



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA DE
Gallibacterium anatis 12656-12 MUTANTE EN *luxS*”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

DIANA ITZEL GUTIÉRREZ URBANO

DIRECTOR DE TESIS

DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo. Méx. 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética de la Unidad de Morfofisiología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, apoyado por el proyecto PAPIIT IN219919.

DEDICATORIA

A mi madre Estela Urbano por todo haberme apoyo en todo momento, por sus consejos, sus valores, por los ejemplos de perseverancia y constancia que la caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por la motivación constante que ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por su amor.

A mi abuelita Susana Lobera (QEPD) por cuidarme todo el tiempo que le fue posible, por enseñarme a perseverar y poder alcanzar mis metas, todo el cariño que me dio y toda la paciencia que me tuvo durante los años que estuvo conmigo, por preocuparse siempre por mis estudios y estar pendiente de que me enseñaran los mejores profesores, por eso y mucho más.

A mi gran amigo Willebaldo que me acompañó durante varios años de mi vida y gracias a él pude darme cuenta de que es lo que realmente quería hacer en mi vida, me apoyo en muchas ocasiones y siempre estuvo cuando más lo necesite, me enseñó a ser una mejor persona, a pesar de que tomamos caminos distintos sigue enseñándome.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por estar conmigo y permitirme llegar tan lejos y brindarme su apoyo moral y económico durante todo el camino que he recorrido para poder llegar hasta este momento.

A mi tutor el Dr. Erasmo por la paciencia y apoyo que me brindo durante el proyecto que realice, por hacerme ameno el trabajo en el laboratorio con sus bromas, por siempre estar al pendiente de mis avances y por darme la oportunidad de crecer y aprender cosas nuevas.

A mi hermano que siempre estuvo a mi lado apoyándome y dando fuerzas para no rendirme a pesar de las peleas continuas que teníamos nunca me dejo sola.

Al Dr. Sergio Vaca (QEPD) y M. C. Alina Uribe por sus sabios consejos y apoyo durante mi estancia en el laboratorio de genética, por la motivación brindada en momentos de desesperación.

A mis compañeros de laboratorio Fernando, Pamela y Francisco por haber compartido sus conocimientos y cumbiones, por los buenos momentos que me hicieron pasar y sobre todo por la amistad que me brindaron.

A mis compañeros y amigos Karina, Aketzalli, Lucero, Fanny y David que me acompañaron durante toda la universidad y me brindaron su apoyo incondicional y me ayudaron a crecer como persona.

A mi mejor amiga y compañera de vida Paulet Torres por estar siempre en los momentos que más la he necesitado y a pesar de no vernos demasiado cuando lo hacemos es como si no hubiera pasado el tiempo y gracias a ella he podido salir a delante de muchos problemas que se me han presentado.

INDICE

ABREVIATURAS	VII
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.	3
Enfermedades bacterianas en la industria agro-alimentaria	3
Familia <i>Pasteurellaceae</i>	3
<i>Gallibacterium anatis</i>	4
Factores de virulencia.....	6
Movilidad	8
Adhesión	8
Proteasas.....	8
Biopelícula	8
Toxina RTX GtxA.....	10
Vesículas de membrana externa	11
Cápsula.....	11
Hemaglutinación	11
Quórum sensing.	12
<i>luxS</i>	12
Estrés.....	13
Catecolaminas	15
Hierro	15
Antecedentes	17
Justificación.....	18
Objetivos	20
Objetivo general	20
Objetivos particulares.....	20
Materiales y métodos	21
Cepas bacterianas.	21

Efecto de los diferentes suplementos sobre el crecimiento de <i>G. anatis</i> 12656-12 y <i>G. anatis</i> 12656-12 $\Omega luxS$	21
Obtención de OMP's de las cepas de <i>G. anatis</i> 12656-12 y 12656-12 $\Omega luxS$ crecidos con los diferentes suplementos.	21
Obtención de Proteínas secretadas.	22
Electroforesis (SDS-PAGE).....	22
Inmunoreconocimiento.....	22
Cuantificación de la formación de biopelícula.....	23
Resultados	24
Efecto de los suplementos en el crecimiento de <i>G. anatis</i> 12656-12 y <i>G. anatis</i> 12656-12 $\Omega luxS$	24
Electroforesis (SDS-PAGE).....	29
Inmunoreconocimiento.....	31
Cuantificación de la formación de biopelícula.....	31
Discusión.....	38
Conclusiones	44
Bibliografía	45

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AIs	Autoinductores
BHI	Infusión cerebro corazón
CDT	Cytolethal distending toxin
D	2,2'Dipiridil
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Ácido tetracético etileno diamina
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
Epi	Epinefrina
GC	Glucocorticoides
HPA	Hipotálamo-hipófisis-adrenal
LEE	Regulón involucrado en el rasurado de enterocitos
NE	Norepinefrina
nt	Nucleótidos
OMP's	Proteínas de membrana externa
ORF	Marco de lectura abierto
QS	Quórum sensing
RTX	Repeats in toxin
TSB	Soya tripticaseína
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
VME	Vesículas de membrana externa

RESUMEN

Gallibacterium anatis es una bacteria miembro de la familia Pasteurellaceae que provoca diversas enfermedades en gallinas, y pérdidas económicas a la industria avícola por la baja en la postura, baja conversión alimenticia y mortalidad, principalmente cuando la enfermedad se complica por la presencia de otros agentes patogénicos. Este microorganismo posee diversos factores de virulencia, incluida la capacidad de producir biopelículas. La formación de biopelículas implica que el o los microorganismos involucrados presenten un comportamiento multicelular y por consiguiente, una regulación genética que les permita actuar de una manera coordinada; por ello, éstos microorganismos deben poseer mecanismos de comunicación mediados por moléculas señalizadoras denominadas autoinductoras (AIs), dependientes de densidad celular o quorum sensing (QS). Éste mecanismo permite controlar la expresión de diversos factores de virulencia, en diversos microorganismos. En el presente trabajo se realizó la caracterización parcial de una mutante *luxS* de *G. anatis* deficiente en la producción de la molécula AI-2. *G. anatis* silvestre 12656-12 y su mutante en *luxS* no fueron afectadas en su crecimiento por la adición de las hormonas epinefrina (Epi) y norepinefrina (NE), sin embargo, la mutante no es afectada tan drásticamente, como lo fue la cepa silvestre, al crecerlas en presencia del agente quelante de hierro 2,2, dipiridil. Estos efectos no cambian si se usan hormonas en solución congelada o recién preparadas; tampoco se modifican si las hormonas se mezclan con FeCl₃, ya que se ha reportado que Epi y NE pueden actuar como probables sideroforos que favorecen el crecimiento bacteriano. El análisis de los patrones de proteínas en geles de poliacrilamida, de ambas cepas, en presencia de hormonas y/o hierro, permite observar la expresión diferencial de proteínas de diversos pesos moleculares dependiendo de la fracción celular analizada: extractos totales, OMP's o proteínas secretadas. Esto confirma que Epi y NE funcionan como moléculas AI en *G. anatis*, y que están regulando la expresión genética de éste microorganismo. A pesar de que hormonas congeladas o recién preparadas no afectan el crecimiento de *G. anatis* silvestre o mutante, la formación de biopelícula si se afecta. Al usar hormonas congeladas, la producción de biopelícula se ve disminuida con respecto a las cepas sin suplementos. Usando hormonas recién preparadas, la cantidad de biopelícula formada por la cepa silvestre se ve incrementada, únicamente, cuando se suplementa el medio con Epi + FeCl₃; en el caso de la cepa mutante, hay una

mayor formación de biopelícula cuando el medio se suplementa con FeCl_3 o las hormonas más FeCl_3 . El efecto de Epi y NE, así como su combinación con FeCl_3 , no modifican la cantidad de biopelícula en la cepa silvestre, excepto cuando se incuba con 2,2, dipiridil, en que se aprecia una disminución de ésta en aproximadamente un 20%. Un efecto similar también es observado en la cepa mutante, existiendo una disminución de aproximadamente un 30%. En el caso de la mutante, se aprecia una menor cantidad de biopelícula en presencia de FeCl_3 o su combinación con hormonas; lo que sugiere una dispersión. La mutación del gen *luxS* en *G. anatis* induce cambios en su comportamiento, lo que confirma la participación de este gen en la regulación genética de *G. anatis*.

INTRODUCCIÓN.

Enfermedades bacterianas en la industria agro-alimentaria

Los seres humanos dependen de los animales para obtener alimentos y otros productos, para trabajar y diversos usos. Para satisfacer estas demandas, han domesticado diferentes especies de mamíferos, aves, reptiles, peces y artrópodos, estos animales reciben el nombre de ganado.

El ganado aporta un 40% del valor de la producción agrícola mundial y sostiene los medios de vida y la seguridad alimentaria de casi 1 300 millones de personas. El sector ganadero es uno de los sectores que más rápido crece en la economía agrícola. El crecimiento y la transformación del sector ofrecen oportunidades para el desarrollo agrícola, la reducción de la pobreza y la mejora de la seguridad alimentaria (FAO, 2019).

Hay tres factores esenciales del medio ambiente, en el que vive el ganado, que afectan directa o indirectamente a la producción ganadera: parámetros fisicoquímicos, alimentación y enfermedades. Como resultado de todo ello, muchos animales mueren a menudo muy jóvenes; los supervivientes crecen lentamente y/o producen poca descendencia.

Muchas enfermedades son causadas por bacterias patógenas de las familias: *Bacillaceae*, *Staphylococcaceae*, *Neisseriaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Brucellaceae*, *Streptococcaceae*, *Escherichia*, *Enterobacteriaceae* y *Pasteurellaceae*; estos microorganismos pueden causar enfermedades como: Ántrax, tuberculosis, brucelosis, adenitis, colibacilosis, coriza infecciosa, y cólera aviar, entre otras más.

Familia *Pasteurellaceae*.

La familia *Pasteurellaceae* esta constituida por bacterias Gram-negativas cocoides o bacilares con capacidad de formar filamentos, aeróbicas, micro-aerofilicas o anaerobias facultativas, con metabolismo quimio-organotrófico. Esta familia está constituida por 38 especies fielmente clasificadas y 24 especies sin una clasificación definida, la mayoría de estos miembros han sido aislados de enfermedades en animales de sangre caliente y en particular de animales de granja. Son consideradas parásitos obligados o comensales principalmente de las vías respiratorias, oro-faringe, aparato reproductor, tracto urogenital o intestinal de los vertebrados que colonizan (Fig. 1), pero también se consideran patógenos

potenciales o primarios de acuerdo con su contenido genético y si pueden infectar al ser humano o a otros animales; estos microorganismos puede causar infecciones locales o sistémicas y los mecanismos de virulencia han permanecido desconocidos o dudosos hasta los últimos años (Christensen y Bisgaard, 2008).

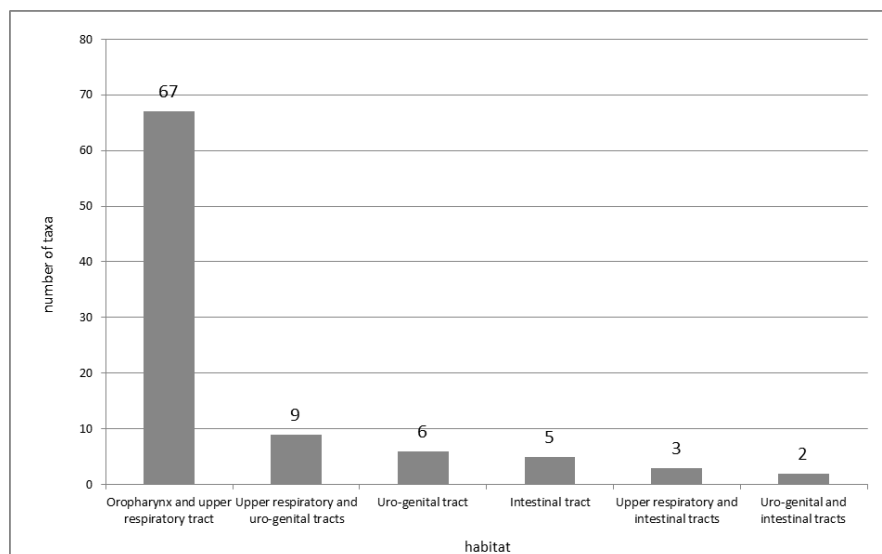


Figura 1. Distribución de la taxa *Pasteurellaceae* en relación con el hábitat (Christensen y Bisgaard, 2008).

Algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae* infectan animales y poseen atributos de virulencia que les permite actuar como patógenos primarios o potenciales, se consideran patógenos potenciales porque requieren de un factor de estrés o la presencia de otros microorganismos que faciliten su proliferación y por consiguiente su capacidad patogénica. Entre estos podemos encontrar a *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*, *Actinobacillus seminis* y *Gallibacterium anatis*. Estos microorganismos pueden ocasionar afecciones agudas, subagudas, o crónicas dependiendo del estado nutricional, genético o de la salud del hospedero (Montes-García *et al.*, 2016).

***Gallibacterium anatis*.**

Las bacterias previamente clasificadas como *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitidis* y *Pasteurella anatis*, aisladas de aves, fueron reclasificadas y reubicadas en el nuevo género *Gallibacterium* en el cual se integraron las especies *G. anatis* biovar hemolítico, *G. anatis* biovar anatis, *G. genomospecie 1*, *G. genomospecie 2*, *G.*

genomospecie 3, *G. melopsittaci*, *G. salpingitidis* y *G. trehalosiformentans*, las cuales tienen como huésped en común aves (Christensen et al., 2003; Bisgaard et al., 2009).

El género *Gallibacterium* se constituye de bacterias Gram-negativas, no móviles, en forma de bastón o pleomórficos, con células que se presentan individualmente y en pares. Colonias en agar sangre bovina son en su mayoría β -hemolíticas y algunas no hemolíticas, grisáceas, no transparentes, pero translúcidas en la periferia, con una consistencia butirosa, lisa y brillante, circular, levantadas con un margen completo y 1-2 mm de diámetro después de 24–48 h a 37°C. sin formación de endosporas. Su crecimiento es mesofílico y facultativamente anaeróbico o microaerófilo (Christensen et al., 2003).

Las pruebas bioquímicas para cepas de *Gallibacterium* son catalasa, oxidasa y fosfatasa positivas, reduce nitratos. Producen ácido sin producción de gas a partir de glicerol, (-) D-ribosa, (+) D-xilosa, (-)D-manitol, (-) D-fructuosa,(+) D-galactosa, (+) D-glucosa, (+) D-manosa, sacarosa y rafinosa. No presentan crecimiento simbiótico y son negativas las pruebas bioquímicas de citrato Simmons, malonato, H₂S /hierro triple azúcar, crecimiento en presencia de KCN, Voges-Proskauer a 37°C y ureasa (Christensen et al., 2003).

Algunas de las propiedades bioquímicas que distinguen a *G. anatis* se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Caracteres clave para la diferenciación de los biovares de *Gallibacterium anatis*.

