



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

EFECTO DE EPINEFRINA Y NOREPINEFRINA
EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE

Actinobacillus seminis

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

PAMELA BAUTISTA BETANCOURT

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ERASMO NEGRETE ABASCAL

SINODALES

Dra. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

Dra. MARTHA OFELIA SALCEDO ÁLVAREZ

Dr. ERIC MONROY PÉREZ

Dra. ALINA URIBE GARCÍA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo de México. 2020





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.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 4-Genética
de la UMF de la FES Iztacala, UNAM con el apoyo de
DGAPA PAPITT IN219919

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mi familia sobre todo:

- ✿ A mi madre Marisol Betancourt Reyna quien siempre estuvo dispuesta a escucharme por más absurdo o trivial que fuera el asunto, siempre me mostro su apoyo de forma incondicional así como su amor y consuelo en cualquier situación.
- ✿ A mi padre José Luis Bautista López de quien me enseñó el valor de las responsabilidades, que siempre hay cosas nuevas que aprender y que hasta en los momentos que parecen difíciles siempre hay algo bello que admirar.
- ✿ A mis abuelitos Espiridión Betancourt y Catalina Reyna por toda su confianza, amor y apoyo.
- ✿ A mi hermano José Luis Bautista Betancourt, si bien a veces no llegamos a entendernos, valoro mucho las cosas que ha hecho por mí.



“No soy un hombre que sabe. He sido un hombre que busca y lo soy aún, pero no busco ya en las estrellas ni en los libros: comienzo a escuchar las enseñanzas que mi sangre murmura en mí...”

-Demian (Hermann Hesse).

AGRADECIMIENTOS

- 🌿 Al Dr. Erasmo por aceptarme como su alumna, por su tiempo y permitirme realizar mi tesis.
- 🌿 A la Dra. Alina Uribe de quien he aprendido mucho, por el apoyo que siempre me dio dentro y fuera del ámbito académico, por su paciencia, su comprensión.
- 🌿 Al Dr. Sergio Vaca (QEPD) por sus consejos, por la motivación.
- 🌿 A los doctores Gloria Luz Paniagua, Martha Ofelia Salcedo y Eric Monroy por su tiempo y apoyo en la realización de este trabajo.
- 🌿 Al M. en C. Fernando Montes por permitirme participar en algunas de sus actividades, por toda la ayuda prestada y por todos los conocimientos que obtuve gracias a usted.
- 🌿 A mi equipo en casi toda la carrera, Nayeli, Joaquín y Marcelino por su paciencia, apoyo incondicional, así como a José Antonio, Iván (Raz), Paco, Víctor, Omar (Barreto), Brenda, Brenda (Mishka) y Leonardo por los consejos, la ayuda y por hacer la estancia en la universidad divertida.
- 🌿 Al equipo Alfa-Dinamita de genética, mi Dianita, Francis, Omar, César, Iván (Goku), Isabel, Ángel (el hermano) y Edmundo así como a Carmen y Carlotta por todos los buenos momentos, por las risas, las comidas, las pláticas y la buena música.
- 🌿 A Sandy por sus consejos, por los dibujos y los momentos divertidos en el CCH.
- 🌿 Elizabeth Hernández por su amistad, por el cariño, por siempre estar a mi lado.
- 🌿 A mi perro Máximo Décimo Meridio.

Gracias a todos ustedes por brindarme un nuevo panorama...

“Look around, how lucky we are to be alive right now”

-HAMILTON (Lin-Manuel Miranda).



ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Sistema inmune y estrés.....	2
2.2. Catecolaminas.....	3
2.3. Comunicación celular	6
2.4. La infertilidad ovina y <i>Actinobacillus seminis</i>	8
2.5. Factores de virulencia	9
3. ANTECEDENTES	12
4. JUSTIFICACIÓN	13
5. HIPOTESIS	13
6. OBJETIVOS.....	13
6.1. Objetivo general	13
6.2. Objetivos particulares.....	13
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
7.1. Cepas bacterianas y mantenimiento de cultivo	14
7.2. Cinética de crecimiento.....	14
7.3. Obtención de proteínas totales y secretadas.	14
7.4. Electroforesis y zimogramas	14
7.5. Inmunoreconocimiento (Western blot y Far-Western Blot)	15
7.6. Formación de biopelícula.....	16
7.6.1. Dispersión de la biopelícula.....	16
8. RESULTADOS.....	17
8.1. Cinética de crecimiento.....	17
8.2. Perfil de proteínas	19
8.2.1. Medio TSB	19
8.2.2. Medio LB.....	21
8.3. Actividad proteolítica.....	25
8.4. Inmunoreconocimiento	27
8.5. Formación de biopelícula.....	32
9. DISCUSIÓN.....	34
10. CONCLUSIONES.....	39
11. PERSPECTIVAS	40
12. BIBLIOGRAFÍA.....	41

1. RESUMEN

Actinobacillus seminis es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia *Pasterurellaceae* y se puede encontrar en la microbiota transitoria de ovinos así como de caprinos; se relaciona *A. seminis* con pérdidas económicas y disminución en la tasa de fertilidad, hay poco conocimiento sobre sus posibles factores de virulencia. El quorum sensing es un mecanismo complejo, que diferentes microorganismos emplean con la finalidad de comunicarse entre sí, y les permite a través de la detección de moléculas señalizadoras, conocer o detectar diversas condiciones ambientales. Las encargadas de mediar este proceso son una serie de moléculas conocidas como autoinductores (AI), un ejemplo de estas es un compuesto aromático conocido como AI-3, el receptor que capta este autoinductor también puede interactuar con las catecolaminas. En este grupo de hormonas se encuentran la Dopamina (DA), la Epinefrina (E) y la Norepinefrina (NE) que cumplen con importantes funciones fisiológicas. Las catecolaminas afectan también la patogenicidad de diversas bacterias; es por ello, que los objetivos del presente trabajo fueron determinar el impacto NE y E en el crecimiento poblacional, la expresión de proteínas, la actividad proteolítica; así como en la formación de biopelículas en una cepa de colección (ATCC 15768) y dos aislados de campo (A4 y A8) de *A. seminis*. Los resultados preliminares señalan que ninguna de las cepas se vio afectada en su crecimiento, por la presencia de las hormonas, pero los patrones de proteínas mostraron ciertas diferencias generadas por las hormonas, las bandas de actividad proteolítica de alto peso molecular se observaron en zimogramas en las cepas de *A. seminis* crecidas en presencia de hormonas. En los ensayos de Western Blot y Far Western Blot se observaron diferencias en el reconocimiento producido por un suero de borrego con epididimitis. La presencia de hormonas afectó la formación de biopelículas e indujo la dispersión de las biopelículas formadas; la E provocó una disminución del 50% en la formación de la biopelícula de la cepa ATCC y un 40% en las cepas A4 y A8. El impacto de estas hormonas en la expresión genética bacteriana ha sido relacionado con un tipo de comunicación interreino, el cual puede estar también presente en *A. seminis*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Sistema inmune y estrés

Los organismos vivientes tienen mecanismos de adaptación fisiológica para poder responder a diversos estímulos para su supervivencia, estos pueden ser de muchos tipos, así como de una duración variable, cualquier estímulo que se perciba como una amenaza para el equilibrio homeostático se le conoce como estrés. Entre los principales factores estresores que afectan la producción de animales se encuentran los ambientales, la alimentación, el espacio, su manejo, enfermedades y algún daño físico (Odeón y Romera 2017).

