y el epidídimo de carneros. Es causada por *Brucella ovis*, *Histophilus somni* o *Actinobacillus seminis*. Provoca una disminución de la fertilidad y/o esterilidad de los animales, y por consiguiente, pérdidas económicas en el sector ganadero. En particular, los mecanismos de virulencia utilizados por *A. seminis* son desconocidos. En el presente trabajo se estudió la respuesta de *A. seminis* al crecer en un medio con baja concentración de hierro. La adición del agente quelante de hierro 2,2-dipiridil al medio de cultivo provocó una disminución de aproximadamente el 40% del crecimiento de *A. seminis* en comparación con el cultivo control. La adición de 2'2-dipiridil a cultivos de *A. seminis* indujo la expresión de al menos 3 proteínas de 75, 50 y 25 kDa, las cuales al ser analizadas por espectrometría de masas presentan identidad con diferentes proteínas involucradas en la síntesis de sideróforos y otras funciones relacionadas con virulencia.

La reactividad cruzada de estas proteínas y otras más con diversos antisueros y hemoglobina o lactoferrina biotiniladas sugiere varios mecanismos de adquisición de hierro por *A. seminis*. El conocimiento de los mecanismos de captación de hierro y la identidad de las proteínas involucradas en ellos, ayudará a entender los mecanismos patogénicos de *A. seminis*.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Epididimitis ovina

La epididimitis es una enfermedad caracterizada principalmente por la inflamación del epidídimo y la degeneración de los testículos en carneros, es considerada importante por sus efectos negativos sobre la fertilidad del rebaño (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Entre los agentes relacionados con el desarrollo de esta enfermedad además de *Actinobacillus seminis*, se encuentran varias especies de bacterias, tales como *Brucella ovis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni* (Genetzky, 1995).

Está documentado que la epididimitis ovina debida a *A. seminis* es una de las principales causas de pérdidas económicas dentro de la industria ovina, ya que interfiere con la fertilidad de los animales infectados (Dos santos *et al.*, 2014). Por lo general, la ruta de entrada de este microorganismo es una herida en la mucosa genital; sin embargo, la ruta no ha sido investigada adecuadamente (Nuñez-del-Arco *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que *A. seminis* es un microorganismo oportunista presente en la cavidad prepucial, capaz de colonizar las partes profundas del tracto genital. Se ha observado que la lesión traumática del epidídimo, la subsiguiente liberación de histamina y la colección de pequeñas cantidades de fluidos ricos en proteínas, favorecen la colonización por esta bacteria (Acosta *et al.*, 2006).

El primer aislamiento de *A. seminis* fue reportado por Baynes y Simmons (1960) en Australia. Posteriormente la bacteria se aisló en varias ocasiones en diferentes países; en México, el primer caso de epididimitis causada por esta bacteria se notificó en 1979, en animales importados de Nueva Zelanda (Pérez *et al.*, 1979). Desde entonces siguen los reportes de aislados de esta bacteria a partir de semen de ovejas que presentaban signos de epididimitis clínica (Aguilar-Romero *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2015).

### 2.2. Descripción del microorganismo

*A. seminis* es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* (Koneman *et al.*, 2006). Es considerada parte de la microbiota permanente o transitoria del tracto reproductivo de los ovinos, aunque también causa infecciones ascendentes en diferentes órganos del tracto genitourinario, afectando la vejiga urinaria, el conducto deferente, las glándulas bulbouretrales, las vesículas seminales y el epidídimo (Moustacas *et al.*, 2014),

causando así el desarrollo de enfermedades como la epididimitis, particularmente en ovejas jóvenes (Acosta *et al.*, 2006).

*A. seminis* es una bacteria pleomórfica, no móvil, no esporulada. Es anaerobia facultativa con metabolismo fermentativo y crece óptimamente en medios enriquecidos con sangre o suero y atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 37°C. Forma colonias pequeñas de color gris tenue después de 24 horas de incubación. Después de 48 horas de incubación sus colonias son blancas y grandes (1 a 2 mm de diámetro), pasadas las 72 horas, la forma de las colonias se vuelve irregular (Koneman *et al.*, 2006; Núñez-del-Arco *et al.*, 2006).

Bioquímicamente *A. seminis* se caracteriza por ser oxidasa, catalasa y reacción de ornitina descarboxilasa positivas, reduce nitrato, no hidroliza urea y es fosfatasa negativa. Produce ácido a partir de glucosa, maltosa, manitol, arabinosa, galactosa e inositol, pero no a partir de sacarosa, lactosa, xilosa, trehalosa y sorbitol. No crece en agar McConkey y no produce indol (Appuhamy *et al.*, 1997; Koneman *et al.*, 2006). Se ha observado que algunas cepas son sensibles a la penicilina, estreptomycin, cloranfenicol, aureomicina, tetraciclinas, eritromicina, sulfonamidas y novobiocina pero resistentes a la bacitracina y a la neomicina (De Wet *et al.*, 1982).

### 2.3. Factores de virulencia

Existen diferentes factores de virulencia involucrados en los mecanismos de patogenicidad durante los procesos de una infección bacteriana, algunos de estos participan en la adherencia, la movilidad, la evasión de la respuesta inmune, la secreción de proteasas, entre otros (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014; Byarugaba *et al.*, 2007).

El estudio de los factores de virulencia expresados por *A. seminis* ha sido escaso, Schaller *et al.*, 2000, reportaron la expresión de proteínas de menor masa molecular a las asociadas a una probable toxina de tipo RTX, sin embargo ésta no ha sido caracterizada. En microvesículas de esta bacteria se ha identificado una proteína con un peso molecular de 75 KDa, misma que demostró ser inmunógena y aparentemente específica de especie (Núñez-del-Arco *et al.*, 2006). Por otra parte Jiménez-Pacheco y colaboradores en 2008, en un estudio con cepas de *A. seminis*, reportaron una proteína de un peso molecular de 59 KDa con actividad proteolítica presente en microvesículas. A su vez, De la cruz en 2015, identificó una metaloproteasa de un peso molecular de 75-100 KDa secretada por *A. seminis* ATCC 15768, la cual fue capaz de

degradar IgG y fibrinógeno de ovino, razones por las cuales estas proteasas podrían ser importantes en la patogénesis de *A. seminis*.

#### 2.4. Importancia del hierro

El hierro constituye un componente esencial para el crecimiento de las bacterias, es un factor importante para llevar a cabo los procesos metabólicos básicos debido a que forma parte de algunas proteínas que participan en la síntesis de pirimidinas y aminoácidos; en la cadena respiratoria es un cofactor importante debido a su potencial redox; además, en ciertos casos, determina la capacidad de una bacteria de establecerse en el hospedero (Ratledge y Dover, 2000).

El hierro tiene dos estados de oxidación conocidos como ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). La conversión reversible del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , así como su facultad de integrarse como ligando en complejos coordinados, hacen del hierro un elemento ideal en las reacciones de transporte electrónico acopladas a la generación de energía y a la replicación del ADN; sin embargo, la elevada concentración de estos iones puede tener efectos tóxicos o letales en las células, por inhibición de procesos metabólicos (por ejemplo, la respiración anaeróbica) o por acumulación de radicales libres generados en los procesos de reducción química (Reyes *et al.*, 2005; Chantes *et al.*, 2012).

Las bacterias necesitan de una concentración de hierro comprendida entre  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  M, lo cual significa que una célula requiere del orden de  $10^5$  a  $10^6$  iones de hierro por generación para poder crecer (Pradel *et al.*, 2000; Wandersman y Stojiljkovic, 2000). En condiciones aerobias el hierro se encuentra en su forma reducida  $\text{Fe}^{2+}$ , que es lo suficientemente soluble como para que pueda ser capturado por las bacterias sin necesidad de mecanismos especializados (Braun y Killmann, 1999), de igual forma el  $\text{Fe}^{2+}$  es soluble a pH fisiológico y las células lo obtienen sin mucha dificultad a partir del medio externo. En condiciones de acidez (pH 3), la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  soluble es de  $10^{-8}$  M, suficiente para cubrir las necesidades de las bacterias acidófilas (Chantes *et al.*, 2012).

Sin embargo, en las mucosas y tejidos de los organismos superiores la concentración de hierro libre es de alrededor de  $10^{-18}$  M (Ratledge y Dover, 2000). Esta baja concentración y la limitación de la disponibilidad de hierro afectan al crecimiento de prácticamente cualquier especie microbiana. Los organismos superiores disponen de mecanismos encargados de mantener un bajo nivel extracelular de hierro, basados en ciertas proteínas que secuestran los

iones de hierro, como transferrinas, hemoglobina, hemopexina, ferritina y albúmina (Garrido, 2005; Monter, 2010).

Varias de estas proteínas se encuentran en el plasma y líquido linfático; existen tres tipos de transferrinas: la serotransferrina, que se encuentra en la sangre y la linfa, la lactoferritina, que se localiza en el interior de neutrófilos y en la mayoría de fluidos corporales: seminales, intestinales, saliva, leche, etcétera; la ovotransferrina, que se halla en la albúmina de los huevos (Ratledge y Dover, 2000). La hemoglobina es una proteína encargada del transporte de oxígeno en los glóbulos rojos; cuando hay recambio de estos o hemólisis, el hemo se une a una proteína denominada hemopexina; una parte pequeña de las moléculas de hemo se desintegra en protoporfirina y hierro, éste último se une a la transferrina y se almacena en la ferritina. La ferritina es la principal proteína de almacenamiento de hierro, se encuentra localizada en la mayoría de los tejidos animales y es abundante en el hígado. La albúmina es una proteína del plasma sanguíneo que puede unir hasta diez átomos de hierro, es una proteína globular que constituye aproximadamente el 60% de las proteínas totales del plasma (Otto *et al.*, 1992; Genco y Dixon, 2001).