Características	<i>Gallibacterium anatis</i>	
	Biovar anatis	Biovar hemolítica
Hemólisis (sangre ovina)	-	+
CO ₂ mejora el crecimiento	-	-
Crecimiento simbiótico (requisito β -NAD)	-	-
Catalasa	+	+
Ureasa	-	-
Indol	-	-
ODC	-	-
Forma ácido a partir		

(+)-L-Arabinosa	-	-
(+)-D-Arabinosa	-	(+)
(+)-D-Galactosa	+	+
Lactosa	V	V
Maltosa	-	V
(-)-D-Manitol	+	+
(+)-D-Manosa	+	+
(-)-D-Sorbitol	V	V
Trehalosa	+	V
ONPG	+	+
α -Fucosidasa	-	-
α -Galactosidasa	-	-
α -Glucosidasa	+	+
β -Glucosidasa	-	-
β -Xilosidasa	-	-
Hospedero	Aves, ganado	Aves, ganado

+, $\geq 90\%$ positivo; (+), $> 90\%$ positivo o débil positivo; -, $\leq 10\%$ positivo; V, 11-89% positivo (Blackall y Nørskov-Lauritsen, 2008).

Ésta bacteria forma parte del microbiota del tracto respiratorio superior y del tracto genital inferior en aves de corral y se asocia con cambios patológicos en los órganos reproductivos ya que puede actuar como patógeno oportunista y causar lesiones como atrofia folicular, ooforitis, septicemia, folículos deformes, peritonitis, agrandamiento de los riñones, enteritis, congestión, edema del tracto respiratorio; las afectaciones se pueden dar por factores como: infección simultánea con otros microorganismos, estrés hormonal e inmunosupresión lo cual conduce a una disminución en la producción de huevo y bienestar animal; y mayor mortalidad (Bojesen *et al.*, 2003; Persson y Bojesen, 2015).

Factores de virulencia.

Las bacterias pueden poseer diferentes mecanismos de patogenicidad específicos que expresan para superar las defensas del hospedero. Los microorganismos patógenos poseen la capacidad de producir un daño a cualquier nivel. La virulencia se puede medir cuantitativamente de la patogenicidad por el número de microorganismos necesarios para

causar una enfermedad. Las bacterias pueden adquirir características que les permiten invadir el ambiente del hospedero para su adhesión, evadir el sistema inmune y causar daño tisular para acceder a los nutrientes necesarios para su crecimiento y reproducción, por lo cual los factores de virulencia favorecen el crecimiento. Estos se agrupan en dos fases: temprana y tardía (tabla 2 y 3) (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014)

Tabla 2. Mecanismo de patogenicidad en bacterias patógenas: estrategias y factores de virulencia en la fase temprana (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014)

Estrategia.	Factor de virulencia
Adherencia.	Adhesinas fimbriales y no fimbriales. Internalización en células M.
Movilidad y quimiotaxis.	Flagelos, fimbrias.
Invasión por disparo o cierre.	Sistema de secreción tipo III, jeringas moleculares. Efectores de mimetismo molecular.

Tabla 3. Mecanismos de patogenicidad en bacterias patógenas: estrategias y factores de virulencia en la fase tardía (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

Estrategia.	Factor de virulencia.
Sobrevivencia intracelular.	Sideróforos. Efectores de mimetismo molecular.
Movilidad intracelular.	Efectores de escape vacuolar y de unión a componentes de citoesqueleto.
Evasión de la respuesta inmune y variación antigénica.	Cápsula, modificación de la envoltura celular, proteínas similares a inmunoglobulinas. Alteración y/o ausencia de presentación inmunológica.
Sometimiento y confrontación.	Uso y modificación de las enzimas hospederas, proteasas de IgAs, adherencia a receptores alternativos.

Movilidad

La movilidad es la facultad que tiene una bacteria de desplazarse en el medio, la cual esta asociada a la capacidad de producir estructuras filamentosas (flagelos) y representan una ventaja adaptativa, sin embargo tienen un alto costo energético. Montes-García en 2012 determinó las condiciones de movilidad *in vitro* en 2 cepas de *G. anatis* (F149^T y 12656-12) y usando microscopia electrónica de transmisión observó la presencia de un flagelo polar en ambas cepas y obtuvo una posible flagelina aproximadamente de 60 kDa.

Adhesión

Las infecciones generalmente se inician mediante la colonización; que es la capacidad de adherirse e invadir el tejido huésped. Se ha demostrado que *G. anatis* es capaz de adherirse a superficies inertes como vidrio y poliestireno; expresa fimbrias que contribuyen a su adhesión a las células epiteliales orofaríngeas de pollo y pueden ser importantes para la colonización del tracto respiratorio superior (Vaca *et al.*, 2011; Persson y Bojesen, 2015).

Proteasas

Una estrategia bacteriana es la producción de proteasas que son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas o péptidos. Estas enzimas desempeñan funciones importantes en la virulencia como: la colonización, la adquisición de nutrientes, la evasión inmune y la invasión bacteriana en la circulación sistémica (Persson y Bojesen 2015).

G. anatis secreta una proteína con masa molecular de 100 kDa la cual presenta una actividad proteolítica en geles de poliacrilamida al 10% adicionados con caseína bovina, ésta proteasa es activa en pH alcalino e inhibida en presencia de EDTA. Presenta una actividad estable a los 50°C, una inhibición parcial a los 60°C e inhibición total a temperaturas superiores. Es capaz de degradar IgG de pollo después de 24 h de incubación y muestra reactividad cruzada con antiseros policlonales contra una proteasa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (García-Gomez *et al.*, 2005).

Biopelícula

Las biopelículas bacterianas son una agregación de organismos asociados a una superficie inerte o viva, inmersos en una matriz extracelular auto-producida, constituida principalmente por agua, células bacterianas, exopolisacárido, sustancias poliméricas,

ácidos nucleicos y proteínas, así como también sales minerales, partículas y sedimento proveniente de las células bacterianas lisadas y del metabolismo, en menor cantidad (Dickschat, 2010). Estas estructuras le permiten al organismo presentar conductas multicelulares, sobrevivir en ambientes hostiles, resistir varios tipos de estrés y coordinadamente controlar la expresión de múltiples genes por medio de la liberación y detección de moléculas auto-producidas que les garantiza un efecto específico y suficiente para sobrevivir y permanecer por periodos prolongados en el ambiente o dentro de un hospedero (Montes-García *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que *G. anatis* es capaz de adherirse a superficies inertes lo que se considera un primer paso a la formación de biopelícula (Fig. 2) (Vaca *et al.*, 2011).

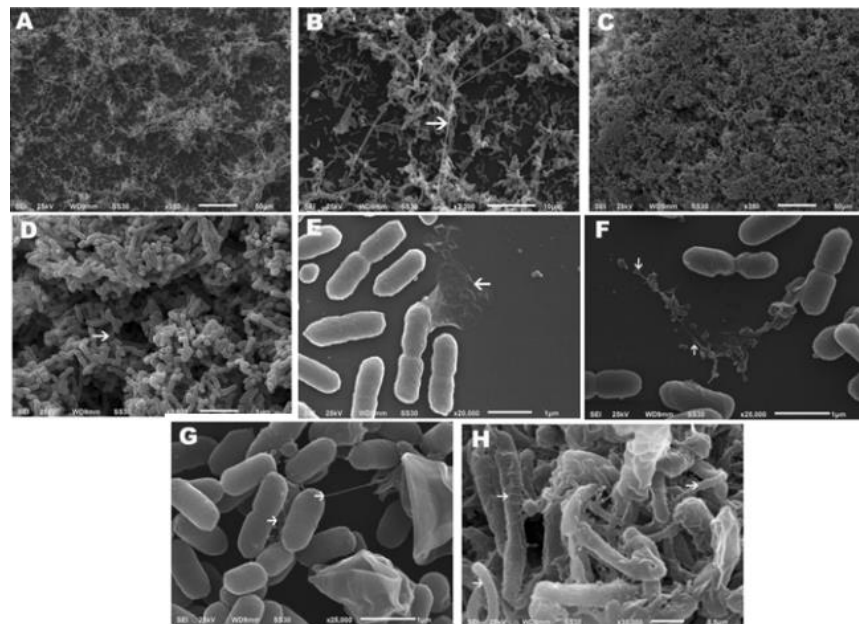


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido que muestran la adherencia de *G. anatis* al vidrio y diferentes componentes que participan en la formación de biopelícula. *G. anatis* cepas F149^T (imágenes A-D); CCM 5974 (E-G) y 12158/5 (H). Las imágenes A y B corresponden a muestras de 12 h de incubación; C y D a 48 h; E y F a 3 h; G a 6 h y H a 48 h. Formación de biopelícula de *G. antis* observada a baja amplificación (A-D). Productos extracelulares liberados en el medio por diferentes bacterias (flecha, E). Productos extracelulares asociados a microvesículas (flechas, F). Estructuras filamentosas cortas (B, D y G) largas (G y H) que unen bacterias cercanas o separadas (flechas) Los cordones filamentosos también se observan como parte de la complejidad de la biopelícula (H) (Vaca *et al.*, 2011).

Toxina RTX GtxA

Las proteínas tóxicas son importantes para la virulencia de muchas bacterias, en la familia *Pasteurellaceae* hay dos principales familias de toxinas: RTX (repeats in toxin) y CDT (Cytolethal distending toxin). Las RTX son proteínas grandes que en su región C-terminal contiene repeticiones ricas en glicina que se unen al calcio (Kachlany y Balashova, 2008).

GtxA es un nuevo tipo de RTX y es responsable por la actividad leucotóxica y hemolítica de *G. anatis*. El marco de lectura abierto (ORF) de 6081 nucleótidos (nt) que codifica esta proteína fue nombrado *gtxA*: *gtx* para *Gallibacterium* toxina y A por analogía con la designación de gen de la toxina en otros operones RTX. *gtxA* es seguido por una región intergénica muy corta de cinco nt y un ORF de 492 nt que codifica una proteína predicha de 163 aminoácidos (Fig. 3) (Kristensen *et al.*, 2010).

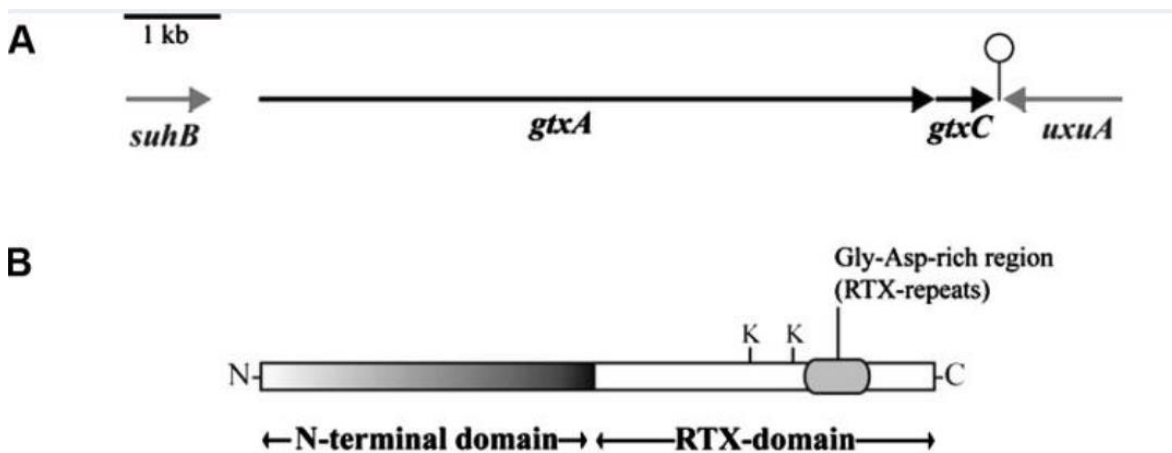


Figura 3. Organización y ubicación en el genoma de la *gtxA* de *G. anatis*. A). Organización genética de *gtxA*, *gtxC* y sus genes de acompañamiento en *G. anatis* 12656-12. Las flechas indican el ORF. Un terminador transcripcional predicho se indica río abajo de *gtxC*. B) Organización de *GtxA*. K indica residuos de lisina conservados (Lys1484 y Lys1607). La región rica en aspartato y glicina (posición 1640-1830) está marcada (Kristensen *et al.*, 2010).

GtxA difiere de otras toxinas RTX por ser el doble de grande y tener una nueva estructura bimodular y la mitad N-terminal de la proteína, tiene una homología limitada con las proteínas descritas. GtxA se exporta desde la célula bacteriana y se detecta exclusivamente en la fracción de proteína extracelular de forma dependiente de la fase de crecimiento, pero a diferencia de la mayoría de las toxinas RTX, *gtxA* no se co-transcribe con genes involucrados en su secreción (Kristensen *et al.*, 2010)

Vesículas de membrana externa

Las vesículas de membrana externa (VME) son estructuras esféricas, bicapadas, membranosas de entre 10 y 300 nm de diámetro, complejas con una enorme diversidad funcional, producidas por la gemación de la membrana externa (Bager *et al.*, 2013).

En *G. anatis* las vesículas no parecen estar involucradas en la hemólisis o proteólisis. Se ha especulado que podrían actuar como posible factor de virulencia importante para la adherencia, colonización del huésped, modulación de la respuesta inmune del huésped, o la eliminación de sustancias bactericidas; lo cual ayuda a la supervivencia del microorganismo (Persson y Bojesen, 2015).

Se demostró que *G. anatis* produce VME *in vitro*; la producción de estas VME se ve afectada por las condiciones de crecimiento, los autores identificaron una proteína como parte de las VME con posible identidad similar a la hemaglutinina FhaB de *Bordetella pertussis* y sugieren que la producción de VME por *G. anatis* es multifuncional y podría ser un medio para adaptarse a entornos cambiantes dentro del huésped (Bager *et al.*, 2013).

Cápsula

La cápsula es una red de polímeros que cubre la superficie de una bacteria, compuesta de polisacáridos que protege a la bacteria de la respuesta inflamatoria del hospedero. Se demostró que la mutante de cápsula ($\Delta gexD$) de *G. anatis* es más virulenta que la cepa silvestre, sin embargo aún se desconoce la función de la cápsula en *G. anatis* (Persson y Bojesen, 2015).

Hemaglutinación

Algunas cepas de *G. anatis* son capaces de aglutinar eritrocitos aviares; se observó la aglutinación de eritrocitos de pollos de engorda, gallinas ponedoras, codornices, cenejos y eritrocitos de cerdo, sin embargo, en este estudio no se asoció ningún componente bacteriano con esta función; (Zepeda *et al.*, 2009). En un estudio posterior se identificó una proteína aproximadamente de 65 kDa con actividad hemaglutinante que también interacciona con el fibrinógeno biotilado de oveja o cerdo y la proteína esta presente en la biopelícula (Montes-García *et al.*, 2016).

Quórum sensing.

Las bacterias utilizan muchos mecanismos para comunicarse entre sí y con su entorno. El quórum sensing (QS) es un mecanismo de comunicación celular dependiente de la densidad poblacional que contribuye a la patogenicidad; mediante este proceso se liberan y detectan moléculas químicas denominadas autoinductores (AIs), las cuales permiten controlar comportamientos multicelulares como por ejemplo, bioluminiscencia, formación de biopelículas, expresión de factores de virulencia, producción de antibióticos, esporulación y competencia para la captación de ADN (Camilli y Bassler, 2006).