El estrés tiene la capacidad de activar múltiples efectos relacionados con respuestas conductuales y fisiológicas de tal manera que el organismo pueda responder al estímulo estresor. Estas estrategias por las cuales el organismo reacciona ante una posible amenaza se dividen en tres etapas: en la primera el hipotálamo estimula las glándulas suprarrenales que a su vez secretan adrenalina, la cual provee de energía de emergencia. Esta hormona desencadena una serie de reacciones tales como un aumento en la frecuencia cardíaca, vasodilatación y un estado de alerta. La segunda etapa, también llamada fase de resistencia, consiste en la liberación del cortisol por parte de las glándulas suprarrenales, la función de dicha hormona ayuda a mantener de manera constante los niveles de glucosa para irrigar de energía a órganos como el cerebro, el corazón y los músculos. La última fase es también conocida como etapa de decaimiento, debido a que surge una alteración por deficiencias en la secreción de hormonas así como en la acumulación de estas en el torrente sanguíneo, lo que podría tener efectos negativos. Periodos prolongados de esta condición puede tener un efecto contraproducente en la respuesta inmune tanto humoral como celular (Duval *et al.*, 2010; Padgett y Glaser, 2003).

Existe una regulación recíproca entre el sistema nervioso y el sistema inmune, debido a que hay una comunicación entre ambos, el sistema inmune lo hace mediante polipéptidos producidos por las células y el sistema nervioso lo hace por vía hormonal y neuronal. La principal vía hormonal es el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) a través de las hormonas de la respuesta neuroendocrina del estrés (Sánchez *et al.*, 2007). Se han realizado estudios del efecto del estrés en la respuesta inmune, demostrando que las hormonas relacionadas con el eje simpático-adrenal, es decir catecolaminas y glucocorticoides, tienen

acciones inmunosupresoras así como un aumento en la producción de estos dos grupos de hormonas en casos de estrés crónico (Figura 1) (López-Calderón, 2005; Escrivá *et al.*, 2002). Un ejemplo del efecto de este proceso consiste en la supresión de la respuesta inmune de los linfocitos así como en su proliferación, esto se debe a que los linfocitos poseen receptores para diversas hormonas, entre ellas las catecolaminas y los glucocorticoides. Otros efectos podrían ser la supresión de la respuesta a mitógenos por parte de las células T, la actividad de las células Natural killer (NK), la producción de interleucina 2 e Interferón y la expresión del receptor de IL-2 (Sepúlveda y Puente, 2000).

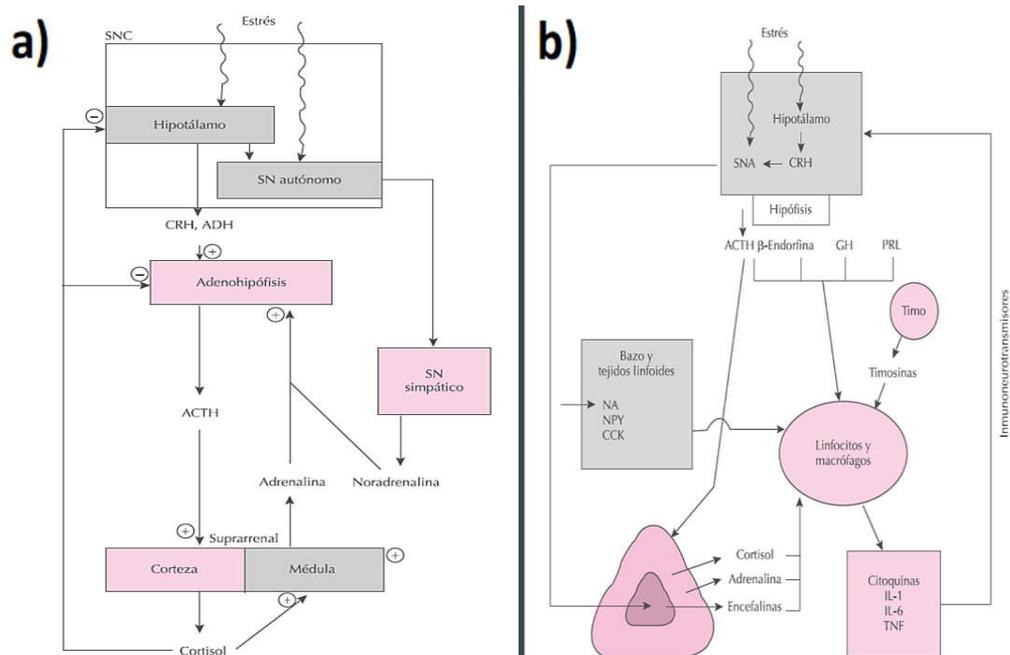


Figura 1. a) Interacción entre el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, b) Comunicación bidireccional entre los sistemas neuroendocrino e inmunitario (Modificado de López-Calderon, 2005).

2.2. Catecolaminas

Las hormonas son mensajeros químicos que se sintetizan por una célula o un conjunto de estas, que a su vez generan efectos fisiológicos sobre otras células del organismo. La acción ejercida por estas sustancias tiene el objetivo de dar una respuesta a señales bioquímicas generadas por algún tejido. El tipo de señalización, así como la composición química del mensajero se puede clasificar en diversos grupos, por una parte el tipo de señalización depende de la distancia que el mensajero recorre, siendo endocrina aquella que actúa sobre células lejanas, paracrina para cuyas células dianas son aledañas a la emisora y autocrina en donde el mensajero es producido y recibido por la misma célula (Nelson y Cox, 2009).

A la par de las hormonas, su composición química es amplia, por ejemplo, hormonas peptídicas como la insulina, derivados del colesterol como el estradiol y derivados de la tirosina tal como las catecolaminas. Las catecolaminas son un grupo de hormonas constituidas por una cadena lateral con un grupo amino y un grupo catecol (ortodihidroxibenceno), este grupo a su vez es un anillo bencénico con dos sustituyentes hidroxilo en su molécula (Weil, 2013).

Las catecolaminas de importancia por su función fisiología son la Dopamina (DA), la Epinefrina (E) y la Norepinefrina (NE), la síntesis de estas hormonas tienen como precursor a la tirosina, la que es hidroxilada a L-dihidroxifenilalanina (DOPA) por una enzima llamada tirosina hidroxilasa, posteriormente la L-aminoácidos-aromáticos descarboxilasa actúa sobre DOPA para formar dopamina, por último la enzima dopamina β-hidroxilasa y la feniletano lamina-N-metiltransferasa catalizan la conversión a NE y E, respectivamente (Figura 2) (Taira *et al.*, 2013).