Se sabe que durante el proceso de infección por algún patógeno bacteriano, éste puede adquirir directamente todos los nutrientes que necesita del huésped que infecta, a excepción del hierro (Ratledge y Dover, 2000), la adquisición de hierro es uno de los principales pasos en su desarrollo dentro del huésped ya que determinará su supervivencia. Como respuesta a la baja disponibilidad de hierro, las bacterias utilizan varias estrategias para adquirir competitivamente el hierro del ambiente interno del hospedero, a través de la expresión de distintos factores de virulencia (Chantes *et al.*, 2012).

## 2.5. Mecanismos bacterianos de captación de hierro

Los sistemas de captación de hierro por parte de las bacterias patógenas, tanto Gram negativas como Gram positivas, pueden agruparse en dos mecanismos: los de interacción directa con los iones de  $Fe^{2+}$  o con las proteínas que lo acomplejan y lo transportan (transferrina, lactoferrina, hemoglobina) y los de interacción indirecta, que implican la síntesis y liberación de moléculas de bajo peso molecular llamadas sideróforos que son agentes quelantes de hierro (Ratledge y Dover, 2000). Además de estos mecanismos, algunas bacterias producen enzimas extracelulares que incrementan la eficacia de estos sistemas debido a que sintetizan proteasas con la capacidad de degradar las proteínas transportadoras de hierro del hospedero (Genco y Dixon, 2001).

## 2.6. Mecanismos directos de captura de hierro

Debido a la alta solubilidad de los iones de  $Fe^{2+}$  bajo condiciones anaerobias o reductoras y en pH ácidos, las bacterias pueden disponer directamente de ellos a través de la libre difusión, mediante porinas presentes en bacterias Gram negativas, hacia el espacio periplásmico. El transporte de  $Fe^{2+}$  del espacio periplásmico hacia el citosol se encuentra mediado por el complejo de membrana ABC (ATP binding cassette) (Andrews *et al.*, 2003; Wandersman y Delepelaire, 2004).

Los receptores de moléculas que transportan el hierro (transferrina, lactoferrina) se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram negativas o en la pared celular de las Gram positivas, como en el caso de *Staphylococcus epidermitis* y *S. aureus*, quienes expresan receptores de transferrina en su pared celular (Modun y Williams, 1999). En muchas bacterias patógenas pertenecientes a las familias *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae* se han descrito dos proteínas muy conservadas y específicas que reconocen únicamente las transferrinas o lactoferrinas de su hospedero habitual. Dichas proteínas se denominan TbpA y TbpB si reconocen la transferrina y LpbA y LpbB si reconocen la lactoferrina (Morton y Williams, 1989; Fuller *et al.*, 1998).

La proteína TbpA es un receptor de membrana externa dependiente de TonB. Presenta la misma afinidad por las transferrinas cargadas con moléculas de hierro como por las apotransferrinas. La proteína TbpB es una lipoproteína que produce un aumento de la eficacia de captación de hierro. El mecanismo de acción de estas proteínas consiste en que inicialmente la proteína TbpB reconoce la transferrina cargada con moléculas de hierro, luego la presenta a un dímero formado por dos proteínas, la TbpA, integral y anclada en la membrana, y la TbpB, unida a la membrana, pero proyectada hacia el exterior, el hierro es liberado de la transferrina y la proteína TbpA introduce el hierro al periplasma, utilizando la energía proporcionada por el sistema ExbB-ExbD-TonB. Desde el periplasma pasa al citoplasma mediante un sistema de transporte de tipo ABC que viene dado por las proteínas Fbp ( $Fe^{3+}$  Binding Protein) (Schryvers y Stojiljkovic, 1999; Khun *et al.*, 1998).

En cuanto a la captación de hemoproteínas (hemoglobina, hemopexina y haptoglobina) se ha descrito un mecanismo que consiste en la unión directa del grupo hemo y/o hemoproteínas mediante receptores de membrana. Los receptores remueven el grupo hemo de las hemoproteínas y permiten su transporte activo a través de la membrana externa hacia el periplasma mediante el complejo TonB. El grupo hemo presente en el espacio periplásmico es

transportado en contra de un gradiente hacia el citosol mediante el complejo ABC, donde será degradado por una hemoxigenasa permitiendo la liberación del  $Fe^{2+}$ . El transporte del hemo hacia el citosol no requiere proteínas periplásmicas, como ocurre con el  $Fe^{3+}$  y sideróforos (Schryvers y Stojiljkovic, 1999; Andrews *et al.*, 2003).

Además de estos mecanismos, algunos patógenos producen enzimas extracelulares que aumentan la eficacia de estos sistemas, sintetizando proteasas extracelulares que degradan a las proteínas transportadoras de hierro del huésped, un ejemplo de esto es *Porphyromonas gingivalis*, que sintetiza la proteinasa Kgp, que se une a hemoglobina, hemopexina y transferrina y las degrada, generando por tanto hemoglobina libre (Genco y Dixon, 2001).

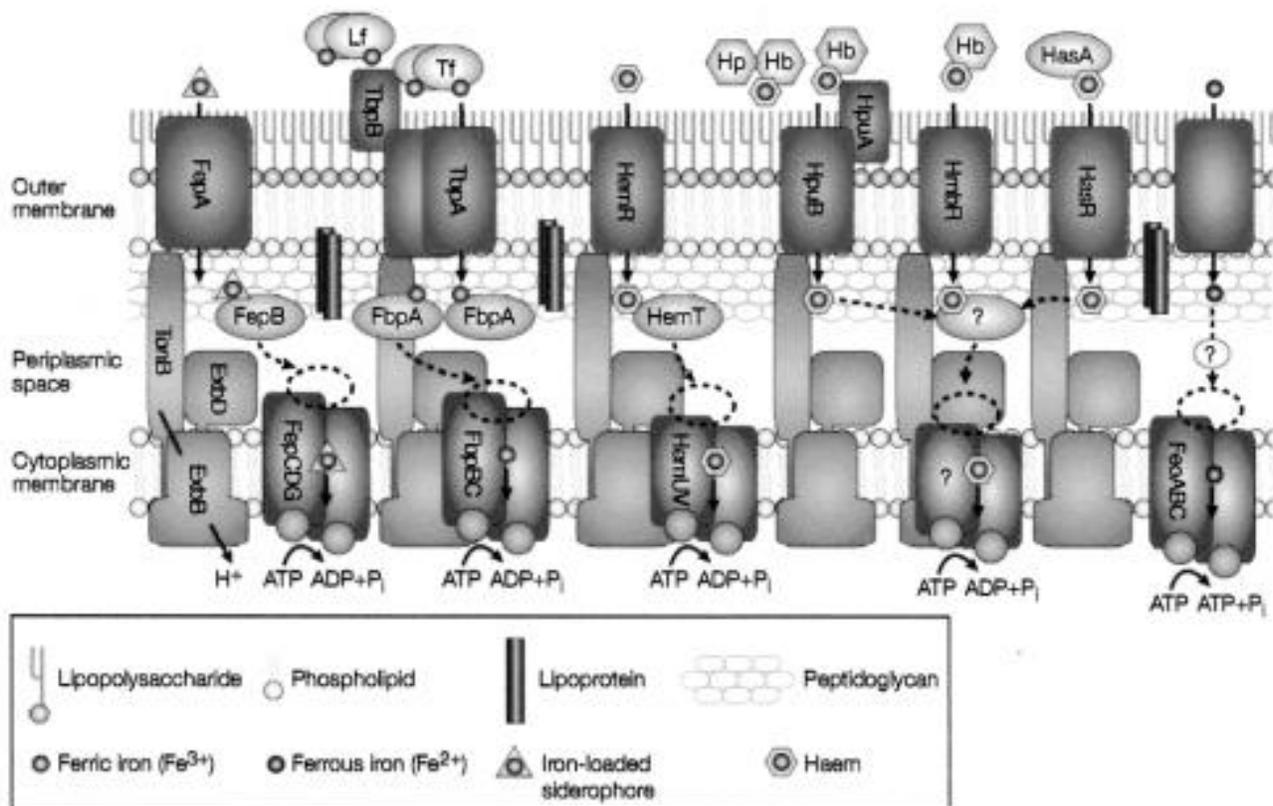


Figura 1. Esquema de la disposición hipotética de las proteínas que intervienen en la captación de hierro en bacterias Gram negativas, tomado de Faraldo y Sansom, 2003.

## 2.7. Mecanismos indirectos de captura de hierro

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular, con una elevada afinidad por hierro  $Fe^{3+}$ , que son secretadas al medio y son capaces de extraer las moléculas de este elemento presentes en las proteínas transportadoras del hospedador o en el medio ambiente. Una vez

que han captado el hierro, son reconocidos por unos receptores específicos de la membrana bacteriana y en la mayoría de los casos penetran hacia el interior de la célula donde liberan la molécula de hierro. El sideróforo, tras este proceso, puede ser secretado otra vez al medio para la captura de una nueva molécula de hierro. De este modo, los sideróforos actúan como agentes quelantes de hierro (Ratledge y Dover, 2000).