Se sabe que los patógenos Gram-negativos y Gram-positivos usan moléculas AIs para coordinar la expresión de genes cruciales para la virulencia y la supervivencia; estas moléculas se agrupan básicamente en cuatro sistemas de regulación global de QS que controlan la expresión de determinados genes que son AI-1/LuxIR, AI-2/LuxS, AI-3/QsC y AIP-base Agr (Martínez, 2013)

El único sistema de QS compartido por las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas implica la producción del AI-2 por la enzima LuxS. Esta vía se encuentra en más de 55 especies, lo que sugiere que AI-2 es un lenguaje universal para la comunicación entre especies (Vendeville et al., 2005).

luxS

El diéster de borato de furanosilo se ha denominado AI-2. Se ha confirmado que el producto de *luxS* (S-ribosilhomocisteinasa) es una enzima intermedia en la biosíntesis de la molécula AI-2 (Inzana *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que los genes *luxS* son responsables de la producción de AI-2. En bacterias patógenas, se ha informado que los sistemas de señalización AI-2 juegan un papel importante en la regulación de los factores de virulencia, incluido el sistema de secreción tipo III en *Escherichia coli* enterohemorrágica y hemolisina y cisteína proteasa en *Streptococcus pyogenes*, sin embargo, el papel del sistema AI-2 en la regulación de los genes de virulencia aún no está claro en muchas bacterias patógenas (Ohtani *et al.*, 2002).

Estrés

Se ha destacado la importancia del bienestar animal, por calidad e impacto en la producción ganadera. El estrés se puede definir como una respuesta biológica producida cuando un individuo percibe una amenaza a su homeóstasis o parámetros fisiológicos. El estrés además de perturbar el bienestar, afecta negativamente la rentabilidad y viabilidad económica de la actividad ganadera, tales efectos incluyen cambios en la función inmune y consecuente aumento de la susceptibilidad a las enfermedades, disminución de la ingesta de alimentos, afectándola producción de carne tanto en rendimientos físicos como en la calidad del producto (Odeón y Romera, 2017).

Los estresores pueden ser físicos (daño, sobreexigencia, calor o frío, ruidos) o psicológicos (eventos inesperados tales como la frustración, el aislamiento, la separación materna o hechos traumáticos) inducen diferentes respuestas tanto conductuales como fisiológicas, las respuestas al estrés no son simples ni constantes, si no que dependen de la duración e intensidad del estímulo y la experiencia del animal, estas se desarrollan en 3 etapas:

1. Fase de alarma simpática (breve, fugaz)
2. Fase de resistencia (duradera y estrés)
3. Fase de agotamiento (pérdida de la adaptación y ruptura del estado de salud; diestrés)

Resulta importante determinar cuando el estrés se transforma en diestrés y el cómo medir ambos, la respuesta o defensa biológica contra el agente estresante que consiste en algunas combinaciones posibles de réplicas generales: la comportamental, la del sistema nervioso autónomo, la neuroendocrina y la inmune. Ésto genera que se altere la función biológica de manera que se producirá un desplazamiento de los recursos o actividades que ocurran antes de la actuación del estresor, denominándose a este cambio “costo biológico del estrés (Odeón y Romera, 2017).

La respuestas conductuales pueden disminuir el riesgo y alejar al individuo del peligro, pero también pueden agravar las consecuencias fisiológicas, a través de comportamientos autodestructivos. La respuesta fisiológica (incremento de la presión arterial, aumento de la frecuencia cardíaca, elevación de los niveles de glucocorticoides, alteraciones metabólicas e

impedimento de realización de las funciones cognitivas) comienza con la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), el sistema nervioso autónomo y el sistema inmune, cuyos mediadores fisiológicos son los glucocorticoides (GC), catecolaminas y citoquinas, respectivamente. El eje HPA es la respuesta neuroendocrina responsable de la regulación de la secreción de GC en la corteza adrenal y de desencadenar las respuestas ante una situación de estrés (Odeón y Romera, 2017).

La respuesta fisiológica da inicio a eventos celulares que promueven cambios adaptativos en las células y en los tejidos, protegiendo al organismo y promoviendo su supervivencia (Fig. 4) (Odeón y Romera, 2017).

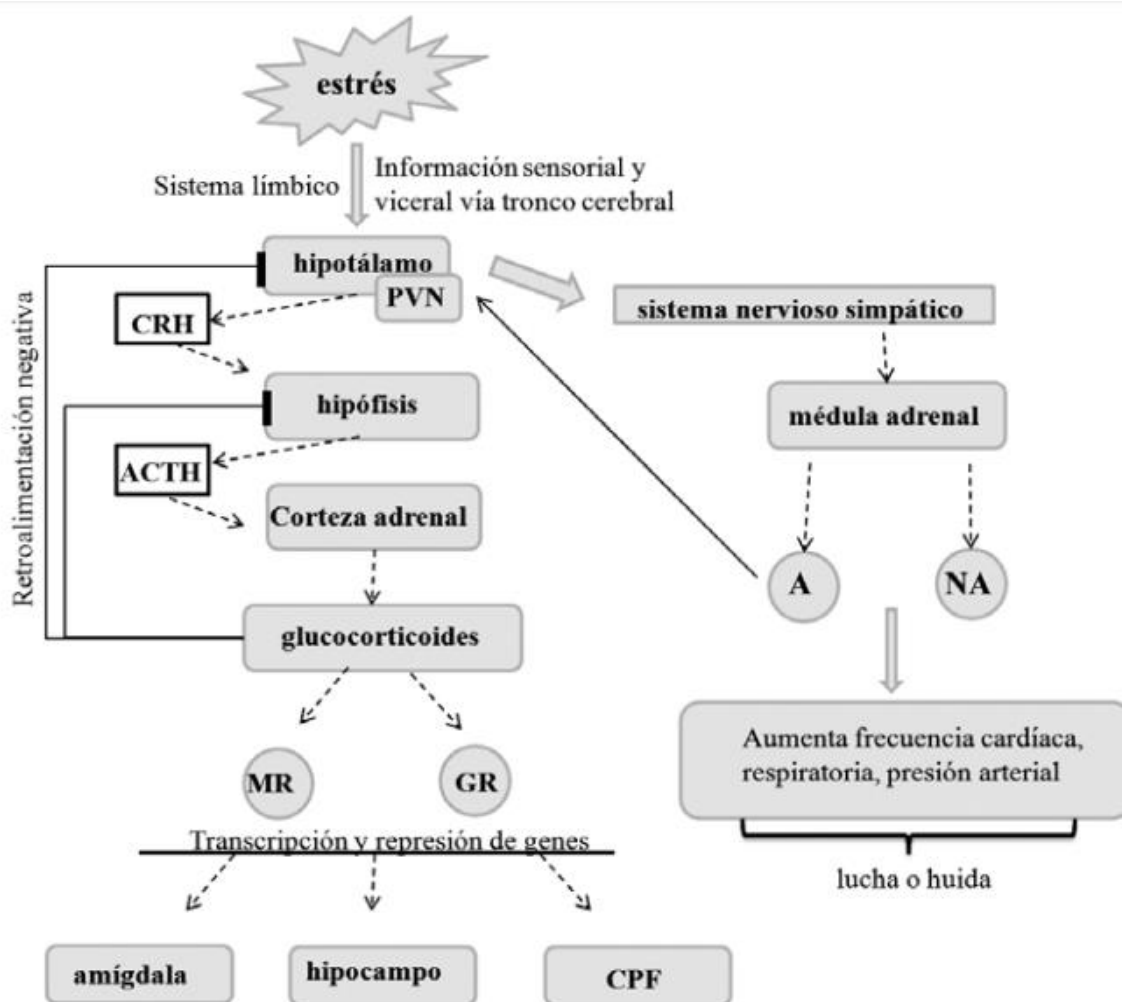


Figura 4. Respuesta al estrés: estructuras anatómicas involucradas en la activación del eje hipotálamo-hipófisisadrenal. A: adrenalina, NA: nor-adrenalina, PVN: núcleo

paraventricular, MR: receptor de mineralocorticoides, GR: receptor de glucocorticoides, CPF: corteza prefrontal (Odeón y Romera, 2017).

La adquisición de algunos nutrientes esenciales como el hierro en el entorno del huésped es clave para una infección exitosa por patógenos bacterianos, sin embargo gran parte del hierro extracelular en el huésped está unido a glicoproteínas quelantes de hierro con alta afinidad que pertenecen a la familia de la transferrina; las catecolaminas como la epinefrina y la norepinefrina liberan el hierro de la lactoferrina y transferrina por lo que está disponible para el crecimiento bacteriano, ya que las catecolaminas son capaces de unirse al hierro (Anderson y Armstrong, 2008)

Catecolaminas

Las catecolaminas son hormonas que afectan profundamente la microbiota residente del intestino de mamíferos. Por lo cual son importantes para la regulación de la virulencia de los patógenos. Se ha demostrado que la Norepinefrina, en presencia de hierro, estimula el crecimiento de *Bordetella bronchiseptica* pero no así la lactoferrina, Se sabe que la Norepinefrina induce la transcripción del gen receptor de xenosideróforo tipo catecol de *Bordetella bfeA* (Pasupuleti *et al.*, 2018; Anderson y Armstrong 2008).

El catecol posee una alta afinidad por el hierro III en virtud de los dos átomos de orto-fenolato, cada uno con una alta densidad de carga, como lo indican los valores pKa asociados (Hider y Kong 2010).

Hierro

El hierro se clasifica como un metal de transición que suele actuar como un vehículo para la transferencia de electrones, logrando recuperar su estado inicial después de intervenir en un ciclo completo y también puede producir un cambio en los agentes que intervienen en la reacción como sucede con la citocromo oxidasa; que transforma al O₂ en H₂O. Es constituyente de otras proteínas igualmente importantes como son las oxigenasas, las flavoproteínas y las redoxinas (Peñalosa-Castro 2010).

Éste es esencial para casi todos los organismos así como animales, plantas hongos y bacterias, debido a su transporte de electrones y los procesos metabólicos

El hierro es un metal esencial para casi todos los microorganismos como animales, plantas, hongos y bacterias debido a su participación en el transporte de electrones.

Antecedentes

En el 2013 Martínez evaluó el efecto de sobrenadantes de cultivo, medio condicionado, epinefrina (Epi) o norepinefrina (NE) sobre la formación de biopelícula, el crecimiento y la expresión diferencial de proteínas de membrana externa en dos cepas de *G. anatis* (12656-12 y F149^T). La adición de sobrenadantes o medio de cultivo como posibles fuentes de AIs, generó una disminución en la formación de biopelícula, así como en el crecimiento. Por otro lado, la adición de Epi o NE produjo un incremento en el crecimiento de *G. anatis* 12656-12, pero no en el de la cepa F149^T; sin embargo en ambos biovares se incrementó la formación de biopelícula. La expresión de 3 proteínas de aproximadamente 49, 55, 70 y 150 kDa y la sobre expresión de una proteína de 51 kDa, se indujo en la variedad hemolítica, en presencia de Epi o NE; mientras que en la no hemolítica se sobre expresaron proteínas de 55, 67, 70, y 150 kDa; y la expresión de 2 proteínas de 200 y 250 kDa fue reprimida en presencia de NE pero no de Epi. La presencia de un gen *luxS* fue confirmada en ambas cepas a través de la amplificación por PCR del gen *luxS*, su secuenciación y su análisis por Blast.

Kendall y colaboradores en el 2007 determinaron que la señalización celular por AI-2, AI-3, Epi y NE afectan la expresión génica global de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). EHEC puede reconocer 4 señales: AI-2, AI-3 y las hormonas Epi y NE, todas importantes en la comunicación. La mutación *luxS* afecta principalmente a los genes metabólicos centrales en cepas patógenas y no patógenas de *E. coli* sin embargo, la adición de AI-2 exógena no restaura completamente el perfil de expresión en una cepa deficiente en *luxS*. La adición de AI-3 o epinefrina aumenta la expresión del locus de regulación involucrado en el rasurado de enterocitos (LEE), que desempeña un papel fundamental en la virulencia de EHEC. Cuando añadieron epinefrina al medio de cultivo, observaron un mayor número de expresiones genéticas en los genes MG1655, por lo que sugieren que la epinefrina puede ser una señal de virulencia global. Utilizando PCR de tiempo real (RT-PCR), y con la adición de AI-3 y epinefrina, se confirmaron los aumentos en la expresión de los genes de virulencia LEE. Estudios adicionales de RT-PCR en tiempo real que examinaron los efectores secretados por EHEC y la expresión del gen putativo fimbrial mostraron un perfil de expresión variable de LEE, indicando que hay una regulación diferencial de las moléculas secretadas.

Justificación

La carne y los huevos de aves de corral se consideran componentes muy importantes y altamente sostenibles de la dieta mundial futura; en el 2014, México produjo casi 3 millones de toneladas de pollo para consumo y más de 2 millones de toneladas de huevo (SAGARPA, 2015). En el 2016 la producción de carne de porcino y ovino disminuyó, mientras que hubo un incremento en el consumo de la carne de aves de corral y bovina. Se ha predicho que la producción mundial de carne aumentará un 13% en 2026, en comparación con un aumento de alrededor del 20% en la última década. Los países en desarrollo presentarán un incremento en el consumo de carne de aves de corral y bovina, principalmente de la de ave (AVEC, 2017).

Diferentes patologías, como: septicemia pericarditis, hepatitis, ovaritis, degeneración del folículo, enteritis, lesiones del tracto respiratorio superior, salpingitis bacteriana y la peritonitis, causan problemas comunes en la producción avícola moderna. Estas patologías provocan un impacto negativo en la producción de huevo y aumentan la mortalidad de las aves comerciales. Entre los agentes bacterianos asociados con estas patologías se encuentra *G. anatis* (Pors et al., 2016), el cual actúa como un patógeno oportunista particularmente en los órganos reproductivos, lo que conduce a una disminución en la producción de huevo, un menor bienestar animal y una mayor mortalidad (Bojesen *et al.*, 2003).

De acuerdo con la importancia de *G. anatis* y los procesos de infección, los patógenos requieren de la liberación de múltiples factores de virulencia cuya expresión se encuentra regulada por el Quórum sensing, el sistema puede ser regulado por el AI-2/*luxS*, el cual se encuentra presente en *G. anatis* y no se han descrito los factores de virulencia que regula.

Recientemente, se ha generado una herramienta molecular que permitirá realizar estudios genéticos en *G. anatis* (López Ochoa et al., 2019), éste tipo de herramientas son escasas para los miembros de ésta familia. Con el uso de esta herramienta, se logró, con el uso de un cassette que codifica para resistencia a estreptomicina, la interrupción del gen *luxS* en *G. anatis* 12656-12 y F149^T (López Ochoa, 2019). En el presente trabajo se realizó un caracterización parcial de la mutante *luxS* de la cepa *G. anatis* 12656-12.

El entendimiento de la regulación genética en la expresión de elementos que participen en la adhesión y formación de biopelícula en *G. anatis*, podría ayudar a entender la

participación de estos componentes bacterianos en la patogenicidad de *G. anatis*, con lo que se podría evitar la colonización por este patógeno y con ello reducir el daño al hospedero.