La adrenalina o epinefrina es sintetizada y almacenada en la médula suprarrenal para ser liberada hacia el sistema circulatorio. La noradrenalina o norepinefrina y la dopamina son sintetizadas no solamente en la médula suprarrenal sino también en los nervios simpáticos periféricos (Brandan *et al.*, 2010). En animales como los ovinos, el almacenamiento de epinefrina se encuentra en la periferia de la médula suprarrenal y están asociados a un complejo de senos venosos de la corteza adyacente (Blaschko *et al.*, 1972).

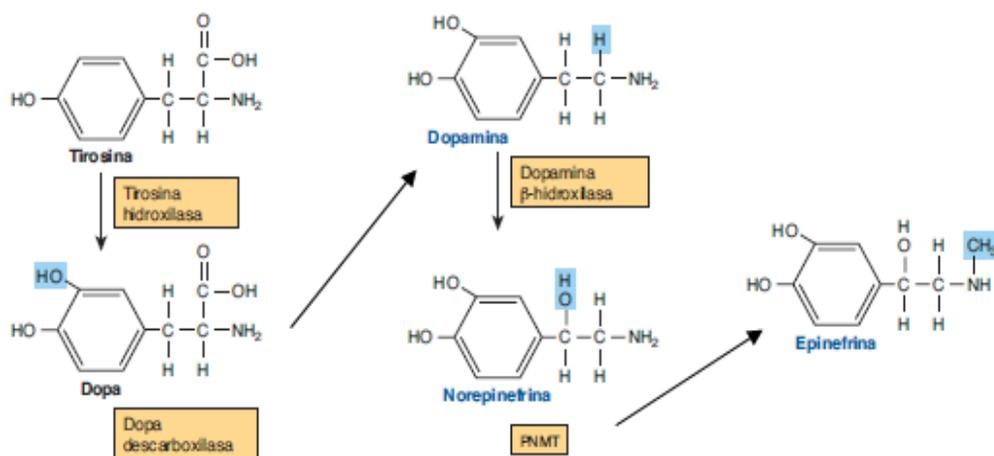


Figura 2. Biosíntesis de catecolaminas (Modificado de Murray *et al.*, 2013).

La comunicación entre bacterias es vital para el entendimiento del entorno y la supervivencia de los organismos, sin embargo este proceso no se ve limitado por el reino, actualmente se sabe que la señalización puede ocurrir entre bacterias y sus hospederos eucarióticos, esta comunicación se puede dar por reconocimiento de señales bacterianas por parte del hospedero y por la recepción de señales producidas por el huésped, en este caso, las hormonas tienen un papel importante debido a que los sensores bacterianos son capaces de percibir estas señales y producir un cambio en la expresión genética de los microorganismos (Pierson *et al.*, 2009).

El efecto de estas hormonas en las bacterias es muy variado, en algunos casos pueden actuar como sideróforos, así como modificar la expresión de proteínas de la superficie externa y la actividad citotóxica, a su vez, se ha observado que estas pueden generar cambios en la expresión génica, adquisición de hierro y la formación de biopelículas (Figura 3). Diversos autores han señalado que epinefrina y norepinefrina mejoran el crecimiento de bacterias Gram negativas tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, diversas especies de *Salmonella* y bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* (Boyanova, 2017).



Figura 3. Posibles efectos de la E y la NE en bacterias anaerobias (Modificado de Boyanova, 2017).

2.3. Comunicación celular

El quórum sensing es un mecanismo por el cual diversos organismos como las bacterias son capaces de informarse sobre las condiciones ambientales y disponibilidad de nutrientes a través de la producción y detección de moléculas señalizadoras. La “comunicación” se encuentra mediada por una serie de moléculas llamadas autoinductores que cumplen con ciertas características tales como: la producción de estas moléculas ocurre en una etapa específica del crecimiento, los autoinductores pueden ser percibidos por el resto de la población y la acumulación de los mismos genera una respuesta en las bacterias. La percepción de los autoinductores produce cambios en la expresión de diversos genes, induciendo así una respuesta que les permite responder a los cambios ambientales detectados (Figura 4) (Martínez-Antonio y Soberón-Chávez, 2002, March y Eiros, 2013).

En el propio mecanismo del quorum sensing existen diversas formas por las cuales las bacterias se comunican, estas formas se agrupan con base en el número de autoinductores participantes, en donde encontramos los sistemas cooperativos, que a su vez se subdividen en los circuitos en paralelo, donde las moléculas autoinductoras se producen de forma simultánea, y los circuitos en serie, donde las síntesis de los autoinductores es de forma secuencial. Por otro lado, existen los sistemas competitivos, es decir, las moléculas mensajeras tienen efectos negativos o antagónicos sobre la regulación propia del sistema. (Marquina y Santos, 2010).

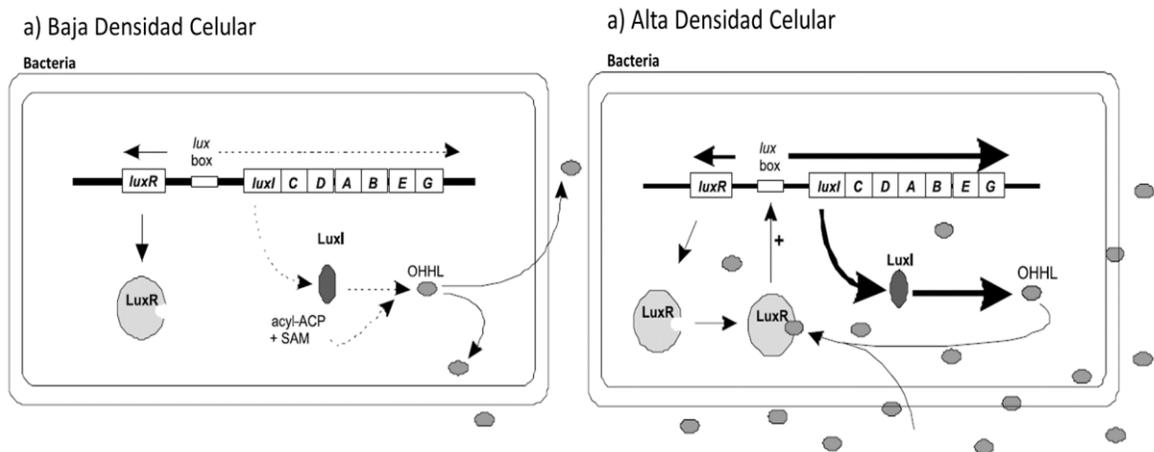


Figura 4. La regulación de la bioluminiscencia en *Vibrio fischeri* (Modificado de Whitehead *et al.*, 2001).

La composición química de los mensajeros es muy variada; en las bacterias Gram positivas la comunicación es mediada por oligopéptidos muy específicos, estos se sintetizan dentro de las células como pro-AIP (Péptidos Autoinductores), los cuales son modificados dentro o fuera de la misma y requieren proteínas para su transporte. En bacterias Gram negativas se han descrito tres diversas moléculas: el autoinductor de tipo 1 (AI-1) que es acil homoserina lactonas, el cual tiene un anillo conservado de homoserina lactona conectado a través de un enlace amida a una cadena de acilo variable que puede ser de cadena corta, y se difunde a través de membranas; así como de cadena larga, que se transporta activamente. El AI-2 es un diéster de borato de furanosilo que tiene como precursor a 4,5 - dihidroxi - 2,3 - pentanodiona (DPD) y se encuentra involucrado en la señalización entre especies y géneros (Miller y Bassler, 2001; Whitehead *et al.*, 2001; Vadakkan *et al.*, 2018).