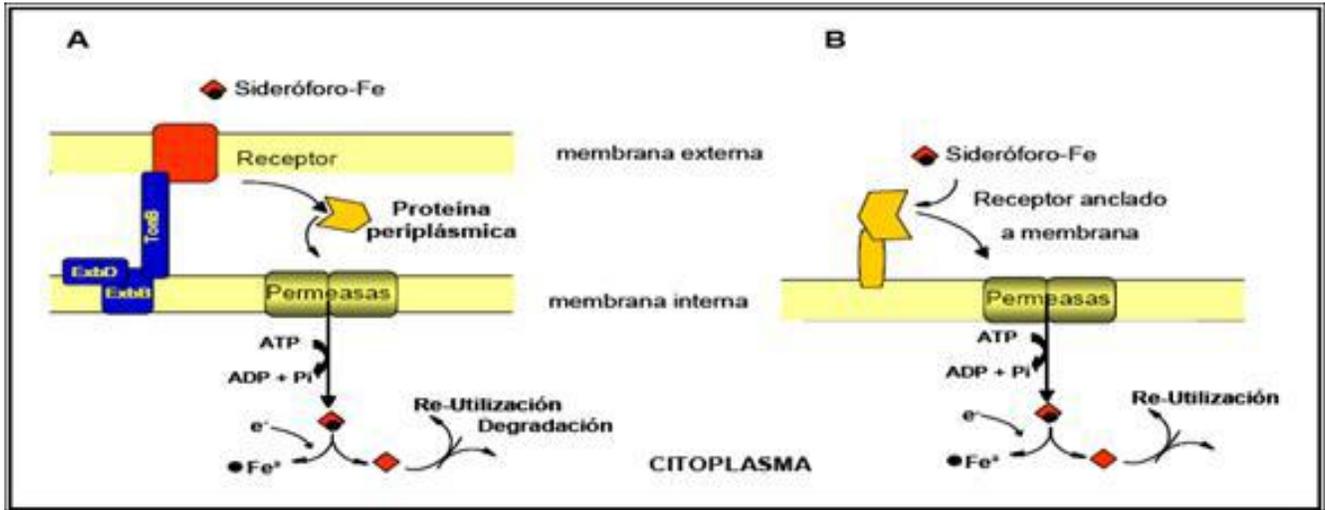


Figura 2. Esquema de la asimilación del hierro a través de los sideróforos en las bacterias Gram negativas (A) y Gram positivas (B), tomado de Andrews *et al.*, 2003.

### 3. ANTECEDENTES

Todos estos sistemas de captación y asimilación de hierro actúan frecuentemente como factores de virulencia en las bacterias patógenas, pues les permiten disminuir la deficiencia de hierro libre presente en el hospedero (Litwin y Calderwood, 1993). Por ello diversas investigaciones se han enfocado al estudio de estos factores de virulencia expresados por bacterias pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*. Por ejemplo, Schryvers y Gonzales en 1990 demostraron que *Actinobacillus pleuropneumoniae* era capaz de captar transferrina porcina, mediante la expresión de dos proteínas de membrana externa, designadas inicialmente Tbp1 y Tbp2 y más tarde, TbpA y TbpB.

En 1992, Ogunariwo y Schryvers, trabajando con cepas de *Avibacterium paragallinarum* y *A. avium* encontraron que las cepas de *A. paragallinarum* expresaban cuatro proteínas de membrana externa reguladas por hierro, con un peso de 53, 62, 66 y 94 kDa y que las proteínas de 94 y 53 kDa eran receptores de ovotransferrinas, las cuales podrían estar implicadas en la adquisición de hierro en esta bacteria.

Borkowska y Kedrak, en 2002, trabajaron con cepas de *Pasteurella multocida* serotipo B2, y reportaron un aumento en la expresión de una proteína de membrana de un peso de 84 kDa y la expresión de dos proteínas adicionales con pesos de 102 y 110 kDa en los cultivos adicionados con el quelante 2,2-dipiridil.

Por otra parte, Del Río en 2004 demostró la existencia de sistemas de captación de hierro mediada por proteínas de unión a transferrina en *Haemophilus parasuis* y que éstas estaban reguladas positivamente en función de la concentración de hierro presente en el medio de cultivo. Además también demostró la presencia de genes que intervienen en la captación de hierro mediada por proteínas de unión a sideróforos de tipo hidroxamato.

Garrido en 2005 identificó el gen hbpA de *P. multocida*, que codifica una proteína de 60 kDa, cuya expresión se induce en presencia de cationes divalentes y presenta un mecanismo de regulación distinto al utilizado por otras bacterias, ya que es independiente del sistema Fur, asimismo determinó que la proteína es capaz de unir hemina y hemoglobina.

A su vez, Larios en 2006 identificó proteínas expresadas por *A. paragallinarum* crecida en medios adicionados con el quelante de hierro 2,2-dipiridil, reportando la expresión diferencial de proteínas de membrana externa bajo esta condición.

Martínez en 2010 identificó mediante SDS-PAGE las proteínas secretadas expresadas por *A. paragallinarum* al ser crecida en un medio restringido de hierro, observando una expresión diferencial de tres proteínas con un peso de 60, 70 y 75 kDa, cuyas bandas se incrementaron después de crecer a *A. paragallinarum* en presencia del quelante de hierro 2,2-dipiridil (0.25mM) y al identificar la proteína de 60 kDa obtuvo altos scores con secuencias de aminoácidos presentes en un precursor de la proteína que une transferrina de *A. pleuropneumoniae* serovar 3 cepa J103.

En 2010, Puchalski y colaboradores, trabajando con *P. multocida* serotipo A3, identificaron 16 nuevas proteínas de membrana con un peso desde 30 hasta 160 kDa, que fueron expresadas por la bacteria en medios de cultivo suplementados con 2,2-dipiridil, reportando que su inducción se produjo 30 minutos después de que se establecieran las condiciones de hierro restringidas.

De igual forma, Rea en 2011 realizó un estudio con *Gallibacterium anatis* crecida en un medio adicionado con el quelante de hierro 2,2-dipiridil 0.25 mM y observó la expresión diferencial de proteínas de membrana, en particular una proteína de 70 kDa presentó similitud con la proteína

CirA expresada por *Mannheimia succiniproducens* involucrada en la adquisición de hierro debido a que funge como receptora de sideróforos.

Puchalski y colaboradores en 2013 llevaron a cabo el análisis de proteínas de membrana externa expresadas por *M. haemolytica* A1 en cultivos con presencia del quelante de hierro 2,2-dipiridil y mediante SDS-PAGE observaron una expresión significativamente más alta de 2 proteínas con un peso de 71 y 100 kDa y la expresión de una proteína de 77 kDa que no se observó en los cultivos control, además estas proteínas fueron capaces de inducir una respuesta inmune protectora en terneros de 8 meses de edad.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Bajo este marco, resulta importante el conocimiento sobre los factores de virulencia, debido a que cuando se ignoran los mecanismos de adherencia, movilidad, secreción de proteasas, entre otros, entonces se desconoce la forma por la cual podemos combatir a las bacterias (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014), por esto, es necesario conocer los factores de virulencia expresados por esta bacteria para así, tener un panorama de los mecanismos involucrados en la patogénesis y poder combatir esta enfermedad, por lo cual el objetivo de este trabajo fue caracterizar la respuesta a estrés por hierro de *A. seminis*.

#### 5. OBJETIVOS

##### 5.1. Objetivo general

- Caracterizar la respuesta a estrés por Fe en *A. seminis*.

##### 5.2. Objetivos particulares

- Observar el efecto de la adición de 2,2-dipiridil en los cultivos bacterianos.
- Observar las diferencias entre los patrones proteicos de los cultivos en condiciones normales y cultivos con 2,2-dipiridil.
- Determinar la reactividad inmune cruzada de dichas proteínas con sueros inmunes contra proteínas de estrés por hierro ya caracterizadas.
- Determinar la identidad de estas proteínas por espectrometría de masas.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Cultivos

Se cultivaron las cepas de *A. seminis* ATCC 15768 (referencia), *A. seminis* A4 y *A. seminis* A8 (previamente aisladas de ovejas infectadas) en agar BHI y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. A partir de estas placas se inocularon tubos con 3 mL de medio TSB y se incubaron a 37°C en agitación durante 24 horas.

### 6.2. Crecimiento a diferentes concentraciones de 2,2-dipiridil

Para determinar la concentración óptima de 2,2-dipiridil que permitiera el crecimiento bajo condiciones de estrés, se inocularon tubos con 3 mL de medio TSB con las cepas de *A. seminis* ATCC 15768, A4 y A8 al 6%, utilizando como control cultivos a los que no se les adicionó 2,2-dipiridil. Una vez alcanzada una  $A_{600} = 0.1$  se adicionó a cada cultivo las siguientes concentraciones de 2,2-dipiridil: 0.5 mM, 0.4 mM, 0.3 mM, 0.25 mM y 0.2 mM y se incubaron a 37°C en agitación durante 24 horas. Se determinaron las densidades ópticas de los cultivos a las 2, 4, 8 y 24 horas de crecimiento.

### 6.3. Cinética de crecimiento bacteriano

Para observar el efecto de la adición de 2,2-dipiridil en los cultivos bacterianos, se realizó una cinética de crecimiento. Se inocularon tubos al 6% con las cepas de *A. seminis* ATCC 15768, A4 y A8 a partir de un cultivo previo de toda la noche. Se obtuvieron las densidades ópticas cada hora y una vez alcanzada una  $A_{600} = 0.1$  se adicionó a cada cultivo la concentración de 0.25 mM del quelante de hierro 2,2-dipiridil. A partir de ese momento se realizaron mediciones cada hora al menos durante 9 horas. También se obtuvo una última medición a las 24 horas. Cultivos a los que no se les agregó 2,2-dipiridil se usaron como control.

### 6.4. Obtención de proteínas de membrana externa (OMP's)

Se realizaron cultivos de 100-250 mL de las cepas de *A. seminis* ATCC 15768, A4 y A8 en caldo TSB. Una vez alcanzada una densidad óptica mínima de 0.1 a 600 nm se agregó el quelante de hierro 2,2-dipiridil a una concentración de 0.25 mM. Se incubaron durante 24 horas. Los cultivos fueron centrifugados a 10 500 rpm durante 25 minutos, el sobrenadante se recolectó para su posterior uso mientras que la pastilla celular fue suspendida en HEPES con lisozima (1 mg/mL) y se incubó en agitación a 150 rpm a 37.5 °C durante 30 minutos, posteriormente las células se sonicaron 10 ciclos (15 segundos de sonicación y 15 segundos de

pausa) todo el tiempo en hielo. Después de la sonicación, las muestras se centrifugaron a 13 400 rpm durante 2 minutos para desechar las células que no se rompieron. El sobrenadante se centrifugó a 13 400 rpm durante 30 minutos y la pastilla se resuspendió en 200 µL de HEPES más 200 µL de HEPES con 2% de Tritón X-100, se dejaron en agitación a 150 rpm durante 60 minutos, nuevamente se centrifugaron a 13400 rpm durante 30 minutos y se almacenaron ambas fracciones (Blackall *et al.*, 1990). La concentración de proteínas se obtuvo mediante el método de Bradford (Rivero-García *et al.*, 2005).