Objetivos

Objetivo general

- Caracterización parcial de la cepa *Gallibacterium anatis* 12656-12 mutante en *luxS*.

Objetivos particulares

- Determinar el efecto de D, Epi, NE, FeCl₃, FeCl₃-Epi o FeCl₃-NE en el crecimiento de *G. anatis* 12656-12 y 12656-12 Ω *luxS* al crecerlas en medio TSB a 37°C en agitación durante 24 h
- Determinar la expresión diferencial de proteínas en presencia o no de D, Epi, NE, FeCl₃, FeCl₃-Epi o FeCl₃-NE en la formación de biopelícula.
- Evaluar la formación de biopelícula a las 24 h de incubación en presencia o no de D, Epi, NE, FeCl₃, FeCl₃-Epi o FeCl₃-NE en medio TSB a 37°C
- Determinar el efecto de D, Epi, NE, FeCl₃, FeCl₃-Epi o FeCl₃-NE en la biopelícula formada de *G. anatis* en medio TSB a 37°C
- Determinar las diferencias inmunogénicas en los patrones de proteínas de *G. anatis* 12656-12 y 12656-12 Ω *luxS* crecidas en presencia o no de D, Epi, NE, FeCl₃, FeCl₃-Epi o FeCl₃-NE.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas.

En el presente trabajo se utilizaron las cepas de *G. anatis* 12656-12 (biovar hemolítico, cepa silvestre) y *G. anatis* 12656-12 mutante en *luxS*. Para su conservación fueron sembradas en placas de agar infusión cerebro corazón (BHI) adicionado con sangre de borrego al 5%.

Efecto de los diferentes suplementos sobre el crecimiento de *G. anatis* 12656-12 y *G. anatis* 12656-12 $\Omega luxS$.

Para determinar el efecto de las hormonas e hierro en el crecimiento de *G. anatis* silvestre y mutante, las bacterias se cultivaron en tubos de ensayo con 3 ml de medio soya tripticaseína (TSB) durante 24 h a 37°C de los cuales se tomaron alícuotas de 30 μ l y se agregaron a 14 tubos con 3 ml de medio TSB, 7 por cada cepa y se dejaron creciendo hasta alcanzar una $\lambda^{600}=0.1$. Posteriormente los diferentes suplementos indicados en la tabla 4 fueron adicionados en todos los cultivos y/o experimentos realizados a lo largo de este trabajo. Se realizaron lecturas de densidad óptica a 600 nm cada hora durante 6 h y posteriormente a las 24 h.

Tabla 4. Suplementos utilizados durante todo el trabajo.

Suplemento	Cantidad
2,2' Dipiridil (D)	0.4 mM
Epinefrina (Epi)	50 μ M
Norepinefrina (NE)	50 μ M
FeCl ₃	100 μ M
Epi-FeCl ₃	50 μ M-100 μ M
NE-FeCl ₃	50 μ M-100 μ M

Obtención de OMP's de las cepas de *G. anatis* 12656-12 y 12656-12 $\Omega luxS$ crecidos con los diferentes suplementos.

Con pre-inóculos de *G. anatis* 12656-12 y *G. anatis* 12656-12 $\Omega luxS$ que se dejaron incubando toda la noche en agitación a 37°C se inocularon al 1% 7 matraces con 100 ml de

medio TSB por cada cepa y se dejaron incubando a 37°C en agitación hasta alcanzar el crecimiento adecuado para después adicionarle los diferentes suplementos de la tabla 4 e incubar 24 h.

los cultivos se centrifugaron a 10500 rpm durante 20 min , la pastilla celular se resuspendió en 2 ml de HEPES-lisozima 10 mM pH 7.4 (1 ml/1 mg) y se incubaron 1 h a 37°C en agitación, posteriormente fueron sonicados durante 3 min en ciclos de 15 seg de sonicación y 10 seg de descanso todo el tiempo en hielo. Posteriormente, los cultivos sonicados fueron centrifugados a 13000 rpm durante 2 min para eliminar las células no rotas, el sobrenadante fue recuperado y se centrifugo a 13000 rpm durante 30 min y la pastillas fueron resuspendidas en HEPES 10 mM pH 7.4 y HEPES 10 mM pH 7.4 con 2% de tritón X-100 y se incubaron durante 1 h a 37°C, en seguida se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 min, los pastillas se resuspendieron en HEPES 10 mM pH 7.4, y se conservaron en congelación al igual que los sobrenadantes.

Obtención de Proteínas secretadas.

Después de 24 h de crecimiento, el sobrenadante libre de células se precipito con sulfato de amonio al 70% de saturación, en refrigeración durante toda la noche, posteriormente se centrifugo a 10500 rpm durante 20 min para recuperar las proteínas precipitadas y la pastilla se resuspendio en 300µl HEPES 10 mM pH 7.4 y se conservaron en congelación.

Electroforesis (SDS-PAGE)

Las proteínas secretadas y las OMP's obtenidas fueron cuantificadas y posteriormente se tomaron 15 µg de proteína a los cuales se les agregó de buffer de corrida 6X y β-mercaptoetanol al 5% y se depositaron en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% y separadas electroforéticamente a 95 V durante 120 min. Al terminar se tiñeron con azul coomassie R-250 0.1%, metanol 40%, y ácido acético al 10% durante 30min. y se destiñeron con ácido acético al 10%.

Inmunoreconocimiento

Para determinar si las proteínas expresadas eran inmunogénicas, éstas se separaron por electroforesis en 2 geles de poliacrilamida al 10%, de los cuales uno se tiño para observar patrones y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 300 mA por una hora en frío. Las membranas fueron bloqueadas con PBS-TWEEN 0.5% y caseína al 1% durante 1

h a 37°C en agitación, se retiró la caseína y se lavó 3 veces con PBS-TWEEN 0.5% durante 10 min. en agitación, después se incubó con un anticuerpo primario (suero de aves infectadas con *G. anatis* 1:1000) y se dejó 2 h en agitación, enseguida se retiró el anticuerpo, se lavó de la misma forma y se incubó con un anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-pollo marcado con peroxidasa) durante 2 h en agitación y se lavó, por último se hizo reaccionar con una solución de ácido fosfórico 10 mM pH7.4, diaminobenzidina, cloruro de níquel/cloruro de cobalto y peróxido de hidrogeno, se colocó en agitación hasta obtener reacción y se retiró de la solución.

Cuantificación de la formación de biopelícula.

Con pre-inóculos de las cepas que se dejaron incubando toda la noche en agitación a 37°C se inocularon al 10% tubos de ensaye con 3 ml de medio TSB y se coloraron los suplementos (Tabla 4). Para determinar la formación de biopelícula, se realizaron ensayos en placas de poliestireno con 96 pozos, se colocaron 200 µl de cada cepa por pozo con los suplementos a las cantidades especificadas previamente. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C, posteriormente el líquido se eliminó tratando de no retirar la biopelícula, enseguida, la biopelícula fue fijada con metanol durante 15 min., se retiró el metanol. La biopelícula fue teñida con cristal violeta al 0.1% durante 15 min, se recuperó el colorante y se lavó con agua corriente para retirar el exceso de colorante, secándolo bien y colocando ácido acético al 30%, el colorante extraído fue cuantificado espectrofotométricamente a 630 nm en un lector ELISA, previamente diluyendo 1:5 (Fedeheim et al., 2009).

Resultados

Efecto de los suplementos en el crecimiento de *G. anatis* 12656-12 y *G. anatis* 12656-12 Ω luxS.

El crecimiento de la cepa silvestre, en presencia o no de hormonas, no muestra diferencias significativas, sin embargo, parece que el crecimiento es ligeramente mayor por 0.08 unidades de densidad óptica (D.O.) de absorbancia en presencia de Epi (Fig.5). El crecimiento de la cepa mutante parece ser mayor por 0.2 unidades de D.O. de absorbancia que la silvestre; la presencia de D, no afecta de manera sustancial a la cepa mutante (Fig. 6) en comparación con la cepa silvestre que no alcanza una absorbancia mayor a 0.4 D.O. (Fig. 5).

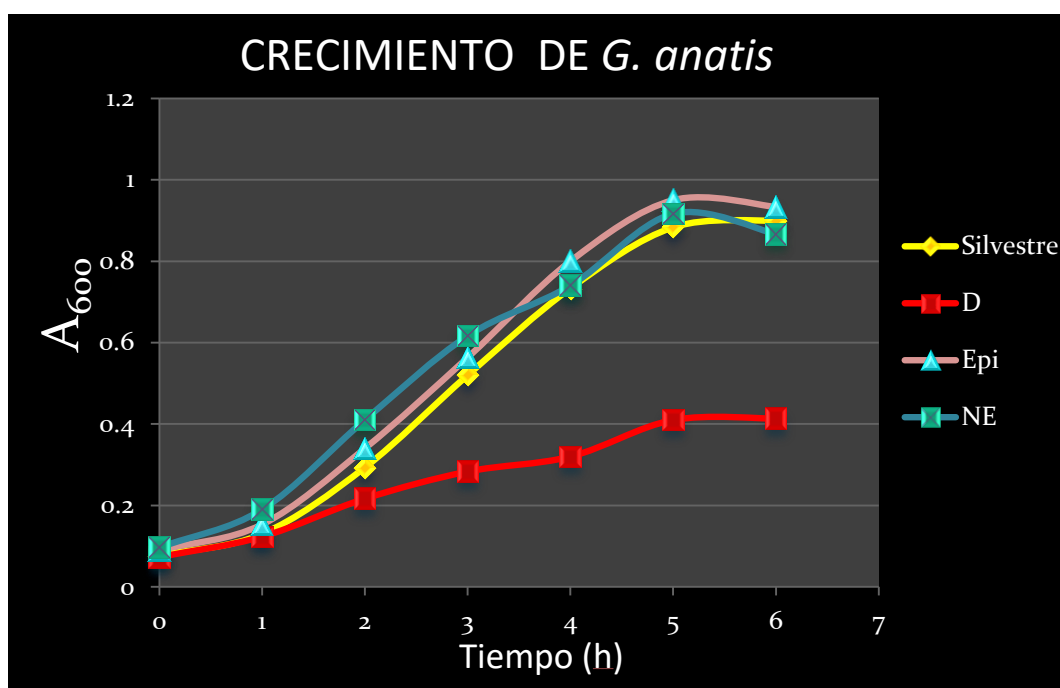


Figura 5 Curva de crecimiento de la cepa 12656-12 con los diferentes tratamientos.

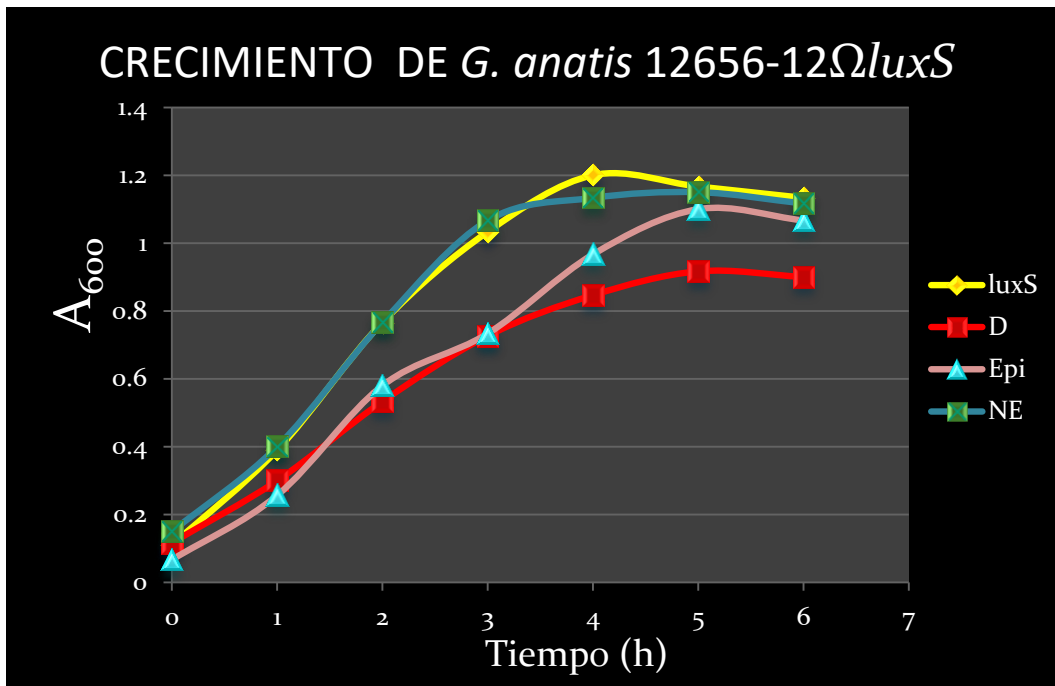


Figura 6 Curva de crecimiento de la cepa 12656-12 Ω luxS con los diferentes tratamientos.

Como ya se mencionó antes, las hormonas pueden actuar como sideróforos por los cual se probó el efecto de estas hormonas en presencia de hierro: FeCl_3 , FeCl_3 -Epi y FeCl_3 -NE. Se puede observar un aumento en el crecimiento de la cepa silvestre (de 0.12 D.O.) con la adición de FeCl_3 , pero la presencia de las hormonas, no afectan el crecimiento de esta cepa (Fig. 7). Un efecto similar fue observado con la cepa mutante (Fig. 8). El crecimiento fue muy similar al observado previamente (Fig. 6).

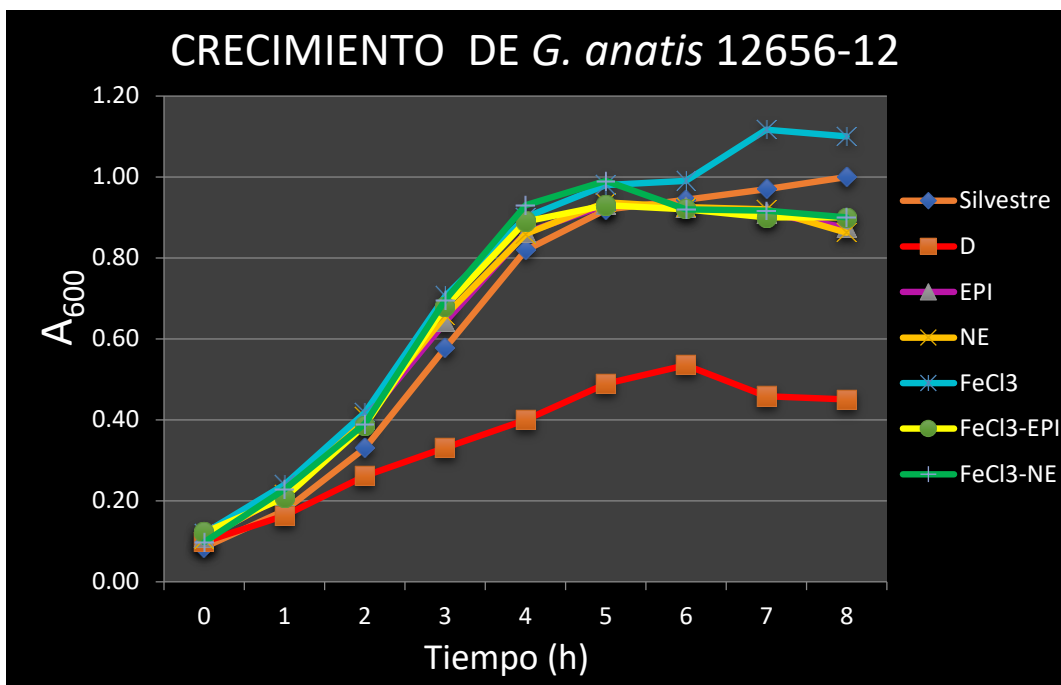


Figura 7. Curva de crecimiento de la cepa 12656-12 con los diferentes tratamientos con hormonas congeladas.