Por último, AI-3 es un compuesto aromático que no contiene un esqueleto de azúcar como el AI-2 sintetizado por el gen *luxS*, el cual también se encarga de sintetizar el AI-2. Diversos autores han reportado que AI-3 tiene la capacidad de generar comunicación interdominios, ya que ciertas hormonas producidas por mamíferos inducen una señalización cruzada con este autoinductor. Diversas especies de bacterias poseen histidina quinasa de membrana QseC y QseE como sensores del AI-3, a su vez se ha señalado que estos sensores pueden detectar e interactuar con las catecolaminas (E y NE) producidas por el hospedero (Kendall y Sperandio, 2016; Walters *et al.*, 2006; Walters y Sperandio, 2006, Clarke *et al.*, 2006).

El quorum sensing permite a diversos microorganismos una interacción con organismos superiores en procesos simbióticos o patogénicos. La patogenicidad de un organismo es considerada como un mecanismo de adaptación debido a que le permite la supervivencia y el desarrollo en un nuevo nicho (Gospodareke *et al.*, 2009; Kendall y Sperandio, 2016). Los atributos del hospedero como factores inmunológicos, genéticos, fisiológicos, edad, entre otros, pueden desencadenar en los patógenos la expresión de numerosos factores de virulencia que les permita adecuarse al medio. Es por ello que este mecanismo se encuentra relacionado con adquisición de nutrientes, producción de los factores de virulencia, colonización, producción y resistencia a antibióticos, motilidad, esporulación, formación de biofilm, entre otros. (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

2.4. La infertilidad ovina y *Actinobacillus seminis*

La infertilidad ovina es causada por múltiples factores, en los que se encuentran, una alimentación de baja calidad, cambios de la temperatura y/o enfermedades tales como orquitis, hipoplasia, criptorquidia, hernia, varicocele, así como epididimitis (Craig, 1964). La epididimitis es una inflamación aguda o crónica en el conducto que está adherido a la cara posterior lateral del testículo, en esta enfermedad se pueden observar cambios en la temperatura base del testículo, la abundancia de tejido fibroso, la presencia de granulomas espermáticos, así como atrofia testicular. En la epididimitis encontramos lesiones en la cola del epidídimo que se asocian con espermatoceles. Debido a que este órgano es un conducto enrollado, cualquier lesión a lo largo de su longitud genera la obstrucción del flujo y afecta la formación de espermatozoides (Foster 2017).

La epididimitis ovina tiene como causa principal la infección por diversos organismos patógenos tales como *Brucella ovis*, *B. melitensis*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus spp.*, *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, *Chlamydia abortus* y *Actinobacillus seminis*. *A. seminis* es miembro de la familia *Pasteurellaceae*, la cual está constituida por diversos géneros incluido *Actinobacillus spp.*, esta bacteria se caracteriza por bastones pleomórficos incapaces de crecer en agar MacConkey, produce β -galactosidasa y fermenta carbohidratos sin producción de gas (Figura 5). Las colonias al crecer en agar sangre son pequeñas, redondas, bajas, convexas, exhiben una coloración gris blanquecina, así como una textura pegajosa, crece en ambientes aeróbicos y microaerófilos. Se ha descrito que este organismo es sensible a la penicilina, estreptomycin, cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, sulfonamidas así como a la albamicina pero presenta resistencia a la bacitracina y a la neomicina (Sneath y Stevens, 1990; Hajtós *et al.*, 1987).

Uno de los primeros aislamientos fue realizado por Baynes y Simmons en Australia en el año 1960, estos investigadores reportaron que esta bacteria se encontraba en el semen de carneros, posteriormente este microorganismo fue reportado en diferentes países tales como: Estados Unidos, Sudáfrica, Hungría, Kenia, Reino Unido, España, Turquía y México (Rycroft y Garside; 2000). *A. seminis* se puede encontrar temporalmente en las cavidades prepuciales y como parte de la flora transitoria de la vagina, se ha aislado en carneros que están en el período prepuberal. Estas bacterias actúan como patógenos oportunistas por infección

durante la pubertad, debido a que hay elevados niveles de hormonas liberadoras de gonadotropina (GnRH) (Foster, 2015).

Catalasa	+	Hidrólisis de la esculina	+ (-8)
Oxidasa	+	Satelitismo (<i>S. aureus</i>)	-
O/F	Fermentativa	Ribitol	-
Indol	-	Arabinosa	+
Ureasa	-	Dulcitol	-
Nitrato	+	Fructosa	+ (-1)
H₂S (TSI)	-	Galactosa	+ (-5)
H₂S (Acetato de plomo)	+	Glucosa	+
Rojo de Metilo	-	Inulina	-
Voges-Poskauser	-	Lactosa	-
Ornitina descarboxilasa	+	Maltosa	+ (-1)
Lisina descarboxilasa	-	Manitol	+ (-8)
Arginina dihidrolasa	-	Manosa	-
Fenilalanina desaminasa	-	Rafinosa	-
Triptófano daminasa	-	Sorbitol	- (+6)
Fosfatasa	-	Sacarosa	-
Beta-galactosidasa (ONGP)	-	Trehalosa	-
Citrato	-	Xilosa	+

Figura 5. Características bioquímicas de *Actinobacillus seminis* (Modificado de Hajtós *et al.*, 1987).

2.5. Factores de virulencia

Las condiciones ambientales se encuentran en constante cambio, es por ello que los organismos deben ser capaces de adecuarse a las mismas; las bacterias son un buen ejemplo de esta adaptación, ya que los sistemas que poseen les permiten responder a estos cambios de su entorno lo que favorece su supervivencia. Si bien las bacterias ejercen múltiples funciones en un entorno y participan en diversos procesos bioquímicos tales como la fijación de nitrógeno, ciclo del carbono, fosforo, y azufre, también son conocidas por ser patógenas. Un patógeno es un microbio con la capacidad de generar daño a su hospedante, ya sea por acción directa sobre el huésped o por la respuesta inmune del hospedante (Casadevall y Pirofski, 1999).

Los factores de virulencia son estrategias por las cuales un huésped puede prevalecer, replicarse y proliferar dentro de un hospedero (Cross, 2008). Estas estrategias se clasifican en tempranas y tardías; los factores de virulencia tempranos están asociados al movimiento, fijación y colonización; mientras que los tardíos se relacionan con la supervivencia intracelular y la evasión del sistema inmune (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

Aunque existe poco conocimiento acerca de los factores de virulencia expresados por *A. seminis*, Núñez del arco y colaboradores en el 2006 identificaron una proteína con una masa molecular de 75 kDa en el sobrenadante de cultivo que resulto ser específica para este organismo, los autores señalan que esta podría ser usada por el microorganismo para causar daño tisular. Después, Jiménez-Pacheco y colaboradores en 2008 observaron la presencia de 5 bandas de actividad proteolítica de 79.5, 59, 40, 27, 13.5 kDa en microvesículas obtenidas del sobrenadante (Figura 6).