#### 6.5. Obtención de proteínas secretadas

Para la obtención de las proteínas secretadas, los cultivos fueron centrifugados a 10,500 rpm a una temperatura de 4 °C durante 30 minutos. Se utilizó el sobrenadante libre de células y las proteínas se precipitaron con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 60% a 4 °C, durante 24 horas. Posteriormente las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación a 10,500 rpm, las proteínas fueron resuspendidas en un volumen mínimo de buffer PBS 1X y debidamente almacenadas. La concentración de proteínas se obtuvo mediante el método de Bradford (Rivero-García *et al.*, 2005).

#### 6.6. Electroforesis

Para visualizar las proteínas de membrana que se expresaron diferencialmente se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% bajo condiciones desnaturalizantes. Al término de la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de Azul de Coomasie (R-250 0.1%, metanol 40% y ácido acético 10%) hasta observar una coloración uniforme y consistente, posteriormente el exceso de colorante se eliminó utilizando una solución de ácido acético al 10%.

#### 6.7. Inmunoreconocimiento

Para determinar si las proteínas que se expresaron por estrés por hierro eran inmunogénicas, estas se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%. Se transfirieron a diferentes membranas a 350 mA durante 75 minutos. Una vez transferidas, las membranas se bloquearon con 5% de leche en PBS-Tween 0.5% durante 2 horas, a temperatura ambiente, en agitación, o se guardaron en refrigeración a 4°C durante toda la noche. Posteriormente las membranas se lavaron con PBS-Tween 0.5%, 3 veces durante 10 minutos, en agitación. Después del lavado se incubaron con el antisuero primario o proteínas biotiniladas (Cuadro 1) durante 2 horas en agitación, enseguida se lavó la membrana de la

misma manera con PBS-Tween 0.5%, y se agregó el anticuerpo secundario o avidina peroxidada (Cuadro 1). Nuevamente se incubó durante 2 horas en agitación o toda la noche en refrigeración a 4°C. La reacción antígeno-anticuerpo se puso en evidencia usando una solución de 15 mL de ácido fosfórico pH 7.4 con diamino benzidina, 500 µL de solución cloruro de níquel/cloruro de cobalto y 30 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Towbin *et al.*, 1979).

Cuadro 1. Lista de anticuerpos y proteínas utilizados a una concentración de 1:1000.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario marcado con peroxidasa
Anti-TbpB de <i>A. paragallinarum</i> (68 kDa) (Negrete Abascal <i>et al.</i> , 2009).	Suero-anti-rata
Anti-TbpA de <i>A. paragallinarum</i> (93 kDa) (Negrete Abascal <i>et al.</i> , 2009).	Suero-anti-rata
Anti-HA de <i>G. anatis</i> (Montes-García <i>et al.</i> , 2016).	Suero-anti-conejo
Anti-proteasa de <i>A. pleuropneumoniae</i> (Negrete-Abascal <i>et al.</i> , 1998).	Suero-anti-conejo
Suero de borrego infectado por <i>A. seminis</i> (Montes-García <i>et al.</i> , en evaluación).	Suero-anti-borrego
Fibrinógeno de borrego biotinilado	Avidina peroxidada
Hemoglobina de pollo biotinilada	Avidina peroxidada
Lactoferrina bovina biotinilada	Avidina peroxidada

## 6.8. Identificación de proteínas mediante Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDITOF)

Para la identificación de las proteínas que se expresaron diferencialmente se corrieron geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% y las bandas de interés fueron sometidas a análisis MALDITOF en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (Montes-García *et al.*, 2016).

## 7. RESULTADOS

### Cinética de crecimiento bacteriano

Se realizó el crecimiento de las cepas de *A. seminis* ATCC 15768, A4 y A8 a diferentes concentraciones de 2,2-dipiridil. Los cultivos suplementados con el quelante mostraron una disminución de crecimiento en comparación con los cultivos control, y para las 3 cepas, concentraciones por encima de 0.3 mM del quelante tuvieron un efecto negativo sobre su

crecimiento, alcanzando la fase estacionaria a partir de las 6 horas de incubación. Se observó una disminución del crecimiento a partir de las 8 horas, mientras que los cultivos suplementados con el quelante a una concentración de 0.2 mM y 0.25 mM mostraron un mayor crecimiento (ver figura 1a).

Con base en las curvas de crecimiento de *A. seminis* a diferentes concentraciones de 2,2-dipiridil, se determinó utilizar una concentración de 0.25 mM del quelante de hierro para los cultivos de *A. seminis* ATCC 15768, A4 y A8. En las tres cepas se observó una disminución de crecimiento en los cultivos adicionados con el quelante comparados con los cultivos control que mostraron un 40%, 38% y 53% más de crecimiento respectivamente, al cabo de 24 horas de crecimiento (ver figura 1b).

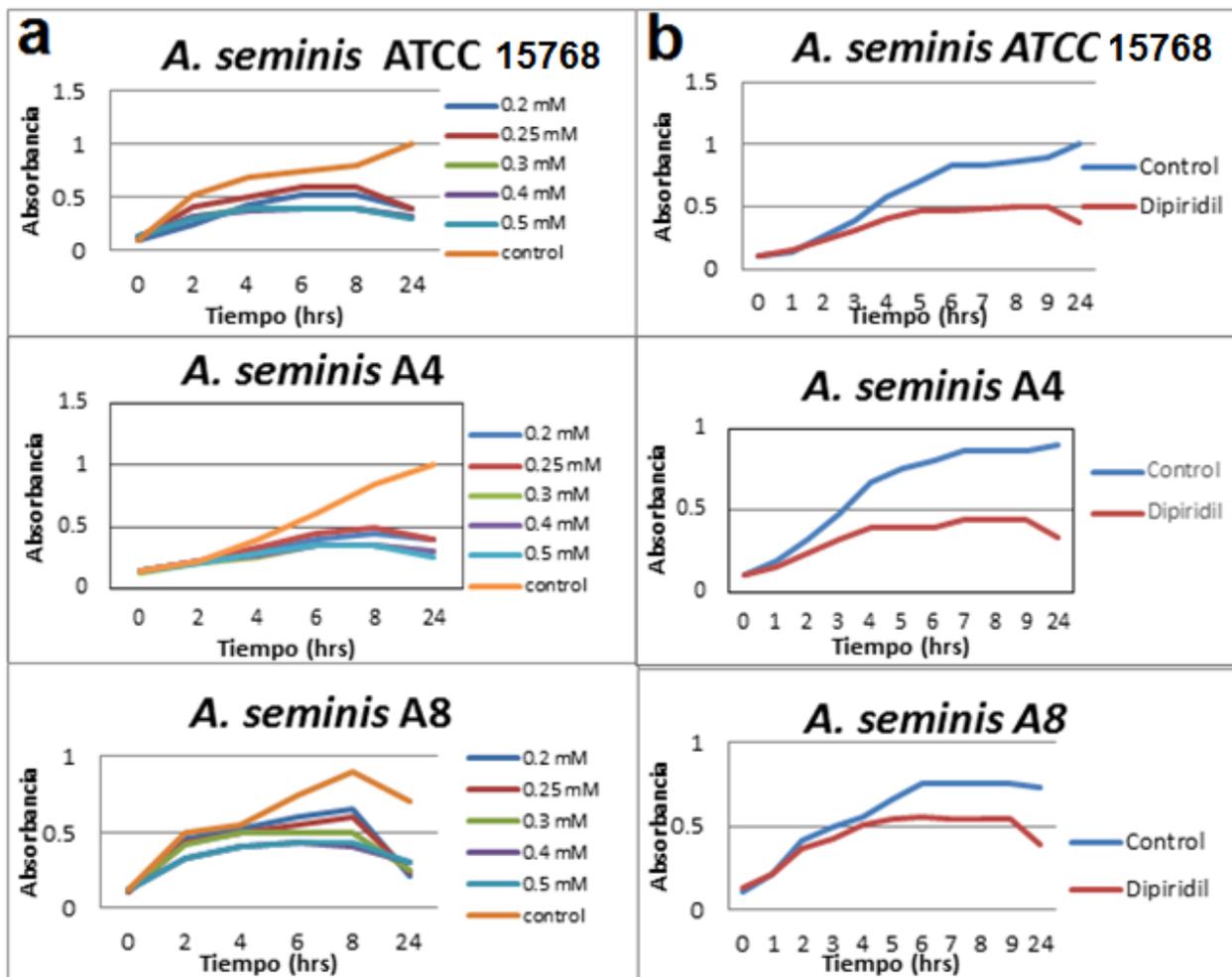


Figura 1. a: Cinética de crecimiento bacteriano de las cepas de *A. seminis* a diferentes concentraciones del quelante de hierro 2,2-dipiridil y b: Cinética de crecimiento bacteriano de las cepas de *A. seminis* en presencia del quelante de hierro 2,2-dipiridil 0.25mM.

### Proteínas de membrana externa (OMP's)

En cuanto a los patrones de proteínas expresados por *A. seminis* ATCC 15768, A4 y A8 en condiciones de crecimiento normal y en presencia de 2,2-dipiridil, se observaron diferencias en la expresión de OMP's, siendo las bandas de un peso molecular aproximado de 25, 50 y 75 kDa cuya expresión se intensificó en presencia de 2,2-dipiridil. La figura 3a muestra un patrón de proteínas representativo para las tres cepas.