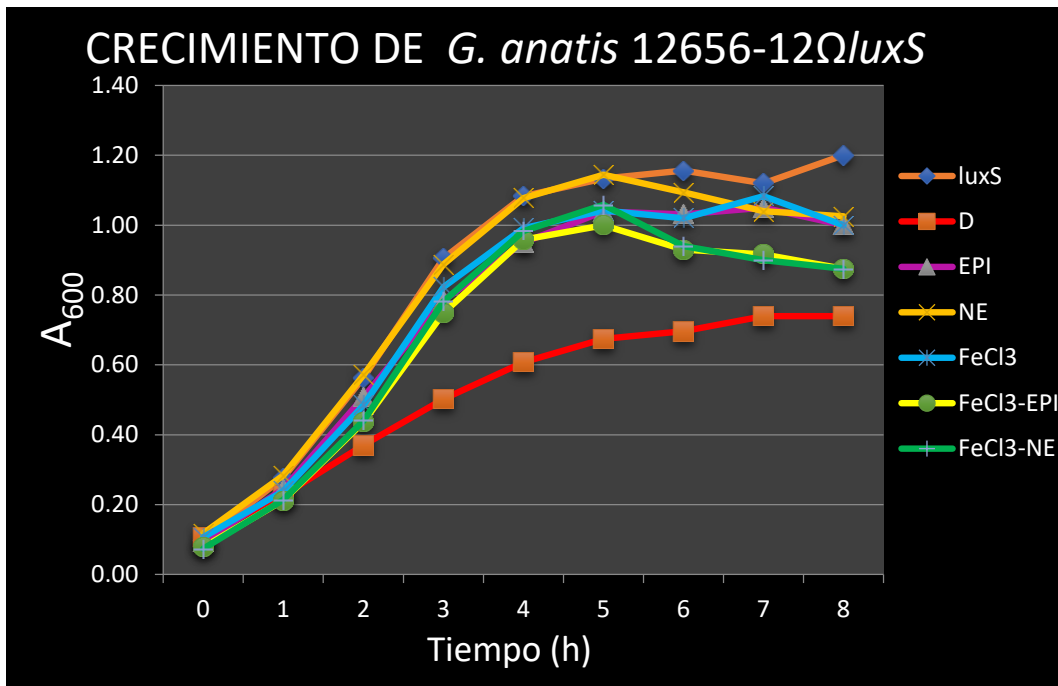


Figura 8 Curva de crecimiento de la cepa 12656-12ΩluxS con los diferentes tratamientos con hormonas congeladas.

De acuerdo a las fichas técnicas de las hormonas, éstas no deben ser refrigeradas o congeladas y ser preparadas al instante de ser utilizadas, por lo cual se llevó acabo un nuevo experimento con hormonas recién preparadas. Los resultados observados indican que las hormonas recién preparadas y el hierro no tienen un efecto diferente en el crecimiento de la cepa silvestre (Fig. 9) a como se había observado con las hormonas congeladas (Fig. 7). Un efecto similar fue también observado con la cepa mutante (Fig. 10)

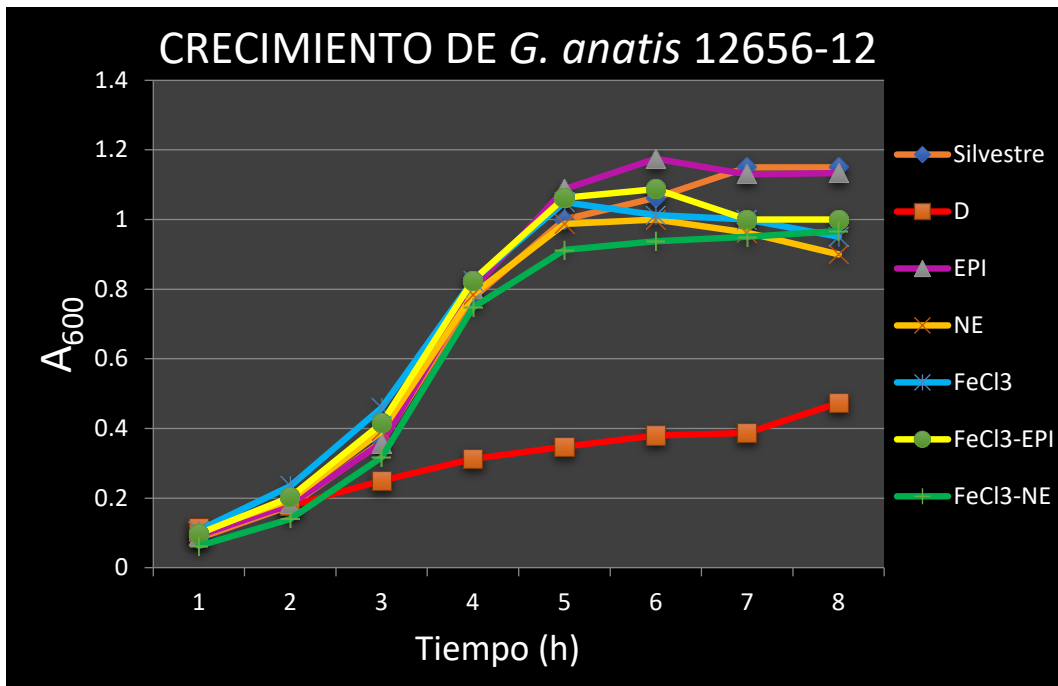


Figura 9 Curva de crecimiento de la cepa 12656-12 con los diferentes tratamientos con hormonas preparadas al momento.

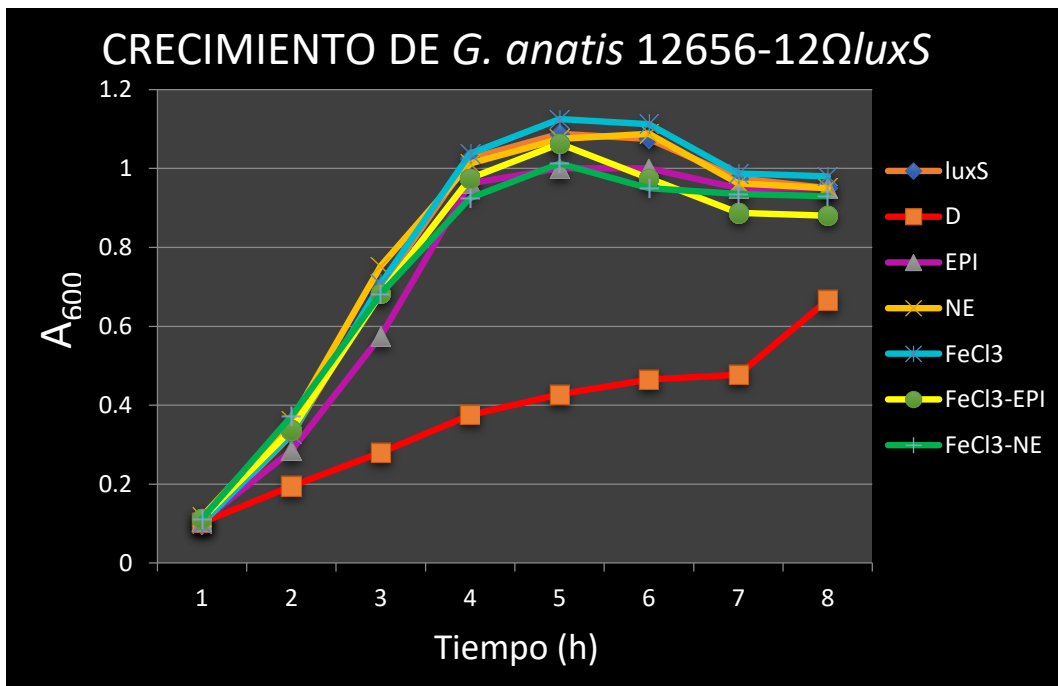


Figura 10 Curva de crecimiento de la cepa 12656-12 Ω luxS con los diferentes tratamientos con hormonas preparadas al momento.

Electroforesis (SDS-PAGE)

El crecimiento del cepa silvestre y de la mutante en presencia o no de D, Epi y NE permite ver diferencias en las bandas de proteína de aproximadamente 150,100, 50, 20 y 15 kD en la cepa silvestre, a las 4 h de crecimiento (Fig. 11A), mientras que en la mutante se observaron diferencias en bandas aproximadamente de 100, 50, 25 y 15 kD al mismo tiempo (Fig. 11B)

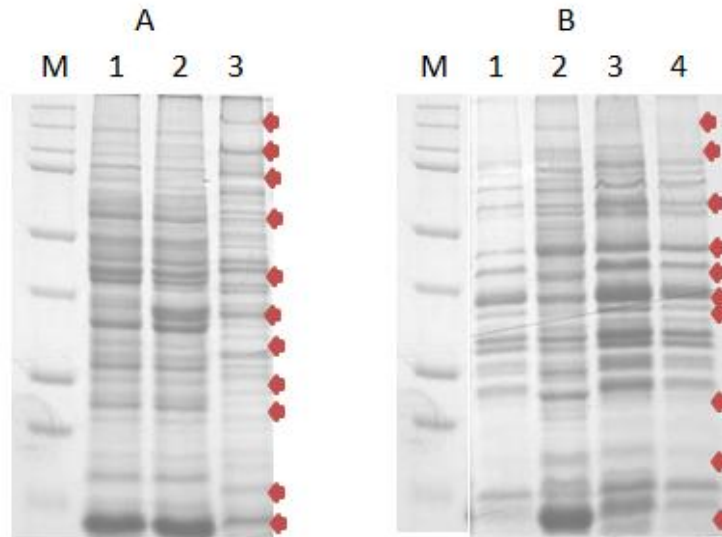


Figura 11. Patrón de proteínas de extractos totales de la cepa silvestre (12656-12, A) y de la mutante (12656-12 Ω luxS, B) en presencia o no (1) de D (2), Epi (3) o NE (4) a las 4 h de incubación . M: marcador de peso molecular. Las flechas muestran las bandas que presentan cambios.

El crecimiento del cepa silvestre y de la mutante, durante 6 h, en presencia o no de D, Epi y NE permite ver diferencias en bandas de proteína de aproximadamente 150,100, 75, 50, 37, 25 y 20 kD en la cepa silvestre (Fig. 12A), y de 100, 75, 50, 25 y 15 kD en la cepa mutante (Fig. 12B).

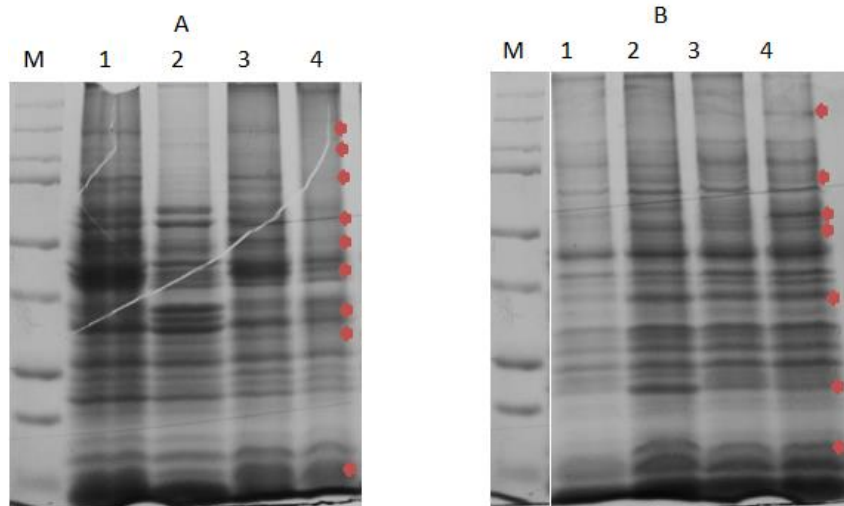


Figura 12 Patrón de proteínas de extractos totales de la cepa silvestre (12656-12, A) y de la mutante (12656-12 Ω luxS, B) en presencia o no (1) de D (2), Epi (3) o NE (4) a las 6 h de incubación. M: marcador de peso molecular. Las flechas muestran las bandas que cambiaron.

Con respecto a las proteínas de membrana insolubles en triton al 1% se presentaron diferencias en las bandas de aproximadamente 150, 100, 75, 50, 10 kD en la cepa silvestre (Fig. 13A), mientras que en la mutante se observaron diferencias en bandas aproximadamente de 60, 50, 37, 25,20 kD del mismo extracto (Fig. 13B).

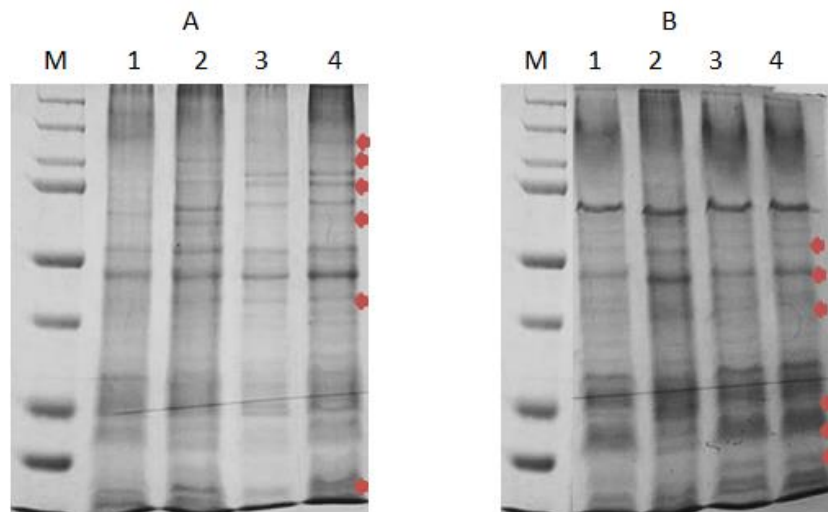


Figura 13. Patrón de proteínas de membrana insolubles en tritón 1% de la cepa silvestre (12656-12, A) y de la mutante (12656-12 Ω luxS, B) en presencia o no (1) de D (2), Epi (3) o NE (4). M: marcador de peso molecular. Las flechas muestran las bandas que presentan cambios en su concentración.