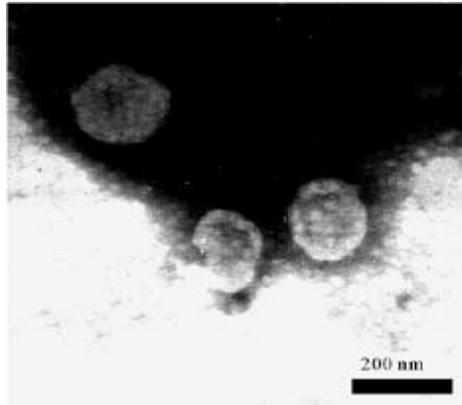


Figura 6. Microvesículas de *Actinobacillus seminis* en microscopia electrónica de transmisión (Jiménez-Pacheco *et al.*, 2008).

Posteriormente De la Cruz, en el 2015, caracterizó una metaloproteasa secretada que puede degradar IgG y fibrinógeno de ovino. En el 2018 Montes-García y colaboradores identificaron dos proteínas con pesos moleculares de 25 y 40 kDa, las cuales se identificaron por medio de espectrofotometría de masas como una fosfoglicerato mutasa y un factor de elongación termoinestable (EF-Tu) con función de adhesinas. A su vez Reyes en el 2018 sometió a esta bacteria a un estrés férrico con lo cual identificó 3 proteínas de 75, 50 y 25 kDa las cuales están relacionadas en la síntesis de sideróforos y otras funciones como el aprovechamiento del hierro. Por ultimo Montes-García y colaboradores en el 2019 identificaron y purificaron una proteína de 63 kDa la cual fue identificada como hemaglutinina por ensayos de aglutinación de eritrocitos de conejo e caracterizada como homologa a GroEL por espectrometría de masas, a su vez los autores señalaron que esta proteína podría ser una subunidad de una proteína de 150 kDa.

Se ha demostrado que *A. seminis* tiene la capacidad de formar biopelícula o biofilm (Montes García *et al.*, 2020), el cual se define como comunidades de bacterias que crecen embebidas

en una matriz y adheridas a una superficie inerte o un tejido vivo. Estas estructuras están compuestas por una matriz extracelular con gran cantidad de agua, espacios intracelulares, una masa microbiana, productos de la lisis bacteriana, así como cristales de sal y sedimentos, entre otros, todo esto dependiendo del sustrato en el que se haya fijado. Estos consorcios confieren múltiples ventajas a sus habitantes como la protección contra agentes adversos, evita la deshidratación, incrementa la disponibilidad de nutrientes y facilita la transferencia de material genético.

La formación de una biopelícula comienza cuando las bacterias planctónicas identifican una estructura o sustrato, las bacterias comienzan la fijación mediante uniones por medio de filamentos u apéndices tales como fimbrias o pili, una vez adheridas a una superficie, da inicio la fase de crecimiento, en la cual las células bacterianas se dividen y se propagan alrededor del sustrato, a la par que secretan su matriz que las recubre y la cual adquiere una forma similar a los cuerpos fructíferos de las setas. Finalmente, las células se liberan para colonizar nuevas superficies ya sea de forma individual o en conglomerados, esta liberación puede ocurrir por dos vías; la primera consiste en algún daño físico que genere el desprendimiento de partes de la biopelícula, y la segunda, es la dispersión del propio biofilm mediante una serie de señalizaciones por la cual se generan diferentes procesos para degradar la matriz y se diseminan las bacterias (Figura 7) (Petrova y Sauer, 2016; Nazar 2007; Lasa *et al.*, 2005).

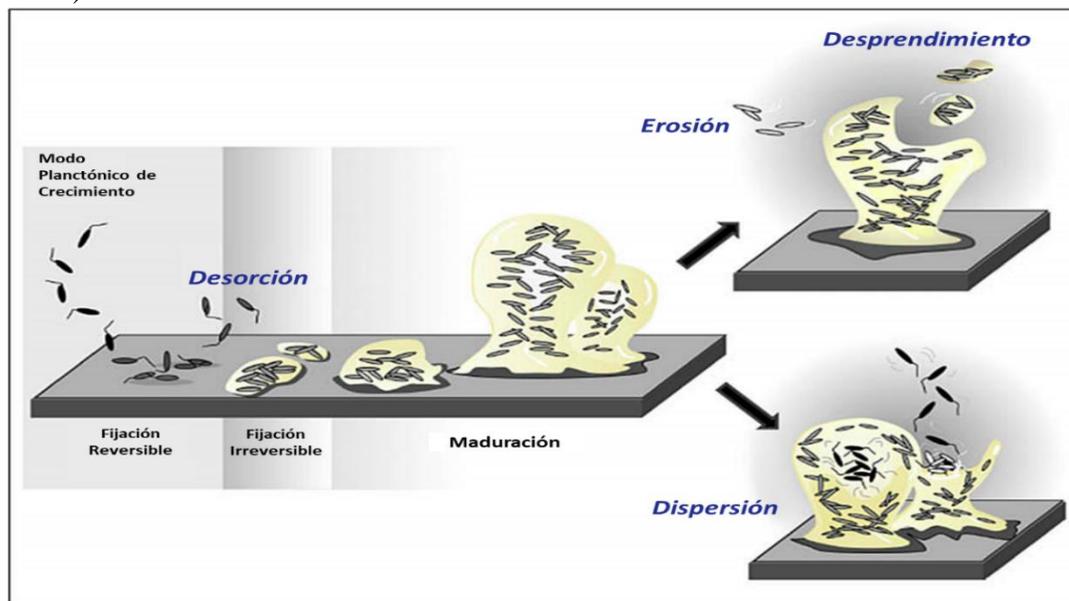


Figura 7. Modelo de las fases de formación de una biopelícula (Modificado de Petrova y Sauer, 2016).

3. ANTECEDENTES

Belay y Sonnenfeld en el 2002, realizaron un estudio del efecto de diversas catecolaminas sobre el crecimiento de patógenos bacterianos de los cuales tres eran Gram-negativos y uno Gram positivo. Los resultados obtenidos demostraron que la NE, E, dopamina e isoproterenol favorecieron el crecimiento de las bacterias, siendo más evidente este efecto en organismos Gram negativos.

Bansal y colaboradores en el 2007 analizaron el efecto de E, NE e índol sobre la quimiotaxis, colonización y expresión génica de *Escherichia coli*, encontrando que la E y la NE aumentan la adherencia a células epiteliales mientras que el índol la disminuye. A su vez, la E y la NE aumentan la formación de biofilm.

Li y colaboradores en el 2012 analizaron el efecto de NE y E sobre la producción de biofilm y la producción de sustancias citotóxicas en *A. pleuropneumoniae*. La actividad citotóxica fue potenciada por E, pero la producción de biofilm no se vio afectada por ninguna de las dos hormonas; a su vez, los autores sugieren que *A. pleuropneumoniae* puede tener múltiples sistemas de respuesta para las dos catecolaminas.