### Proteínas secretadas

En el caso de las proteínas secretadas, no se observaron diferencias en los patrones de proteínas expresados en condiciones de crecimiento normal y con presencia de 2,2-dipiridil (ver figura 3b).

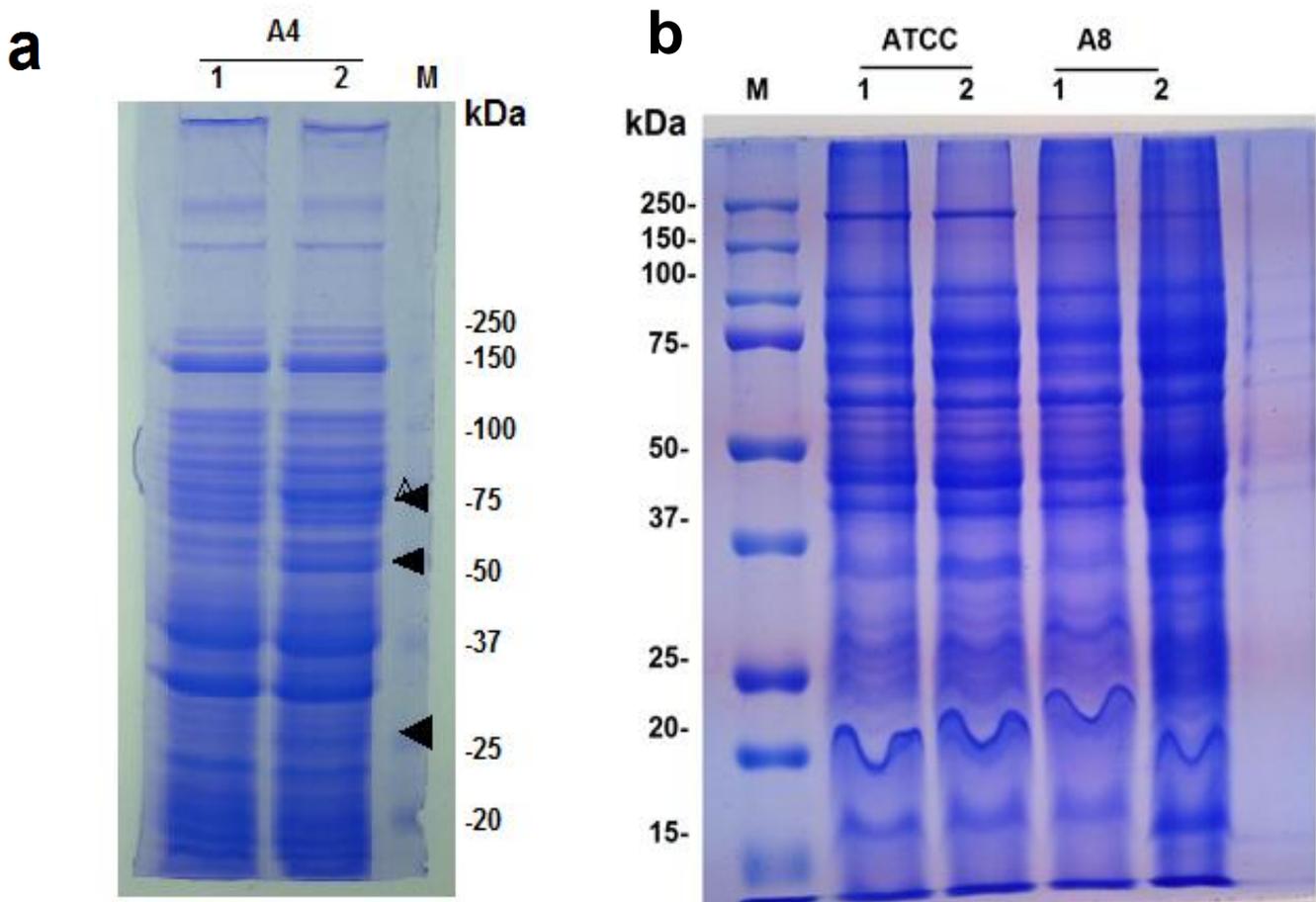


Figura 3. SDS-PAGE al 10%. a: Patrón de proteínas de membrana de *A. seminis* (OMP's), b: Patrón de proteínas secretadas. M: marcadores de peso molecular, 1: proteínas expresadas bajo condiciones de crecimiento normal y 2: proteínas expresadas bajo condiciones de crecimiento en presencia de 2,2-dipiridil.

## Inmunoreconocimiento de proteínas de membrana OMP's

Con respecto a los ensayos de inmunoreconocimiento (Western Blot) se emplearon los sueros Anti-TbpB y Anti-TbpA de *A. paragallinarum*, Anti-HA de *G. anatis*, Anti-proteasa de *A. pleuropneumoniae*, suero de borrego infectado por *A. seminis*, fibrinógeno de borrego, hemoglobina de pollo y lactoferrina bovina biotiniladas contra las proteínas de membrana de *A. seminis* ATCC 15768, A4 y A8. Se observó un inmunoreconocimiento tanto para las muestras de proteínas bajo condiciones en presencia de 2,2-dipiridil como para las proteínas bajo condiciones normales. Las figuras 4 y 5 muestran un patrón de reconocimiento representativo de la cepa A8. En el caso del suero Anti-TbpB (68 kDa) se observó un reconocimiento con las proteínas de peso aproximado de 150, 100, 75, y proteínas menores a 50 kDa en ambas condiciones; sin embargo, se observa un mayor reconocimiento de las proteínas de 100 y 75 kDa pertenecientes a las bacterias crecidas en presencia de 2,2-dipiridil. Para Anti-TbpA (93 kDa) hubo reconocimiento con proteínas de peso aproximado de 150,100, 75 y proteínas menores a 50 kDa para la condición de crecimiento en presencia de 2,2-dipiridil, mientras que para la condición normal solo se reconocieron proteínas menores a 75 kDa (ver figura 4).

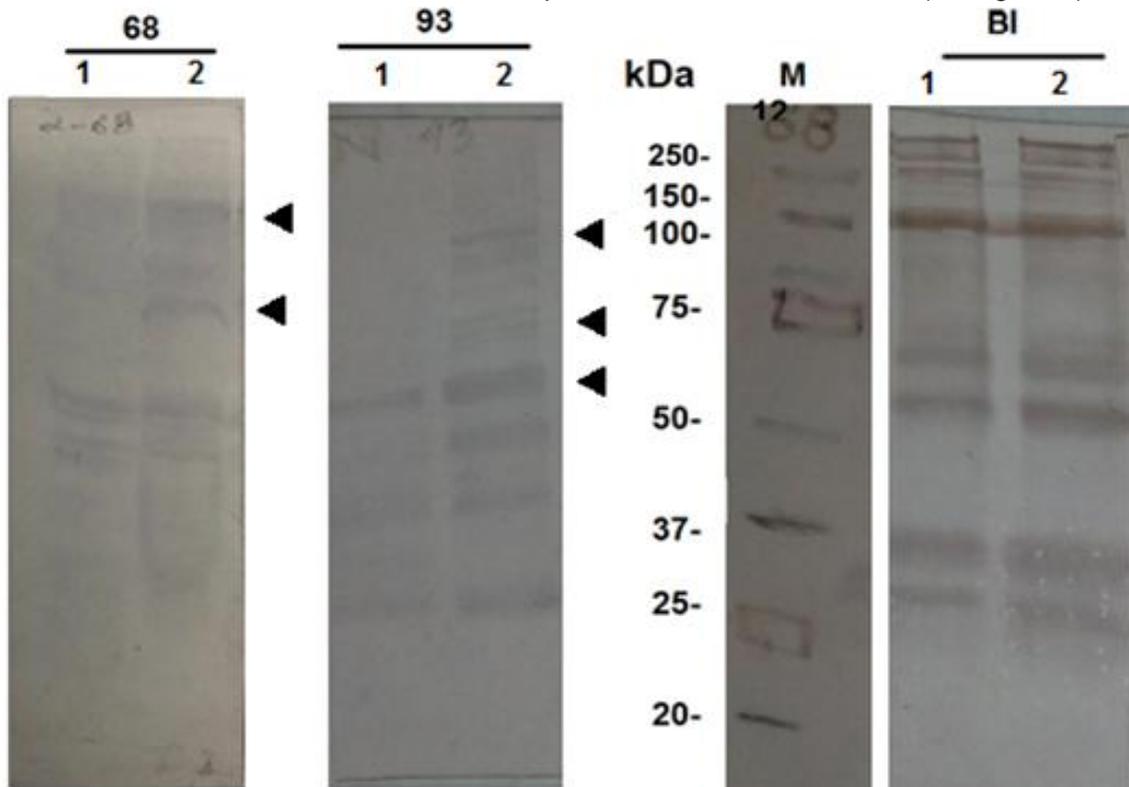


Figura 4. Western Blot de las OMP's de *A. seminis* A8 utilizando diferentes sueros, M: marcadores de peso molecular, 1: proteínas expresadas bajo condiciones de crecimiento normal, 2: proteínas expresadas bajo condiciones de presencia de 2,2-dipiridil, 68: Anti-TbpB de

*A. paragallinarum* (68 kDa), 93: Anti-TbpA de *A. paragallinarum* (93 kDa) y BI: Suero de borrego infectado con *A. seminis*.

De igual forma se obtuvo inmunoreconocimiento usando fibrinógeno de borrego biotinilado con las proteínas de peso aproximado de 150, 50, 30 y 25 kDa obtenidas para ambas condiciones, aunque las proteínas de 150 y 30 kDa, tuvieron una reacción más evidente para la condición con presencia de 2,2-dipiridil; en cuanto a la hemoglobina de pollo biotinilada ésta reconoció las proteínas de un peso de 250, 100, 75 y 25 kDa para la condición normal, mientras que para la condición con presencia de 2,2-dipiridil, fue más evidente el reconocimiento con proteínas de peso aproximado de 250 y 25 kDa. Al utilizar lactoferrina bovina biotinilada, fueron reconocidas proteínas de pesos moleculares aproximados a 150, 100, 75 y proteínas menores a 50 kDa en muestras de cultivos incubados en presencia de 2,2-dipiridil, en tanto que en condiciones normales, las proteínas reconocidas fueron las de un peso aproximado de 250, 100, 50 y proteínas menores a 30 kDa (ver figura 5).