Inmunoreconocimiento

La expresión diferencial en el patrón de proteínas de la cepa silvestre y mutante crecidas en presencia o no de D, Epi y NE también puede ser visualizada mediante reconocimiento por el suero de aves infectadas de *G. anatis* de bandas aproximadamente de 75, 70 50 40 kDa en la cepa silvestre (Fig. 14A), y de aproximadamente de 70 55 50 25 kD en la cepa mutante (Fig. 14B)

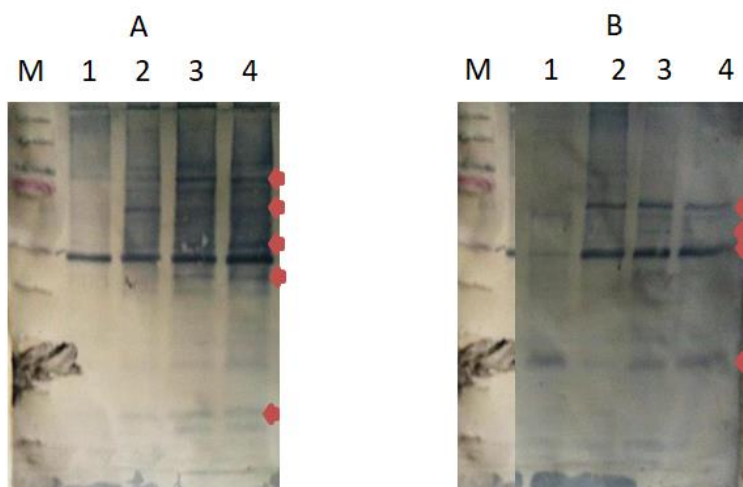


Figura 14 Western blot de proteínas de membrana insolubles en tritón de la cepa silvestre (12656-12, A) y de la mutante (12656-12 Ω luxS, B) en presencia o no (1) de D (2), Epi (3) o NE (4). M: marcador de peso molecular. Las flechas muestran las bandas reconocidas por el suero de aves enfermas por *G. anatis* y que presentan cambios por el efecto de las hormonas o D.

Cuantificación de la formación de biopelícula

Cuando se usaron las hormonas preparadas y congeladas se puede observar que hay una disminución en la producción de biopelícula en la cepa silvestre en todos los tratamientos (Fig. 15); un efecto similar también es observado en la cepa mutante (Fig. 16).

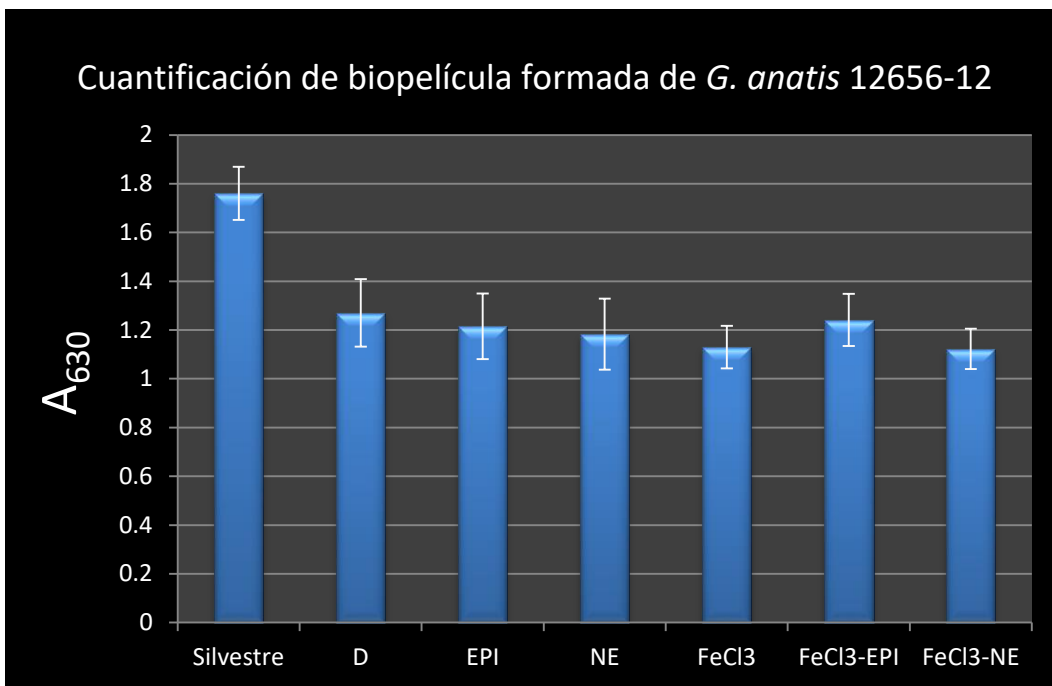


Figura 15 Cuantificación de la formación de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 con los diferentes suplementos (hormonas congeladas).

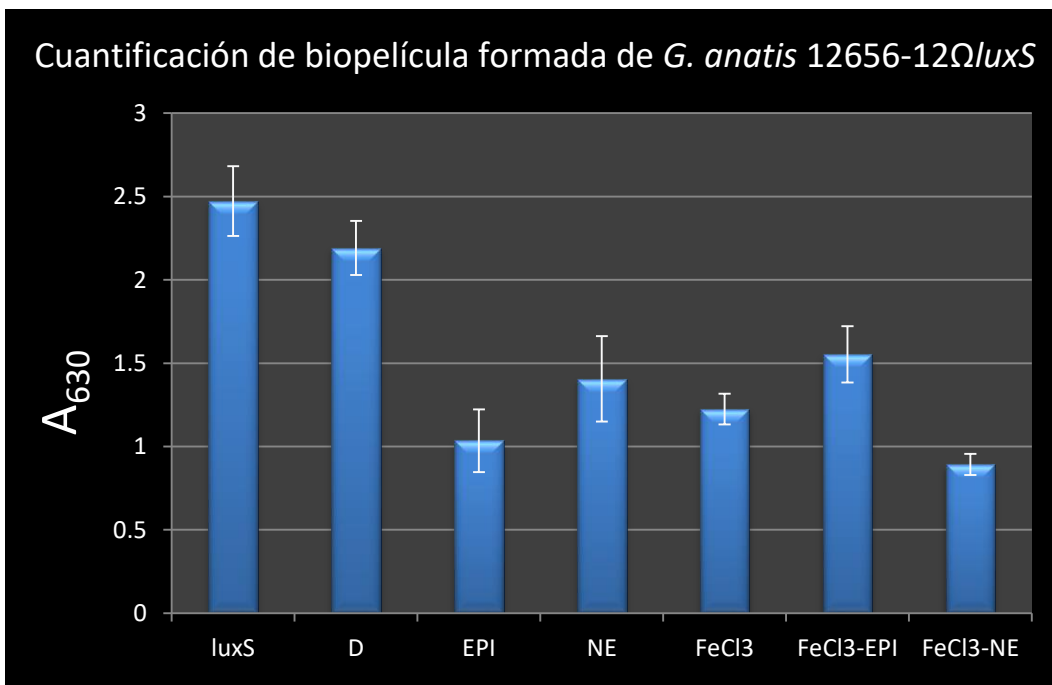


Figura 16 Cuantificación de la formación de biopelícula de *G. anatis* 12656-12*luxS* con los diferentes suplementos (hormonas congeladas).

Se aprecia tanto en la cepa silvestre (Fig. 17) como en la cepa mutante (Fig. 18) que la presencia de 2,2, dipiridil produce una menor cantidad de biopelícula, en comparación de sus respectivos cultivos sin suplementos. Este efecto se observa tanto con hormonas congeladas como con recién preparadas (Figs.19 y 20)

De acuerdo a la literatura, las biopelículas en presencia de Epi o Ne presentan una dispersión, y por consiguiente, una menor cantidad de la biopelícula al ser cuantificada. Por ello, se evaluó efecto de los diversos suplementos en la biopelículas formadas, usando tanto hormonas congeladas como recién preparadas.

Con las hormonas congeladas, no se observó variación en la cantidad de la biopelícula después de haber incubado la biopelícula por 30 min con los diferentes suplementos (Fig. 19). Tampoco se observaron cambios en la cantidad de la biopelícula formada por la cepa mutante (Fig. 20).

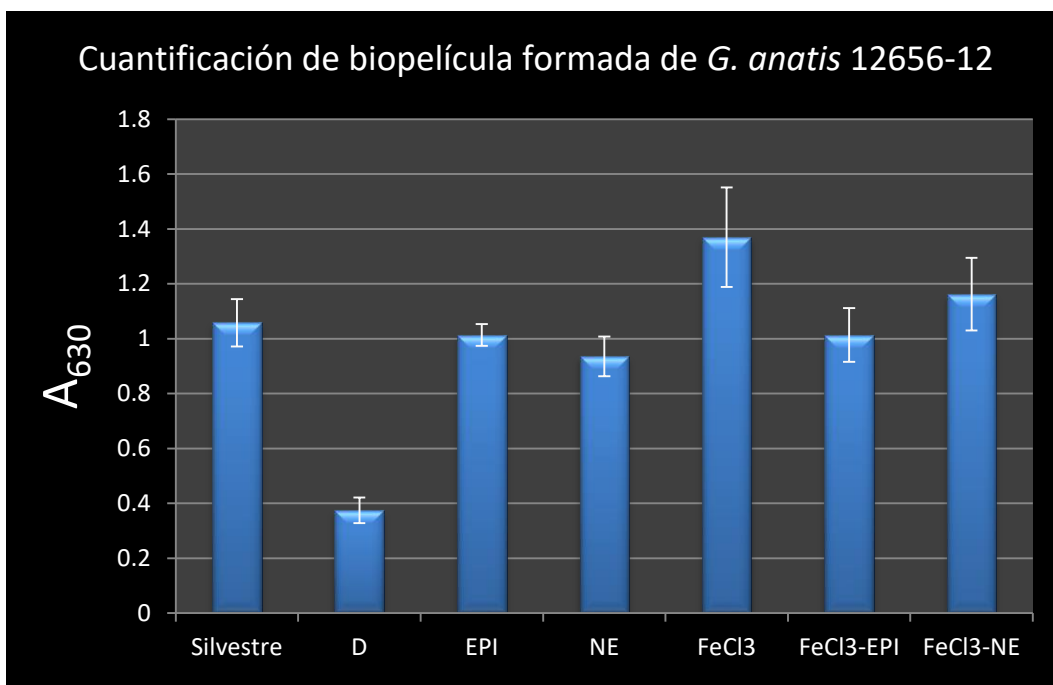


Figura 17. Efecto de los diferentes suplementos (hormonas congeladas) sobre la biopelícula formada por *G. anatis* 12656-12.

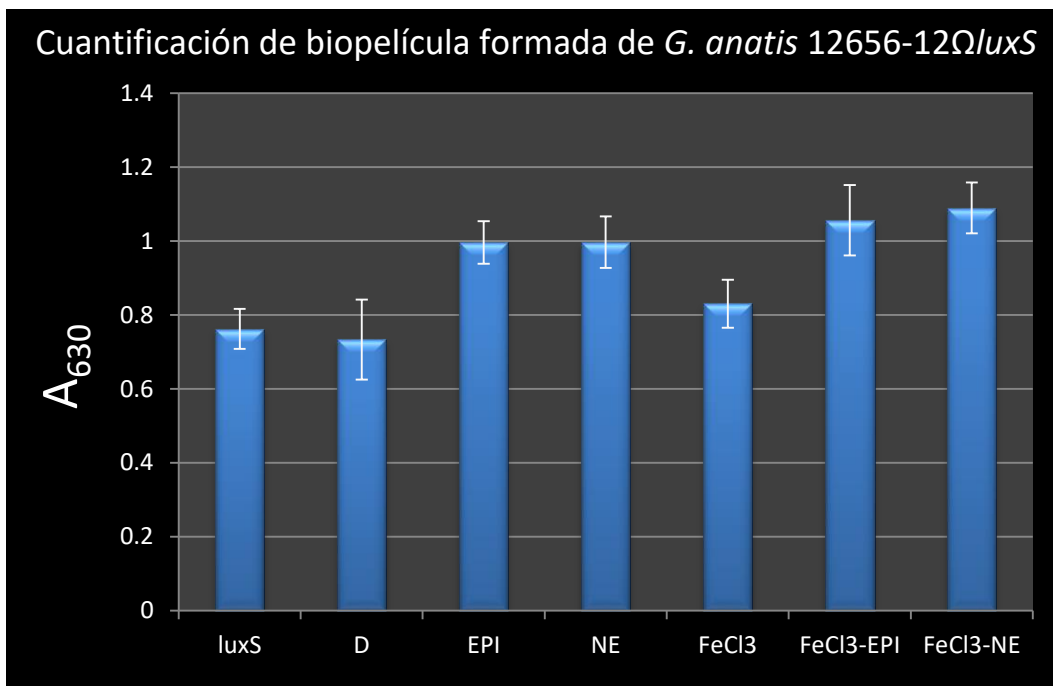


Figura 18. Efecto de los diferentes suplementos (hormonas congeladas) sobre la biopelícula formada por *G. anatis* 12656-12 Ω luxS

En la biopelícula formada por ambas cepas, se nota una disminución de la cantidad de biopelícula formada después de incubar con D. Lo que sugiere que los iones metálicos podrían ser importantes para la estructura de la misma (Fig. 18 y 19).

El uso de hormonas recién preparadas no indujo cambios significativos en la cantidad de la biopelícula formada por la cepa de *G. anatis* silvestre, excepto un ligero incremento de la misma en presencia de FeCl₃-Epi (Fig. 18). En el caso de la biopelícula formada por la cepa mutante, se observó un incremento de la misma cuando estas se incubaron con FeCl₃, FeCl₃-Epi y FeCl₃-NE (Fig. 19). El efecto del D, una disminución de la cantidad de biopelícula, fue también observada en este ensayo.

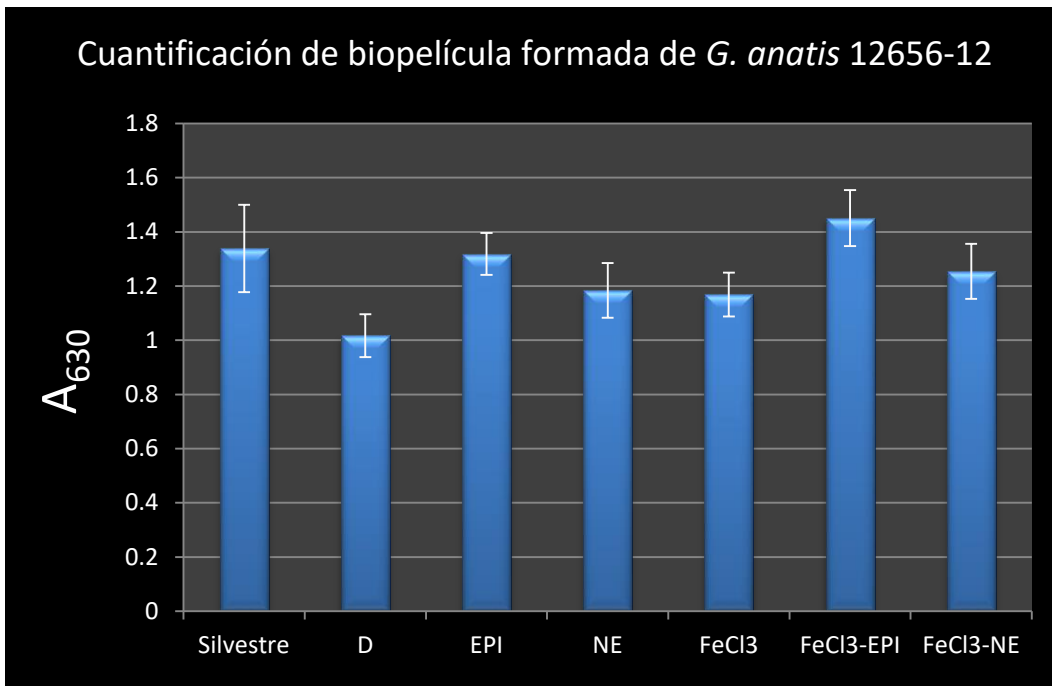


Figura 19. Cuantificación de la formación de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 con los diferentes suplementos (hormonas recién preparadas).