Martínez-González en el 2013 probó el efecto de NE y E sobre el crecimiento, la formación de biopelícula y la expresión de patrones en proteínas de membrana externa (OMPs) en dos cepas de *Gallibacterium anatis* (12656/12 y F149^T). La autora señala que la NE fue la que generó más cambios en las cepas, cabe señalar que el efecto de esta hormona fue distinto en las dos cepas debido a que en la cepa 12656/12 incremento su densidad poblacional mientras que en la F149^T la disminuyo. También se encontró que ambas hormonas favorecieron la formación de biofilm en ambas cepas, aunque la E fue la que tuvo mayor efecto.

Graziano y colaboradores en el 2013 evaluaron los efectos de la E y la NE sobre el crecimiento, la susceptibilidad antimicrobiana y la expresión génica en *Porphyromonas gingivalis*. Se demostró una estimulación en la expresión de genes relacionados con la adquisición de hierro, el estrés oxidativo y la patogénesis por exposición a E y NE.

Pillai y colaboradores en el 2018 probaron el efecto de la E, la NE y la sustancia P sobre la formación de biopelícula en *Mannheimia haemolytica* demostrando que las hormonas y el neurotransmisor disminuyeron la producción de la biopelícula con respecto al control, siendo la E quien tuvo un mayor efecto.

4. JUSTIFICACIÓN

La epinefrina y norepinefrina son expresadas por diversos hospedadores como consecuencia del estrés. Estas hormonas pueden favorecer el crecimiento y la expresión genética de diversos microorganismos.

Existe poco conocimiento de los factores de virulencia producidos por *A. seminis*; la adición E o NE a cultivos de *A. seminis* podría generar diferencias en los patrones de proteínas y verse afectado su crecimiento.

5. HIPOTESIS

- ◇ Si la expresión genética puede ser regulada por el Quórum sensing, entonces la adición de E o NE al medio de crecimiento inducirá cambios en la expresión de proteínas y afectar la tasa de crecimiento de *A. seminis*.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

- ◇ Determinar el efecto de la Epinefrina (E) o Norepinefrina (NE) sobre el crecimiento y la expresión de proteínas de *A. seminis*.

6.2. Objetivos particulares

- ◇ Determinar el efecto de la adición de E o NE sobre el crecimiento de *A. seminis*.
- ◇ Establecer patrones de proteínas e inmunoreconocimiento de *A. seminis* crecida en presencia y ausencia de E o NE.
- ◇ Observar el efecto de las catecolaminas sobre la actividad proteolítica de *A. seminis*.
- ◇ Determinar el efecto de E o NE en la formación de biopelículas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cepas bacterianas y mantenimiento de cultivo

Para la realización de este trabajo se utilizaron dos aislados de campo (A4 y A8), así como una cepa de referencia (ATCC 15768). El mantenimiento de las cepas fue realizado en placas de agar sangre (Infusión de cerebro y corazón (BHI por sus siglas en inglés) con 5% de sangre de ovino) y se incubaron a 37°C en una atmosfera con 10% de CO₂ durante 24h.

7.2. Cinética de crecimiento

Para determinar el efecto de las hormonas en el crecimiento de *A. seminis* se cultivaron las tres cepas en 3 mL de caldo Soya tripticaseína (TSB) o Luria Bertani (LB), una alícuota de este cultivo se diluyó en 3 mL de caldo para llevarlo a una concentración del 10% y se incubaron en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.1. En ese momento se añadieron 50 µM de E o NE y como control se empleó medio sin hormonas. Se realizaron mediciones cada hora durante 6 h a 600 nm, la última medición fue leída a las 24 h.

7.3. Obtención de proteínas totales y secretadas.

Se realizaron cultivos en 100 mL de medio con las cepas ATCC 15768, A4 y A8. Una vez alcanzada la densidad óptica de 0.1 a 600 nm se añadieron 50 µM de E o NE, estos cultivos se incubaron a 37° o 35°C por 24 h en agitación constante. Los cultivos se centrifugaron a 10500 rpm durante 25 minutos a 8°C, el sobrenadante de cultivo fue precipitado con (NH₄)₂SO₄ al 60% para recuperar las proteínas secretadas. La pastilla celular fue resuspendida con una solución de HEPES 10 mM pH 7.8 con lisozima (1mg/mL) y se incubó en agitación a 150 rpm a 37°C durante 1 hora, posteriormente las células se sonicaron 10 ciclos (15 segundos de sonicación por 10 segundos de descanso) en hielo. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 3 minutos para separar las células enteras, se recuperó el sobrenadante (proteínas totales).

7.4. Electroforesis y zimogramas

Para la observación de posibles cambios en los patrones de proteínas y las posibles diferencias de las muestras obtenidas con hormonas y el control, se realizó una separación electroforética en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% cargando 20 µg de proteína por carril. Al término, se tiñeron los geles con una solución de Azul de Comasie (R-250 0.1%, metanol 40% y ácido acético 10%) y posteriormente se empleó una solución de ácido acético al 10% para quitar el exceso de colorante.

Para observar la actividad proteolítica se realizaron zimogramas en geles SDS-PAGE al 10% con 0.5% de caseína o 0.1% de gelatina porcina (De la Cruz, 2015). Posterior a la separación electroforética, los geles de sustrato se incubaron en agitación durante 1 h en una solución de tritón X-100 al 2.5%. Enseguida, los geles fueron incubados en Tris 20 mM CaCl₂ 10 mM toda la noche a 37°C para activar las posibles proteasas que degradarían el sustrato. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y las actividades proteolíticas fueron observadas como zonas blancas contra un fondo azul (Negrete-Abascal *et al.* 1999).

7.5. Inmunoreconocimiento (Western blot y Far-Western Blot)

Después de realizar la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 70 min a 300 mA con voltaje constante. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se incubó en una solución de leche des cremada al 5% en PBS –Tween 0.05% por 1 hora y media, a 37° C, en agitación constante, para bloquear los lugares de unión que han quedado después de la transferencia. Posteriormente se dieron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween 0.05% para retirar el exceso de leche descremada.

Tabla 1. Lista de anticuerpos utilizados en una concentración 1:1000 (Reyes, 2018).

<i>Anticuerpo primario y proteína</i>	<i>Anticuerpo secundario</i>
<i>Suero de borrego con epididimitis</i>	Suero Anti-borrego
<i>Fibrinectina de borrego biotinilada</i>	Avidina peroxidada
<i>Lactoferrina bovina biotinilada</i>	Avidina peroxidada

La membrana se incubó por dos horas con el anticuerpo primario o las proteínas biotiniladas, diluidos 1:500 en PBS-Tween. Posteriormente el anticuerpo o las proteínas biotiniladas fueron retirados y se dieron 3 lavados con PBS-Tween nuevamente, esta solución fue remplazada por el anticuerpo secundario o avidina peroxidada que se encontraban a una concentración de 1:1000, con los cuales se incubó por dos horas. Se lavó la membrana 3 veces más. Se preparó una solución de H₃PO₄ (50mM, pH 7.4) con diaminobenzidina, CoCl₂ y NiCl₂, posteriormente se añadieron 30 µL de H₂O₂ para revelar la reacción y determinar la interacción (Negrete-Abascal *et al.*, 1998, 1999).