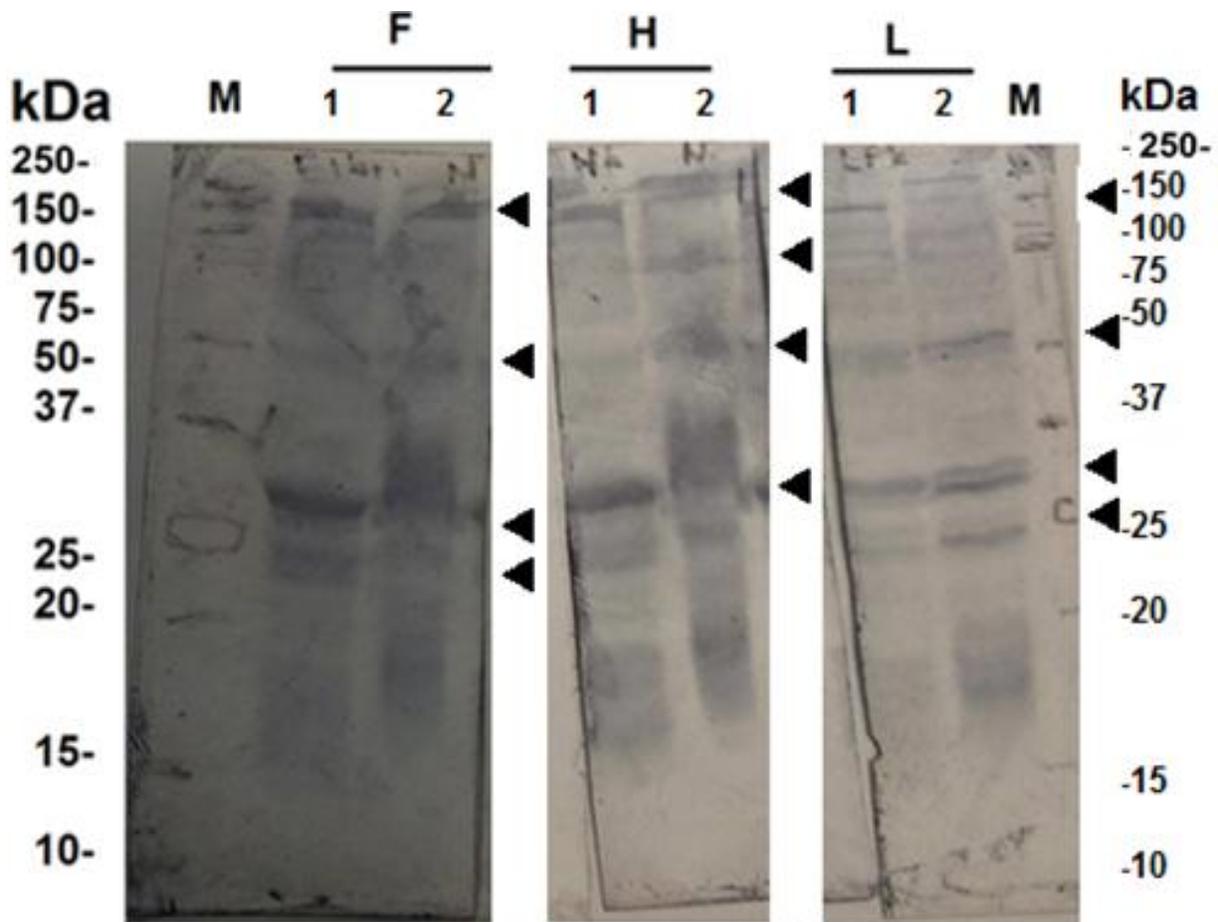


Figura 5. Interacción de OMP's de *A. seminis* A8 con diferentes moléculas biotiniladas. M: marcador de peso molecular. 1: proteínas expresadas bajo condiciones de presencia de 2,2-

dipiridil, 2: proteínas expresadas bajo condiciones de crecimiento normal, F: fibrinógeno de borrego, H: hemoglobina de pollo y L: lactoferrina bovina.

#### Identificación de las proteínas mediante MALDI-TOF

De acuerdo al análisis realizado mediante MALDI-TOF a las proteínas que se expresaron diferencialmente en condiciones de cultivo con presencia de 2,2-dipiridil (ver figura 3a), se obtuvo para la proteína de 75 kDa identidad con la proteína ornitina descarboxilasa; para la proteína de 50 kDa se obtuvo una similitud con la proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, mientras que la proteína de 25 kDa presentó una similitud con la proteína malato deshidrogenasa. Las tres identidades con un porcentaje de confianza del 66% (ver Cuadro 2).

Cuadro 2. Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF.

Proteína PM	Identidad	Especie	% de confianza	% de cobertura	# acceso UniProt
75 kDa	ornitina descarboxilasa	<i>Actinobacillus seminis</i>	66%	27.6	WP_094946073.1
50 kDa	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	<i>Actinobacillus seminis</i>	66%	54.1	WP_094946805.1
25 kDa	malato deshidrogenasa	<i>Actinobacillus seminis</i>	66%	53.4	WP_094945414.1

## 8. DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado anteriormente, las bacterias patógenas pueden adquirir directamente todos los nutrientes que necesitan del huésped que infectan, a excepción del hierro (Ratledge y Dover, 2000). La limitación del hierro como elemento esencial para el crecimiento bacteriano está mediado principalmente por su almacenamiento en glicoproteínas que se unen al hierro, esto como primer línea de defensa del huésped contra los microorganismos patógenos causantes de enfermedades. Por ello, las bacterias utilizan varias estrategias dirigidas a adquirir competitivamente el hierro del ambiente interno del hospedero, a través de la expresión de distintos factores de virulencia (Litwin y Calderwood, 1993). Al crecer a *A. seminis* (cepas ATCC 15768, A4 y A8) en condiciones de hierro limitadas, se observó una disminución en el crecimiento de las tres cepas a partir de las 2 horas de incubación y al cabo de 24 horas los cultivos control presentaban un 40% más de crecimiento. En miembros de la

familia *Pasteurellaceae* se ha observado este tipo de respuesta al estrés por déficit de hierro, Rea en 2011, reportó que en *G. anatis* se observa una disminución del crecimiento a partir de 1 hora después de adicionar el quelante 2,2-dipiridil y al paso de 24 horas, los cultivos control presentaron un 75% más de crecimiento, en comparación con los cultivos adicionados con el quelante. Esta disminución del crecimiento está asociada a la respuesta al cambio en la disponibilidad de los nutrientes, por la cual las bacterias se ven obligadas a desarrollar mecanismos reguladores afinados con respecto a la captación, el almacenamiento y el consumo de hierro. En cepas de *A. paragallinarum*, Martínez en 2010, reportó que la expresión diferencial de las proteínas pudo observarse a partir de las 5 horas de cultivo, mientras que en cepas de *P. multocida* serotipo A3, Puchalski y colaboradores en 2011 reportaron la inducción de 16 nuevas proteínas 30 minutos después de establecer condiciones restringidas de hierro, las cuales participan en el transporte de este ion.

Analizando los perfiles de proteínas de *A. seminis* se observó el cambio evidente en la expresión de 3 OMP's con pesos de 25, 50 y 75 kDa, las cuales intensificaron su expresión en los cultivos adicionados con el quelante de hierro 2,2-dipiridil. Respuestas similares han sido reportadas para miembros de la familia *Pasteurellaceae*, Martínez en 2010 reportó la sobreexpresión de 3 proteínas de membrana de *A. paragallinarum* con un peso de 60, 70 y 75 kDa en cultivos con presencia del quelante, encontrando que la proteína de 60 kDa presentaba identidad con TbpB de *A. pleuropneumoniae*. De igual forma Rea en 2011, al crecer a *G. anatis* en presencia de 2,2-dipiridil, observó el cambio en la expresión de proteínas de membrana con un peso de 70, 37, 36, 25 y 23 kDa y reportó que la proteína de 70 kDa presentó identidad con un receptor de sideróforos. En cepas de *M. haemolytica* A1, Puchalski y colaboradores en 2013, reportaron que al crecer esta bacteria en presencia de 2,2-dipiridil aumentó la expresión de 2 proteínas con un peso de 71 y 100 kDa y se indujo la expresión de una proteína de 77 kDa que no estaba presente en los cultivos control. Aiswarya en 2015 al comparar los patrones de proteínas expresados por cultivos de *P. multocida* en presencia de 2,2-dipiridil entre cepas de referencia y aislados de campo, reportó la presencia de 2 bandas adicionales, de pesos moleculares de 112 y 125 kDa. El suplemento de los cultivos con 2,2-dipiridil ha permitido observar los cambios en la expresión de proteínas, tales como el aumento, supresión o la aparición de bandas de proteínas, que al ser analizadas se han relacionado con mecanismos directos o indirectos para la captación de hierro, por lo cual las proteínas expresadas por las cepas de *A. seminis* también podrían estar relacionadas con algún mecanismo de captura de hierro en condiciones de deficiencia.