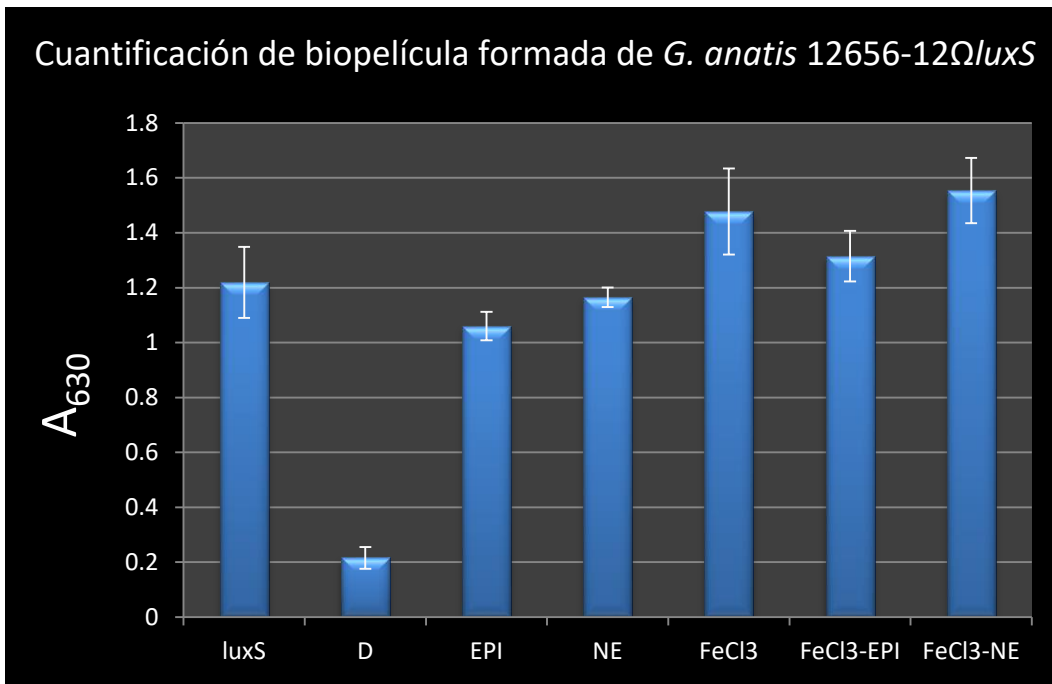


Figura 20. Cuantificación de la formación de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 Ω luxS con los diferentes tratamientos (hormonas recién preparadas).

El efecto de las hormonas recién preparadas en la biopelícula formada por la cepa silvestre y mutante de *G. anatis* no mostró cambios significativos en el caso de la cepa silvestre (Fig. 21) Con respecto a la cepa mutante se observó una menor cantidad de biopelícula cuando estas fueron incubadas con D, FeCl₃, FeCl₃-NE (Fig. 22). Esto sugiere un efecto dispersor de la biopelícula. Una menor cantidad de biopelícula también se observa en las muestras incubadas con 2,2, dipiridil, de manera similar a como se observó en los diferentes ensayos.

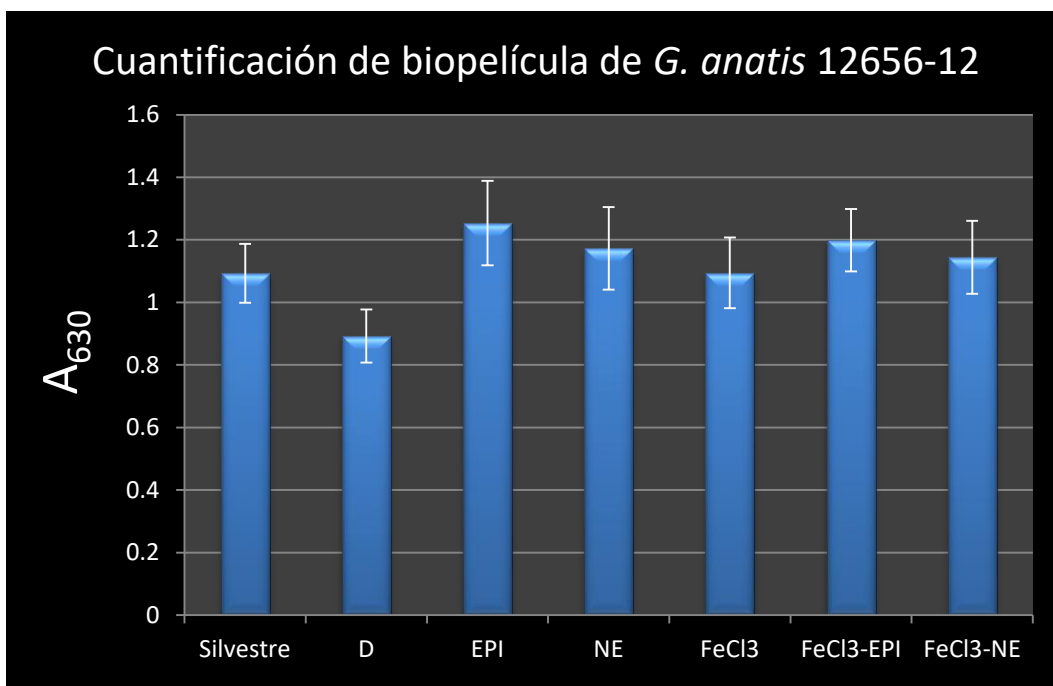


Figura 21 Efecto de los diferentes suplementos (hormonas recién preparadas) sobre la biopelícula formada por *G. anatis* 12656-12.

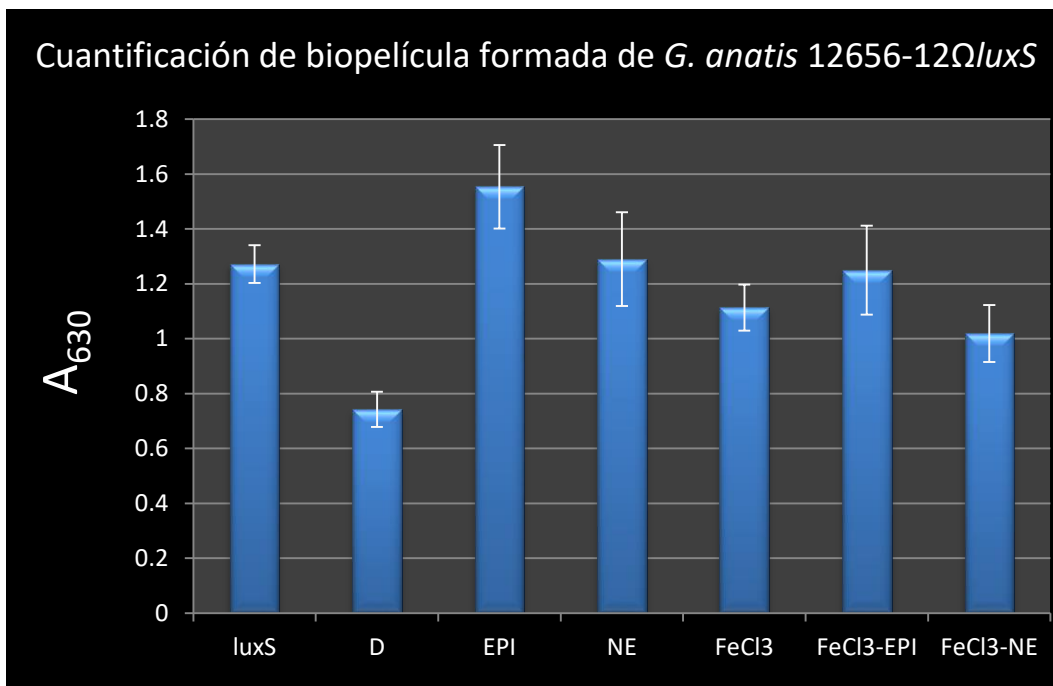


Figura 22 Efecto de los diferentes suplementos (hormonas recién preparadas) en la biopelícula formada por *G. anatis* 12656-12 Ω luxS.

Discusión

G. anatis es una bacteria Gram negativa considerada como parte de la microbiota normal del tracto respiratorio superior y tracto genital inferior de aves, la cual ha sido asociada a condiciones patológicas como salpingitis, peritonitis, septicemia, pericarditis, hepatitis, enteritis y lesiones del tracto respiratorio, por lo cual es considerada como patógena oportunista. Estas afecciones causan la disminución de la producción del huevo y daña el aparato reproductor de las gallinas ocasionando hemorragia, ruptura y deformación de los folículos ováricos. *G. anatis* esta clasificado en 24 biovares de los cuales 15 han sido descritos en México, hasta ahora no han sido descritos todos sus mecanismos de factores de virulencia regulados por QS (López, 2019).

El QS es un mecanismo de comunicación bacteriana dependiente de la densidad poblacional que contribuye a la patogenicidad; mediante este proceso se liberan y detectan moléculas químicas denominadas AIs, Se sabe que los patógenos Gram-negativos y Gram-positivos usan moléculas AIs para coordinar la expresión de genes cruciales para la virulencia y la supervivencia dependientes de las necesidades de la bacteria ya sea en condiciones normales o bajo estrés (Camilli y Bassler, 2006).

El estrés se puede definir como una respuesta biológica producida cuando un individuo percibe una amenaza a su homeóstasis o parámetros fisiológicos además, de perturbar el bienestar, afecta negativamente la rentabilidad. Esto genera que se altere la función biológica de manera que se producirá un desplazamiento de los recursos o actividades que ocurran antes de la actuación del estresor, lo que induce a la proliferación de microorganismos y a que estos expresen factores de virulencia (Odeón y Romera, 2017).

En *G. anatis* se han descrito diversos factores de virulencia como lo son la capacidad de aglutinar eritrocitos, producción de toxinas la (RTX GtxA), movilidad, capsula, adhesión, proteasas, biopelícula, VME de los cuales varios podrían ser regulados por QS (Martínez, 2013).

Tabla 5. Importancia del QS en la virulencia de miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

Microorganismo	Hospedero	Enfermedad	Gen mutante	Virulencia
<i>Mannheimia haemolítica</i>	Bovinos y ovinos	Fiebre de embarque, neumonía	<i>luxS</i>	Incrementada (invitro)
<i>Gallibacterium anatis</i>	Aves	Gallibacteriosis	<i>luxS</i> , <i>qseC</i>	ND
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Cerdos	Pleuroneumonía contagiosa porcina	<i>luxS</i> , <i>qseC</i>	Disminuida para ambas mitantes
<i>Agreggatibacter actinomycetencomitans</i>	Humanos	Enfermedades periodontales	<i>luxS</i> ,	Disminuida
<i>Haemophilus influenzae</i>	Humanos	Neumonía, meningitis	<i>luxS</i> , <i>qseC</i>	Disminuida
<i>Pasteurella multocida</i>	Bovino, aves, cerdos, humanos, conejos, ovinos, perros, gatos.	Diversas enfermedades dependiendo del hospedero: pasteurelosis, cólera aviar, rinitis atrofia, etc.	No	ND
<i>Avibacterim paragallinarum</i>	Aves	Coriza infecciosa	No	ND
<i>Haemophilus parasuis</i>	Cerdos	Enfermedad de Glesser	No	ND
<i>Histophilus somni</i>	Bovinos y ovinos	Enfermedades respiratorias, meningitis, enfermedades sistémicas.	No	ND
<i>Pasteurella</i>	Roedores,	Enfermedades	No	ND

<i>pneumotropica</i>	perros, gatos	respiratorias		
<i>Actinobacillus seminis</i>	Bovinos y ovinos	Afecciones del aparato reproductor	ND	ND

ND: no identificado (Montes-García *et al.*, 2018)

De acuerdo a la tabla 5 podríamos decir que la virulencia de *G. anatis*-mutante en *luxS* se ve afectada ligeramente ya que la falta de hierro no afecta tan drásticamente el crecimiento bacteriano de esta cepa (Figs. 6,8 y 10).

El hierro es un elemento esencial tanto para los eucariotas como para los procariotas porque está involucrado en muchos procesos metabólicos centrales, y un suministro suficiente de hierro es fundamental para la proliferación y el crecimiento celular. Los quelantes de hierro también pueden afectar la formación de biopelículas como ha sido descrito para *Staphylococci* crecido en presencia de un quelante de hierro: deferiprona (Coraça-Huber *et al.*, 2018) donde se reporta una disminución en la formación de biopelícula. Este resultado es similar a lo observado en el presente trabajo donde hay una disminución de la formación de biopelícula tanto de ~~en~~ la cepa silvestre como de la mutante (Figs. 16 a la 22).

La comparación de las curvas de crecimiento de la cepa silvestre de *G. anatis* y la mutante *luxS* en presencia o no de D, Epi o NE parecen presentar algunas diferencias aunque no significativas. La presencia de NE favorece un incremento del crecimiento más rápido con respecto al medio en ausencia de ésta. Un resultado similar fue observado por Martínez (2013) quien trabajó con dos cepas de *G. anatis*. También se observó que la cepa mutante crece a niveles más altos que la silvestre en presencia de D (Fig. 5 y 6).

LuxS es una enzima que participa en el metabolismo de metionina y es una enzima crucial en el paso final en el ciclo de los grupos metilo activados para catalizar S-ribosil - homocisteína a homocisteína y 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD). El AI-2 es un subproducto de esta reacción que se genera por un re-arreglo del DPD (Schauder, Bassler, 2001). Esta molécula participa en la señalización de diversas bacterias y es la molécula de comunicación común entre bacterias Gram positivas y negativas, por lo que es considerada como una señal en quorum sensing inter-especie. LuxS participa en la expresión de diversos factores de virulencia que incluyen: formación de biopelícula, producción de

toxinas, proteasas y hemolisinas; adherencia y movilidad entre otras, así como en el metabolismo del hierro, azufre y carbono (Li *et al.*, 2011).