7.6. Formación de biopelícula

Para evaluar el efecto de las hormonas en la formación de biopelícula, se emplearon placas de poliestireno estériles con 96 pozos (Sarsted, Barcelona, España), cada uno de los cuales fue llenado con 180 μL de medio TSB o LB e inoculados con 20 μL de células de las 3 cepas empleadas, que previamente fueron ajustadas a una densidad óptica de 1 a 630 nm. Y se utilizaron los medios sin inóculo como controles negativos. Para los tratamientos se adiciono NE o E en una concentración de 50 μM . La placa fue incubada durante 24 h a 37° C.

Después de la incubación, el medio fue retirado de los pozos, las células se fijaron con 200 μL de metanol por 15 min. Los pozos se dejaron secar para que se evaporara el metanol y se tiñó cada pozo con 150 μL de cristal violeta Hucker's al 1% por 15 minutos. Se retiró el colorante y la placa fue lavada con agua corriente para retirar los excesos de colorante. Posteriormente se agregaron 150 μL de ácido acético glacial al 30%, se dejó incubar la caja con esta solución por 30 min en agitación constante para recuperar el colorante adsorbido por las células teñidas.

Por último en una caja nueva de microtitulación, los pozos se llenaron con 160 μL de ácido acético al 30% y 40 μL del contenido de la caja anterior. La densidad óptica fue medida en un lector de placas ELISA (Microplate Reader model 680; BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Cada ensayo se realizó por triplicado, los resultados se promediaron y se graficaron (Fredheim *et al.*, 2009).

7.6.1. Dispersión de la biopelícula.

Con el objetivo de determinar si las hormonas tenían un efecto dispersor sobre una biopelícula ya formada, se indujo la formación de la biopelícula a las mismas condiciones como fue descrito previamente; como control negativo se utilizó medio sin células. La caja se incubó por 24 h a 37° C, una vez formada la biopelícula, el medio de cultivo fue retirado y sustituido por una solución de agua estéril con 50 μL de E o NE dentro del campo estéril para evitar contaminación. Nuevamente la caja se incubó por 30 minutos a 37° C; el procesamiento de la caja y la lectura se realizaron de igual forma que el procedimiento anterior.

8. RESULTADOS

8.1. Cinética de crecimiento

La adición de E o NE (50 μ M) a medios TSB o LB en donde crecía *A. seminis* no mostró diferencias en la densidad óptica a 600 nm cuando estas lecturas se compararon con los medios control sin adición de hormonas. Únicamente se observó un mejor crecimiento de la bacteria al crecerla en medio TSB (Figura 8) en comparación con su crecimiento en LB (Figura 9).

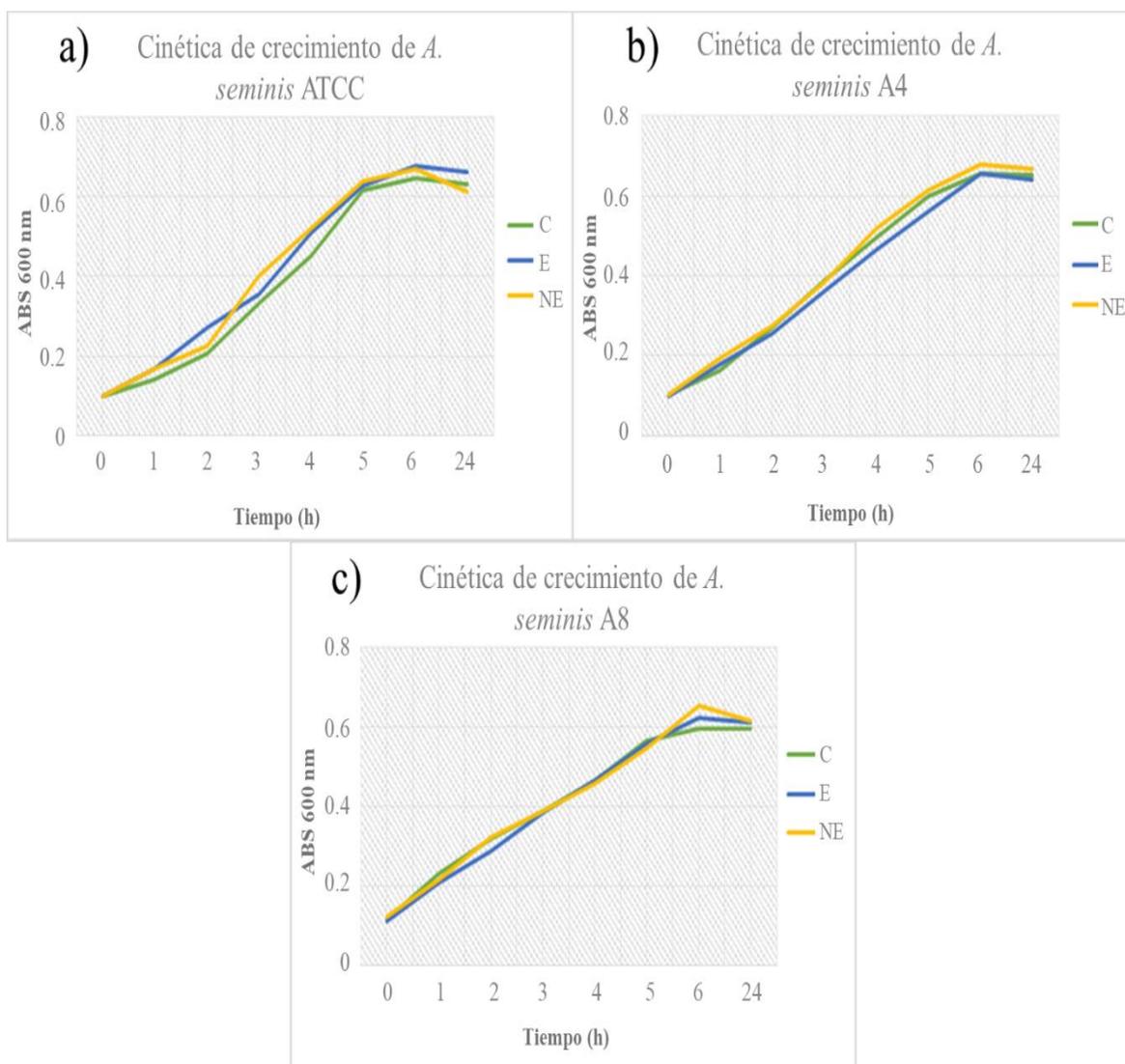


Figura 8. Efecto de E o NE (50 μ M) en el crecimiento de *A. seminis*: a) ATCC 15768, b) A4, y c) A8 en medio TSB.