Al realizar los ensayos Western Blot se obtuvo un inmunoreconocimiento con el suero Anti-TbpB de *A. paragallinarum* con proteínas de un peso aproximado de 150, 100, 75 y proteínas menores a 50 kDa. Las proteínas de unión a transferrina como TbpB se han reportado con un peso de entre 60 a 85 kDa (González *et al.*, 1995), en bacterias de la familia *Pasteurellaceae* existen reportes de la expresión de estas proteínas bajo condiciones de estrés por hierro, tal es el caso de *A. pleuropneumoniae* (Schryvers y Gonzales, 1990), *Haemophilus influenzae* (Cornelissen, 2003), *P. multocida* (Garrido, 2005) y *A. paragallinarum* (Martínez, 2010), por lo cual *A. seminis* podría presentar mecanismos homólogos, y la banda reconocida de 75 kDa podría estar relacionada con esta proteína, debido a que el reconocimiento fue más marcado cuando las bacterias fueron crecidas en medios con deficiencia de hierro. Para TbpA, se han reportado pesos moleculares de entre 90 a 100 kDa (González *et al.*, 1995), el reconocimiento utilizando este anti-suero se observó con proteínas de un peso de 150, 100 y proteínas menores a 75 kDa para la condición con deficiencia de hierro, mientras que en la condición normal solo se observó reconocimiento con proteínas menores a 75 kDa. Como se mencionó anteriormente, las bacterias poseen diversos mecanismos para adquirir hierro a pesar de la deficiencia de hierro libre presente en el hospedero (Litwin y Calderwood, 1993) y esta expresión de proteínas diferencial, detectada por el reconocimiento diferencial con anticuerpos, podría ser resultado de la respuesta de la bacteria ante la deficiencia de hierro en el medio. Se ha demostrado que estas proteínas son dependientes una de otra, además de formar parte de un complejo sistema dependiente de TonB y un sistema de transporte de tipo ABC, además se ha encontrado que son proteínas muy conservadas dentro de la familia *Pasteurellaceae* (Fuller *et al.*, 1998), lo que nos sugiere que en el reconocimiento observado con ambos sueros existe la posible relación con un mecanismo similar para captura de hierro en *A. seminis*. En cuanto a la presencia de reconocimiento en distintas proteínas para ambos sueros, se puede relacionar con el hecho de que estos sueros son policlonales.

Por otra parte, la interacción de anti-Fibrinógeno con proteínas de peso aproximado de 150 y 30 kDa de bacterias crecidas en medios con deficiencia de hierro puede indicar que posiblemente estas proteínas tengan la capacidad de reconocer el fibrinógeno, el cual funge como proteína principal que da origen a la fibrina, participa como puente entre plaquetas y es un inhibidor de la coagulación de la sangre, por lo cual participa en procesos como la inflamación, la hemostasia y la cicatrización de las heridas entre otros (Vargas, 2016).

La hemoglobina de pollo interaccionó con proteínas de 250 y 25 kDa mientras que lactoferrina bovina con proteínas de 150, 50 y 30 kDa. Si bien, la capacidad de *A. seminis* de utilizar estas hemoproteínas para satisfacer sus necesidades de hierro no ha sido demostrada, esto podría indicar que estas proteínas tienen la capacidad para reconocer hemoglobina de pollo y lactoferrina bovina que son proteínas encargadas del secuestro de hierro en los organismos superiores, como un mecanismo de defensa ante un proceso de infección, entre otros (Monter, 2010.)

Los reconocimientos observados en condiciones de deficiencia de hierro con los distintos antisueros nos indican que estas proteínas se sobre-expresan bajo esta condición, mientras que en condiciones normales probablemente se encuentran reguladas. Como ya se ha mencionado, estos anticuerpos se consideran policlonales, por lo cual reconocen más de un sitio de unión a la proteína; sin embargo, esto nos indica que *A. seminis* es capaz de reconocer estas proteínas y tal vez de utilizarlas en situaciones de deficiencia de hierro.

El análisis de las proteínas mediante MALDI-TOF mostró que la proteína de 75 kDa que se sobre-expresó en condiciones de deficiencia de hierro presentó identidad con la proteína ornitina descarboxilasa. Brickman y Armstrong demostraron en 1995 la participación de la ornitina descarboxilasa como precursor en la biosíntesis de sideróforos de tipo hidroxamato mediante la producción de putrescina en *Bordetella* sp. En organismos superiores como *Aspergillus fumigatus*, patógeno oportunista en personas con sistema inmune comprometido, se ha visto que la ornitina descarboxilasa funge como precursor de poliaminas, las cuales participan como intermediarios para la producción de putrescina. Beckman y colaboradores demostraron en 2013 que esta vía para la producción de sideróforos determina el establecimiento del patógeno en el hospedero, por lo cual la síntesis de estos sideróforos se considera un factor de virulencia en esta especie. La síntesis de sideróforos no ha sido descrita en *A. seminis*, lo cual significa que esta especie podría tener la capacidad de sintetizar sideróforos o bien, utilizar estas moléculas afines al hierro para satisfacer sus necesidades metabólicas.

Se obtuvo una similitud de la proteína de 50 kDa con la proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Wong y colaboradores en 1999, trabajando con *Mycobacterium tuberculosis* crecida en medios de cultivo enriquecidos y deficientes de hierro, observaron la expresión diferencial de 12 proteínas y al identificarlas mediante MALDI-TOF obtuvieron homología de una de ellas con la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, cuya síntesis se encontraba regulada por

hierro. De acuerdo a sus resultados, esta proteína trabaja en conjunto con otras proteínas para poder satisfacer las necesidades de hierro de la bacteria y mantener su homeostasis. Batista y colaboradores también reportaron en 2007 la sobre-expresión de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa al crecer a *Trichomonas vaginalis* en medios deficientes de hierro y la relacionaron con la capacidad de este patógeno para compensar la producción deteriorada de energía hidrogenosomal, ya que estas enzimas requieren de hierro tanto para su estructura como para su actividad; además reportaron que los ambientes deficientes de hierro modulan la expresión de factores de virulencia en este protozoo, debido a que el hierro juega un papel crítico en la interacción huésped-parasito. Asimismo Tang y colaboradores en 2007 reportaron que la proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinasa expresada por *Geobacter metallireducens* está implicada en el aprovechamiento del ion férrico, debido que al formar parte importante dentro del ciclo de los ácidos tricarbónicos, es aprovechada para reducir  $Fe^3$  a  $Fe^2$  soluble mediante el complejo metabolismo del carbón. La sobre-expresión de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa por *A. seminis* en medios deficientes de hierro sugiere que esta proteína está implicada en el aprovechamiento del hierro en condiciones de deficiencia de este ion y podría ser un factor importante que le facilite la colonización del hospedero.

La proteína de 25 kDa presentó una similitud con la proteína malato deshidrogenasa. Esta proteína participa en el ciclo del ácido carboxílico y en organismos patógenos de la familia *Pasteurellaceae* como *H. parasuis*, Wise y colaboradores, reportaron en 1997 la importancia de esta enzima, ya que al inhibirla se observó una disminución del crecimiento de la bacteria. En recombinantes de *Escherichia coli* sobreproductoras de malato deshidrogenasas. Kwon y colaboradores reportaron en 2009 que la sobre-expresión de esta enzima incrementó la síntesis de un hemo microbiano por encima del grupo control. En el alga *Prymnesium parvum*, Rahman y colaboradores en 2014 reportaron la expresión diferencial de la malato deshidrogenasa al crecerla en medios de cultivo deficientes de hierro y mencionan que la importancia de esta enzima radica en ser intermediaria para la producción de energía en la célula. La respuesta al estrés por deficiencia de hierro observada en *A. seminis* nos ayuda a comprender los mecanismos dirigidos a la adquisición del hierro por esta especie; además, nos ayuda a estudiar cómo responden los organismos patógenos a los cambios en el medio ambiente con el fin de satisfacer sus necesidades metabólicas para asegurar su sobrevivencia.

## 9. CONCLUSIONES

- 1) *A. seminis* presenta una disminución en su crecimiento de alrededor del 40% al crecer en presencia del quelante de hierro 2,2-dipiridil.
- 2) La presencia de 2,2-dipiridil induce la expresión evidente de al menos tres proteínas (75, 50 y 25 kDa) en *A. seminis*.
- 3) La identidad de la proteína de 75 kDa sugiere que *A. seminis* posee la capacidad de expresar sideróforos.
- 4) La identidad de las proteínas de 50kDa y 25 kDa sugiere la presencia de otros mecanismos de captación de hierro o de adaptación ante la baja concentración de este ion.
- 5) La interacción de hemoglobina, lactoferrina y fibrinógeno con diversas proteínas de *A. seminis* sugiere que esta bacteria tiene la capacidad de actuar con diversas fuentes de hierro.

## 10. PERSPECTIVAS

Confirmar las interacciones proteicas entre hemoglobina y/o lactoferrina con proteínas de *A. seminis*, así como lograr su identificación.

Confirmar la capacidad de *A. seminis* de expresar sideróforos e identificar su naturaleza.

Determinar la posible capacidad inmuno protectora de estas proteínas de *A. seminis* en hospederos susceptibles de ser infectados por esta bacteria.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Aiswarya V. 2015. Outer membrane protein profile analysis and multilocus sequence typing of *Pasteurella multocida* isolates of buffalo origin from Gurajat state. Tesis de Maestría. Anand Agricultural University. India.

Acosta J., Arellano B., Díaz E., Tenorio G., Tórtora J. 2006. Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral con *Actinobacillus seminis*: estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. *Técnica Pecuaria en México*. 44:257-267.

Aguilar-Romero F., Díaz E., Méndez G., Morales J. F., Suárez F. 1999. Epididimitis ovina: estudio bacteriológico y serológico. *Veterinaria México*. 30:329-336.

Andrews S. C., Robinson A. K. Rodriguez-Quiñones F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*. 27:215-237.

Appuhamy S., Coote J., Low J. C., Parton R. 1998. PCR methods for rapid identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:814-817.

Batista J., Cuervo P., Junqueira M., Britto C., Silva F., Soares M., Cupolillo E., Fernandes O., Domont G. 2007. A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginales*. *Proteomics*. 7:1961-1972.