La generación de una mutante de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en *luxS* muestra un incremento en la capacidad de formar biopelículas, una adhesión disminuida y baja virulencia, sin embargo, estos efectos no fueron atribuibles a la falta del AI-2, sugiriendo un efecto pleiotrópico (Li *et al.*, 2011). Esta conclusión fue obtenida ya que el co-cultivo de la cepa silvestre con la mutante no revierte los efectos observados. Se ha descrito que LuxS afecta el metabolismo del hierro en diferentes bacterias incluidas *A. pleuropneumoniae* y *Mannheimia haemolytica*. En *Porphyromonas gingivalis*, LuxS participa en la adquisición de hierro inorgánico y hemo a través de la regulación de diversos genes que participan en esta adquisición. En *A. pleuropneumoniae* se observa una expresión diferencial de diversos genes que participan en el metabolismo y/o captación de hierro. En *G. anatis* 12656-12 mutante en *luxS* podría estar ocurriendo algo similar, ya que esta cepa no es tan afectada en su crecimiento, en un medio restringido de hierro, a como lo es la cepa silvestre (Figs. 5 a la 10).

M. haemolytica forma una biopelícula robusta después de 72 h de incubación en una placa de cultivo de tejidos. *M. haemolytica* tarda al menos 36 h en formar biopelículas *in vitro*. La exposición de la biopelícula formada de *M. haemolytica* a NE, Epi y Sustancia P (SP), causa una disminución en la biomasa de biopelículas sugiriendo una dispersión de la misma. En general, Epi es el agente de dispersión más efectivo, seguido de NE; siendo SP el menos efectivo. Pillai y colaboradores (2018) confirmaron que el tratamiento de la biopelícula de *M. haemolytica* con NE, Epi y SP causa su dispersión. En el presente trabajo este efecto no fue observado. Sin embargo, se observa una menor cantidad de biopelícula cuando esta incubada con un agente quelante D, esto sugiere que los iones metálicos divalentes podrían ser importantes para la biopelícula formada por *G. anatis*.

Se ha descrito que los exopolisacáridos pueden asociarse con iones metálicos y cationes divalentes, generando una carga neutra o polianiónica, según el tipo de exopolisacárido con el que interactúen, lo que les permitirá interactuar con distintos antimicrobianos, y de esta forma pueden quedar atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias (Sarduy y González, 2016). Shen y colaboradores (2018) estudiaron las

biopelículas desarrolladas a partir de una fuente de agua potable con alta concentración de iones divalentes (“agua dura”), encontrando que éstas eran más rígidas en comparación con las biopelículas desarrolladas a partir de la fuente de agua potable con iones divalentes en baja concentración. La mayor rigidez de las biopelículas desarrolladas a partir del agua dura se atribuye al alto contenido de carbonato de calcio, sugerido por el examen de composición de biopelículas. Lo que concuerda con los resultados obtenidos en este experimento ya que al tener un quelante de metales en el medio hay una disminución de la biopelícula.

En *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC) se ha descrito que la ausencia de hierro induce la autoagregación y la formación de biopelícula, y cuando se suplementa el medio con FeCl_3 ocurre una dispersión de la misma (Rowe *et al.*, 2010). Este efecto podría estar mediado por la producción de celulosa, exopolisacárido descrito como un componente importante de diversas biopelículas; ya que el tratamiento con celulasa impide la agregación bacteriana y la formación de la biopelícula. La adición de hierro facilita la disgregación de la biopelícula, probablemente a través de la expresión de *novo* de diversos genes pues cuando se adiciona rifampicina, inhibidor de la síntesis de RNAm o cloranfenicol, inhibidor de la síntesis de proteínas, no ocurre esta dispersión. (Rowe *et al.*, 2010)

En el caso de *Staphylococcus epidermidis* se ha descrito que la quelación de hierro usando deferiprona (Def), un quelante de hierro de uso terapéutico, desestabiliza la biopelícula formada (Coraça-Huber., *et al* 2018), un resultado similar al observado en este trabajo con *G. anatis* y dipiridil. El uso de Def, induce una disminución de la formación de biopelícula así como mortalidad celular, la cual es evaluada con el uso Ioduro de propidio. El tratamiento de cultivos con Def impide la formación de biopelícula por *S. epidermidis* de manera masiva, y si este tratamiento se combina con antibióticos, se logra la disgregación de la biopelícula así como mortalidad bacteriana. Los autores sugieren que la alteración de la estructura de la biopelícula, al quelar el hierro, facilita la penetración de los antimicrobianos (Coraça-Huber *et al.*, 2018).

En *E. coli* se ha descrito que el uso de Def se asocia con un incremento de la permeabilidad de la membrana externa así como un incremento de radicales oxígeno intracelulares, lo cual

podría explicar la mortalidad celular (Ma *et al.*, 2015). Gokarn y Pal (2018) proponen que las afectaciones observadas podrían deberse a la inhibición o inactivación de enzimas que participan en funciones vitales.

Por consiguiente, de manera similar a como a sido descrito para *Staphylococci*, y en base a los resultados obtenidos durante la caracterización parcial de *G. anatis* mutante en *luxS*, podría ser útil el uso de agentes quelantes como medio para tratar de disminuir y/o eliminar las infecciones causadas por este microorganismo.

Conclusiones

- 1) Epi y NE no afectan el crecimiento de la cepa silvestre *G. anatis* 126565-12 y su cepa mutante *luxS*
- 2) Epi y NE no afectan la formación de biopelícula en *G. anatis*, ni inducen su dispersión.
- 3) FeCl₃ y su combinación con Epi o NE producen una disminución de la cantidad de biopelícula en la cepa mutante, sugiriendo una posible dispersión.
- 4) La cepa de *G. anatis* mutante en *luxS* es menos susceptible a la falta de hierro en comparación con la cepa silvestre.
- 5) En los patrones de proteína se observan diferencias en las bandas de proteínas de 150, 100, 50, 37, 25, 20, 15kD entre ambas cepas.
- 6) El dipiridil afecta la formación de biopelícula.

Perspectivas

- Determinar el efecto de la mutación de *luxS* en la virulencia/patogenicidad de *G. anatis*.
- Evaluar el posible potencial de agentes quelantes y antibióticos en el control de enfermedades causadas por *G. anatis*
- Determinar el efecto de los iones divalentes en la estructura de la biopelícula producida por *G. anatis*

Bibliografía

Anderson T. M., Armstrong K. S. 2008. Norepinephrine mediates acquisition of transferrin-iron in *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* 190(11):3940-3947

AVEC. Informe anual 2017. Association of poultry processors and poultry trade in the EU countries.

Bager R. J., Persson G., Nesta B., Soriani M., Serino L., Jeppsson M., Nielsen T. K., Bojesen A. M. 2013. Outer membrane vesicles reflect environmental cues in *Gallibacterium anatis*. *Vet. Microbiol.* 167(3-4):565-572

Bisgaard M., Korczak B. M., Busse H. J., Kuhnert P., Bojesen A. M., Christensen H. 2009. Classification of the taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard within *Gallibacterium* and description of *Gallibacterium melopsittaci* sp. nov., *Gallibacterium trehalosifermentans* sp. nov. and *Gallibacterium salpingitidis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59(4): 735-744

Blackall P., Nørskov-Lauritsen N. 2008. *Pasteurellaceae*-the view from the diagnostic laboratory. In: Kuhnert P. and Christensen H, eds. *Pausteurellaceae*. Biology, genomics and molecular aspects. Norfolk, UK: caister academic press. pp 227-259

Bojesen A. M., Torpadahl M., Chistensen H., Olsen J. E., Bisgaard M. 2003. Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* isolates from different chicken flocks. *J. Clin. Microbiol.* 41(6):2737-2740

Camilli A., Bassler B. L. 2006. Bacterial small-molecule signaling Pathways. *Science* 311(5764):1113:116

Cárdenas-Perea M. E., Cruz y L. O. R., Gándara-Ramírez J. L., Pérez-Hernández M. A. 2014. Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos* 94:35-43

Castillo G., Koga Y., Alvarado A., Tinoco R., Fernández D. 2014. Aislamiento e Identificación bioquímica de cepas de *Pasteurella multocida* y *Gallibacterium anatis* en aves de producción con signos respiratorios. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 25(4): 516-522

Christensen H., Bisgaard M. 2008. Taxonomy and biodiversity of members of Pasteurellaceae. In: Kuhnert P. and Christensen H, eds. *Pausteurellaceae*. Biology, genomics and molecular aspects. Norfolk, UK: caister academic press. pp 1-26

Christensen H., Bisgaard M., Bojesen A. M., Mutters R., Olsen J. E. 2003. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, '*Actinobacillus salpingitidis*' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53(1): 275-278

Coraçá-Huber D. C., Dichtl S., Steixner S., Nogler M., Weiss G. 2018 Iron chelation destabilizes bacterial biofilms and potentiates the antimicrobial activity of antibiotics against coagulase-negative *Staphylococci*. *Pathog. Dis.* 76(5):1-8

Dickschat J. S. 2010. Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat. Prod. Rep.* 27(3):343-369

FAO. 2019. El papel de la FAO en la producción animal.

Fredheim A. E. G., Klingenberg C., Rohde H., Frankenberger S., Gaustad P., Flægtad T., Sollid J. E. 2009. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J Clin Microbiol.* 47(4):1172-1180

García-Gómez. E., Vaca S., Pérez-Méndez A., Ibarra-Caballero J., Pérez- Márquez V., Tenorio V. R., Negrete-Abascal E. 2005. *Gallibacterium anatis*- secreted metalloproteases degrade chicken IgG. *Avian pathol.* 35(5):426-429

Gokarn K., Pal R. B. 2018. Activity of siderophores against drug-resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Infect. Drug Resist.* 11:61-75

Hider R. C., Kong X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27(5):637-657

Inzana T. J., Swords W. E., Sandal I., Siddaramappa S. 2008. Lipopolysaccharides, biofilms and quórum sensing in *Pasteurellaceae*. In: Kuhnert P. and Christensen H, eds. *Pausteurellaceae*. Biology, genomics and molecular aspects. Norfolk, UK: Caister Academic press. pp 177-195

- Kachlany S. C., Balashova N. V. 2008. Protein secretion in *Pasteurellaceae*. In: Kuhnert P. and Christensen H, eds. *Pausteurellaceae*. Biology, genomics and molecular aspects. Norfolk, UK: Caister Academic Press. pp 113-131
- Kendall M. M., Rasko A. D., Sperandio V. 2007. Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 75(10): 4875-4884.
- Kristensen B. M., Frees D., Bojesen A. M. 2010. GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organization. *Vet. Res.* 41(3):1-25
- Li L., Xu Z., Zhou Y., Li T., Sun L., Chen H., Zhou R. 2011. Analysis on *Actinobacillus pleuropneumoniae* LuxS regulated genes reveals pleiotropic roles of LuxS/AI-2 on biofilm formation, adhesion ability and iron metabolism. *Microb Pathog.* 50(6):293-302
- Lopez O. A. J. 2019. Identificación de algunas proteínas tipo amiloide en *Gallibacterium anatis*: el papel de la proteína EF-Tu. Tesis de Doctorado. BUAP
- Ma L., Gao Y., Maresso A. W. 2015. *Escherichia coli* free radical-based killing mechanism driven by a unique combination of iron restriction and certain antibiotics. *J Bacteriol.* 197:3708–19
- Martinez. G. K.K. 2013. Análisis de la expresión de factores de virulencia regulados por *Quorum sensing* en *Gallibacterium anatis*. Tesis de Maestría. FESI-UNAM.
- Montes-García J. F. 2012. Determinación de las condiciones de movilidad *in vitro* de *Gallibacterium anatis*. Tesis de licenciatura. FESI-UNAM.
- Montes-García J. F., Paniagua C. G. L., Uribe G. A., Vaca P. S., Vázquez C. C. y Negrete-Abascal E. 2018. Bacterias de la familia *Pasteurellaceae* como modelos de estudio de la biopelícula. Eds: Sánchez A. M. P. G., López R. L., Vázquez C. C., Negrete-Abascal E. En Modelos microbianos para la investigación básica y la biotecnología. Ed. FESI-UNAM, pp 1-16
- Montes-García J. F., Vaca S., Vázquez-Cruz C., Soriano-Vargas E., Aguilar-Romero F., Blackall P. J., Negrete-Abascal E. 2016. Identification of a hemagglutinin from *Gallibacterium anatis*. *Curr. Microbiol.* 72(4):450-456

Odeón M. M., Romera S. A. 2017. Estrés en ganado: causas y consecuencias. *Rev. Vet.* 28(1):69-77

Ohtani K., Hayashi H., Shimizu T. 2002. The *luxS* gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.* 44(1):171-179

Pasupuleti S., Sule N., Manson M. D., Jayaramana A. 2018. Conversion of norepinephrine to 3,4-dihydroxymandelic acid in *Escherichia coli* requires the QseBC quorum-sensing system and the FeaR transcription factor. *J. Bacteriol.* 200(1):1-9

Peñalosa-Castro I. 2010. La organización estructural del hierro y su función biológica. Eds: De la Garza A. M., Vaca P. S., La lucha por el hierro, patógenos vs. hospedero. Cinvestav pp10-44

Persson G., Bojesen A. M. 2015. Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry. *Vet Res.* 46(19):1-11

Pillai D. K., Cha E., Mosier D. 2018. Role of the stress-associated chemicals norepinephrine, epinephrine and substance P in dispersal of *Mannheimia haemolytica* from biofilms. *Vet. Microbiol.* 215(1):11-17

Pors E. S., Skejering R. B., Flachs E. M., Bojesen A. M. 2016. Recombinant proteins from *Gallibacterium anatis* induces partial protection against heterologous challenge in egg-laying hens. *Vet Res.* 47(36):1-8.

Rowe M. C., Whitters H. L., Swifts S. 2010. Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. *FEMS Microbiol Lett.* 307(1):102-109

SAGARPA. 2015. Pollos, gallinas y la avicultura en México.

Salgado L. M. L., Vaca S., Vázquez C., Zenteno E., Rea I., Pérez-Márquez V. M., Negrete-Abascal E. 2012. Adhesion of *Gallibacterium anatis* to chicken oropharyngeal epithelial cells and the identification of putative fimbriae. *Adv. Microbiol.* 2(4):205-510

Sarduy B. L., González D. M. E. 2016. La biopelícula: Una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicent Electrón.* 20(3):1-9

- Schauder S., Basslere B. L. 2001. The languages of bacteria. *Genes Dev.* 15(12):1468-1480
- Shen Y., Chieh H. P., Huang C., Sun P., Monroy G. L., Wu W, Lin J., Espinosa-Marzal R. M., Boppart S. A., Wen-Tso L., Nguyen T. H. 2018. Effect of divalent ions and a polyphosphate on composition, structure, and stiffness of simulated drinking water biofilms. *NPJ Biof. Microb.* 4(1):1-9
- Vaca S., Monroy E., Rojas L., Vázquez C., Sanchez P., Sariano-Vargas E., Bojensen A. M., Negrete-Abascal E. 2011. Adherence of *Gallibacterium anatis* to inert surfaces. *J Anim Vet Adv.* 10(13):1688-1693
- Vendeville A., Winser K., Heurlier. K., Tang C. M., Hardie K. R. 2005. Making “sense” of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Net Rev Microbiol.* 3(5):383-396
- Zepeda A., Ramírez S., Vega S., Morales V., Talavera M., Salgado-Miranda C., Simón-Martínez J., Bojesen A. M., Soriano-Vargas E. 2009. Hemagglutinating activity of *Gallibacterium* strains. *Avian Dis.* 53(1):115:118