Baynes I. D. y Simmons G. C. 1960. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*. *Australian Veterinary Journal*. 36:454-459.

Blackall P. J., Rogers D. G., Yamamoto R. 1990. Outer-membrane proteins of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Diseases*. 34:871-877.

Beckmann N., Schafferer L., Schrettl M., Binder U., Talasz H., Lindner H., Haas H. 2013. Characterization of the link between ornithine, arginine, polyamine and siderophore metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE*. 8:1-18.

Brickman T. y Armstrong S. 1995. Alcaligin siderophore biosynthesis in *Bordetella* spp.: putrescine is a precursor of alcaligin. *Journal of Bacteriology*. 178:54-60.

Borkowska B. y Kedrak A. 2002. Expression of iron-regulated outer membrane proteins (IRONMPs) by *Pasteurella multocida* strains isolated from cattle. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 46:157-164.

- Byarugaba D. K., Minga U. M., Gwakisa P. S., Katunguka-Rwakishaya E., Bisgaard M., Olsen J. E. 2007. Virulence characterization of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Uganda. *Avian Pathology*. 36:35-42.
- Braun V. y Killmann H. 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends in Biochemical Science*. 24:104-109.
- Cárdenas-Perea M. E., Cruz O. R., Gandara J. L., Pérez M. A. 2014. Factores de virulencia bacteriana: la "inteligencia" de las bacterias. *Elementos*. 94:35-43.
- Cornelissen C. 2003. Transferrin-iron uptake by gram-negative bacteria. *Frontier Bioscience*. 8:836-847.
- Chantes A., Negrete E., Vaca S., Sánchez M. P., Vázquez C. 2012. El hierro, elemento metálico importante en la vida y en los procesos infecciosos. *Elementos*. 85:41-48.
- De la Cruz A. 2015. Caracterización de proteasas de *Actinobacillus seminis*. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.
- Del Río M. L. 2004. Sistemas de captación de hierro en *Haemophilus parasuis*. Tesis Doctoral. Universidad de León. España.
- De Wet J. A., Erasmus J. A., Prozesky L. 1982. *Actinobacillus seminis* infection in a walrich ram. *Journal of the South African Veterinary Association*. 53:129.
- Dos santos F. A., De Azevedo E. O., De Azevedo S. S., Garino F., Mota R., De Cássia Peixoto K., Gomes A. L., Alves C. J. 2014. Isolation of *Actinobacillus seminis* from a goat with clinical epididymo-orchitis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45:205-209.
- Faraldo J. D. y Sansom M. S. 2003. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4:105-116.
- Fuller C. A., Yu R., Irwin S. W., Schryvers A. B. 1998. Biochemical evidence for a conserved interaction between bacterial transferrin binding protein A and transferrin binding protein B. *Microbial Pathogenesis*. 24:75-87.
- Garrido M. E. 2005. Caracterización de los sistemas de captación de hierro y zinc del patógeno animal *Pasteurella multocida*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Genetzky R. M. 1995. Epididymitis in rams. *The Compendium Food Animal*. 17:447-454.

Genco C. A. y Dixon D. W. 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Molecular Microbiology*. 39:1-11.

Gonzales G., Yu R., Rosteck P., Schryvers A. 1995. Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes. *Microbiology*. 141:2405-2416.

Gutiérrez J. L., Díaz E., Tenorio V. R., Garrido G. I., Tórtora J. L., Acosta J. P. 2015. Diagnóstico serológico, histopatológico y molecular de epididimitis en carneros de Zacatecas, México. *Quehacer Científico en Chiapas*. 10:16-23.

Jiménez-Pacheco A., Núñez-del-Arco A., Salas-Téllez E. 2008. Microvesicles of *Actinobacillus seminis* show proteolytic activity. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 7:616-619.

Kilian M., Reinholdt J., Lomholt H., Poulsen K., Frandsen E. 1996. Biological significance of IgA proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 104:321-338.

Koneman E., Allen S., Janda W., Procop G., Schreckenberger P., Winn W., Woods G. 2006. Diagnóstico Microbiológico. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 430-439.

Khun H. H., Kirby S. D., Lee B. C. 1998. A *Neisseria meningitidis* fbpABC mutant is incapable of using a non-heme iron for growth. *Infection and Immunity*. 66:2330-2336.

Kwon OH., Kim S., Hahm DH., Lee SY., Kim P. 2009. Potential application of the recombinant *escherichia coli*-synthesized heme as a bioavailable iron source. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19:604-609.

Larios N. A. 2006. Expresión de proteínas reguladas por hierro en *Avibacterium paragallinarum*. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.

Litwin M. y Calderwood S. B. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clinical Microbiology Reviews*. 6:137-149.

Martínez K. K. 2010. Identificación de proteínas inmunogénicas secretadas por *Avibacterium paragallinarum* bajo estrés por hierro. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.

Modun B. y Williams P. 1999. The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infection and immunity*. 62:3850-3858.

Montes-García JF, Vaca S, Vazquez-Cruz C, Soriano-Vargas E, Aguilar-Romero F, Blackall PJ and Negrete-Abascal E. 2016. Identification of a hemagglutinin from *Gallibacterium anatis*. *Current Microbiology*. 72:450-456.

Montes-García JF., Chincoya Martínez DA., Vaca Pacheco S., Vázquez Cruz C., Sánchez Alonso P., Xicohtencatl Cortes J., Trujillo-Ruiz H. and Negrete-Abascal E. 2018. Identification of two non-fimbrial adhesins expressed by *Actinobacillus seminis*. *Current Microbiology*.

Monter J. L. 2010. Infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un modelo murino. Tesis de Doctorado. Universidad de León. España. 264p.

Morton D. J. y Williams P. 1989. Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins. *FEMSS Microbiology Letters*. 53:123-127.

Moustacas V. S., Silva T. M., Costa L. F., Carvalho C. A., Santos R. L., Paixao T. A. 2014. Clinical and pathological changes in rams experimentally infected with *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni*. *The Scientific World Journal*. 2014:1-10.

Negrete-Abascal E., Tenorio V. R., Guerrero A. L., García R. M., Reyes M. E., De la Garza M. 1998. Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 62:183-190.

Negrete Abascal, E., Chantes-Guerra, A., Serrano, V.A., Tenorio, V.R., Vázquez Cruz, C., Zenteno, E., and Vaca Pacheco, S. 2009. Expression of proteins from *Avibacterium paragallinarum* grown under iron restriction conditions. *Avian Pathology*. 38:209-213.

Núñez-del-Arco A., Salas-Téllez E., De la Garza M., Díaz-Aparicio E., Tenorio-Gutiérrez V. 2006. Identification of an immunogenic protein of *Actinobacillus seminis* that is present in microvesicles. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 70:43-49.

Ogunariwo J. A. y Schryvers A. B. 1992. Correlation between the ability of *Haemophilus paragallinarum* to acquire ovotransferrin-bound iron and the expression of ovotransferrin-specific receptors. *Avian Diseases*. 36:655-663.

Otto B. R., Verweij-Van Vught A. M., MacLaren D. M. 1992. Transferrins and heme compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 18:217-233.

Pérez D. P., Trigo T. F., De la Higuera J. J., Flores C. R. 1979. Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México causada por *Brucella ovis*. *Veterinaria México*. 10:221-226.

Puchalski A., Dec M., Wernicki A., Urban R., Gieral A. 2010. Characterization of outer membrane proteins participating in iron transport in *Pasteurella multocida* serotype A3. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 13:121-127.

Puchalski A., Urban R., Dec M., Wernicki A. 2013. An electrophoretic characterization of iron-transporting proteins in *Mannheimia haemolytica* A1. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 16:527-532.

Pradel E., Guiso N., Menozzi F. D., Lotch C. 2000. *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infection and immunity*. 68:1919-1927.

Rahman M., Rahman A., Maki T., Nishiuchi T., Asano T., Hasegawa H. 2014. A marine phytoplankton (*Prymnesium parvum*) up-regulates ABC transporters and several other proteins to acclimatize with Fe-limitation. *Chemosphere*. 95:213-219.

Ratledge C. y Dover L. G. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiologic*. 54:881-941.

Rea J. I. 2011. Respuesta a estrés por hierro en *Gallibacterium anatis*. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.

Reyes R. E., Manjarréz A., Drago M. E. 2005. El hierro y la virulencia bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 25:104-107.

Rivero-García P. C., Cruz C. V., Alonso P. S., Vaca S., Negrete-Abascal E. 2005. *Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases. *Canadian Journal of Microbiology*. 51:893-896.

Schaller A., Kuhnert P., De la Puente-Redondo V. A., Nicolet J. Frey J. 2000. Toxinas Apx en especies de *Pasteurellaceae* de animales. *Veterinary Microbiology*. 74:365-376.

Schryvers A. B. y Gonzales G. C. 1990. Receptors for transferrin in pathogenic bacteria are specific for the host's protein. *Canadian Journal of Microbiology*. 36:145-147.

Schryvers A. B. y Stojiljkovic I. 1999. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neissera*. *Molecular Microbiology*. 2:281-288.

Tang Y., Chakraborty R., García H., Chu J., Hazen T., Keasling J. 2007. Flux analysis of central metabolic pathways in *Geobacter metallireducens* during reduction of soluble Fe (III)-Nitrilotriacetic Acid. 73:3859-3864.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76:4350-4354.

Vargas G. A. 2016. El fibrinogeno: su fisiología e interacciones en el Sistema de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 39:321-323.

Wandersman C. y Stojiljkovic I. 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Current Opinion in Microbiology*. 3:215-220.

Wandersman C. y Delepelaire P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*. 58:611-647.

Wise D., Anderson C., Anderson B. 1997. Purification and kinetic characterization of *Haemophilus parasuis* malate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 344:176-183.

Wong. D., Lee B., Horwitz M., Gibson B. 1999. Identification of fur, aconitase and other proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Infection and Immunity*. 67:327-336.