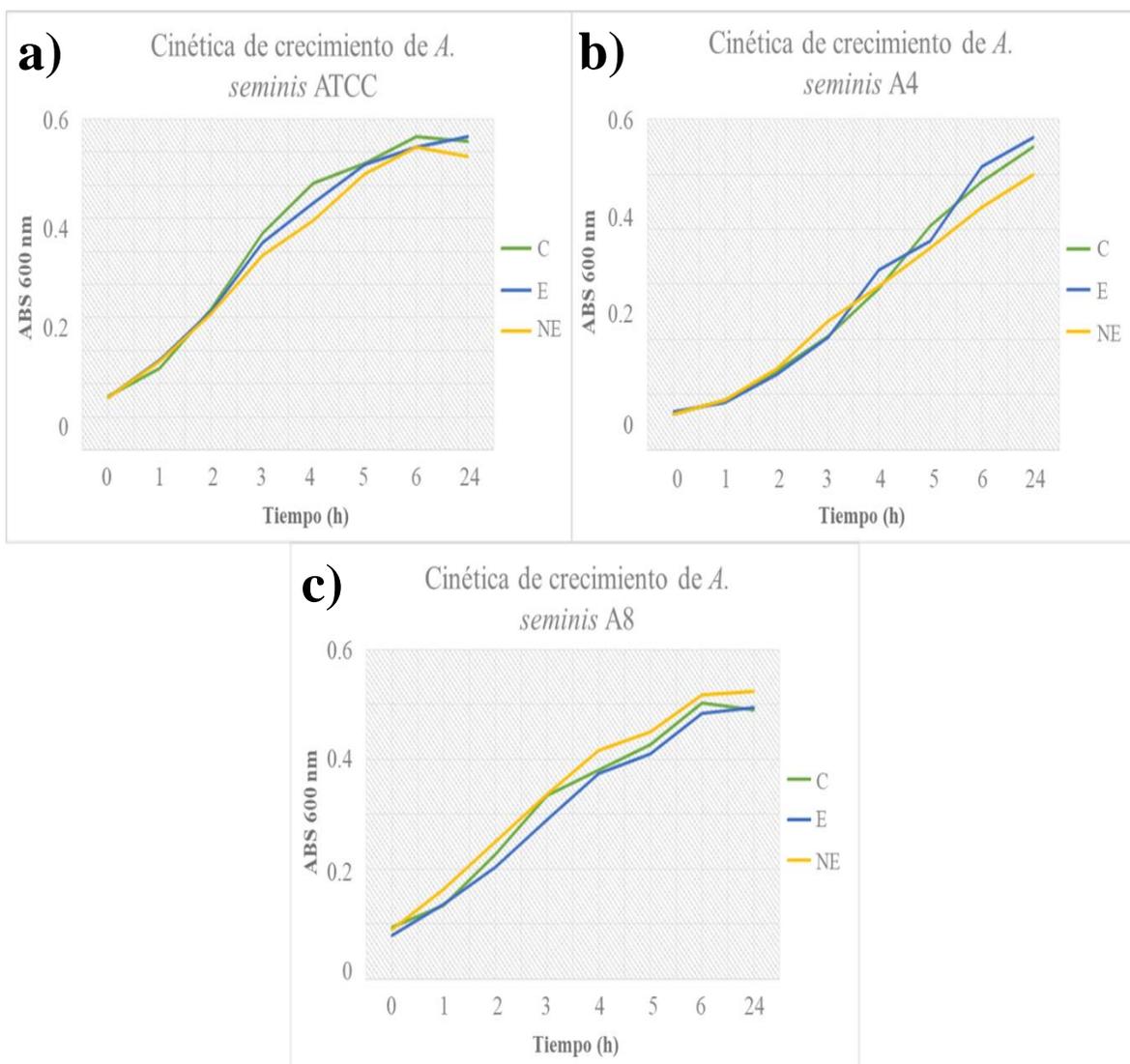


Figura 9. Efecto de E o NE (50 μM) en el crecimiento de *A. seminis*: a) ATCC 15768, b) A4, y c) A8 en medio LB.

8.2. Perfil de proteínas

Una vez que se determinó que E o NE no tenían efecto en el crecimiento de *A. seminis* se evaluó la presencia y ausencia de las hormonas en los medios de cultivo TSB y LB a temperaturas de incubación de 35°C y 37°C para determinar si tenían efecto en los patrones de proteínas.

8.2.1. Medio TSB

El crecimiento de la cepa de referencia en medio TSB adicionado con E permitió ver la disminución de una banda de proteína de aprox. 90 kDa, y el incremento de una banda de aprox. 15 kDa en las muestras de proteínas totales. No se observaron cambios en este medio suplementado con NE ni en los aislados de campo crecidos en medio TSB (Figura 10).

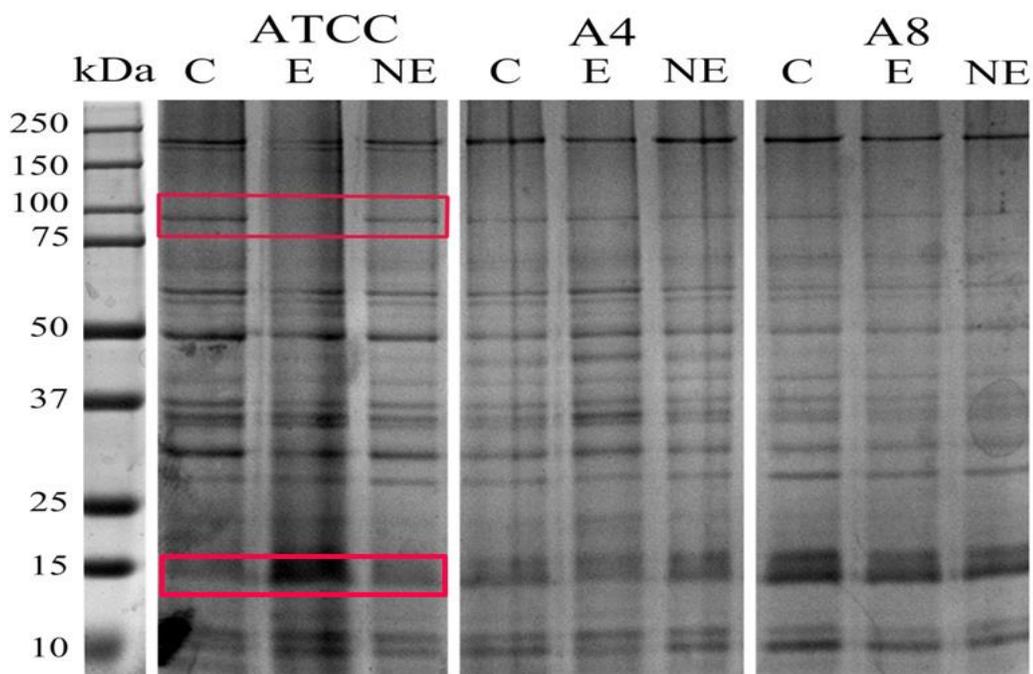


Figura 10. Gel de poliacrilamida al 10% donde se muestra el patrón de proteínas totales de *A. seminis* crecido en medio TSB a 37° C: (C) en ausencia de hormonas, (E) epinefrina y (NE) norepinefrina.

En el caso de las proteínas secretadas, se observó el incremento de una proteína de aprox. 25 kDa en las muestras de la cepa de referencia crecida en presencia de NE; así como la no expresión de bandas de proteína de 30 y 37 kDa en muestras de la cepa A4 crecida en presencia de la misma hormona. Los patrones de proteínas secretadas de la cepa A8 no presentaron cambios con ninguna de las hormonas (Figura 11).

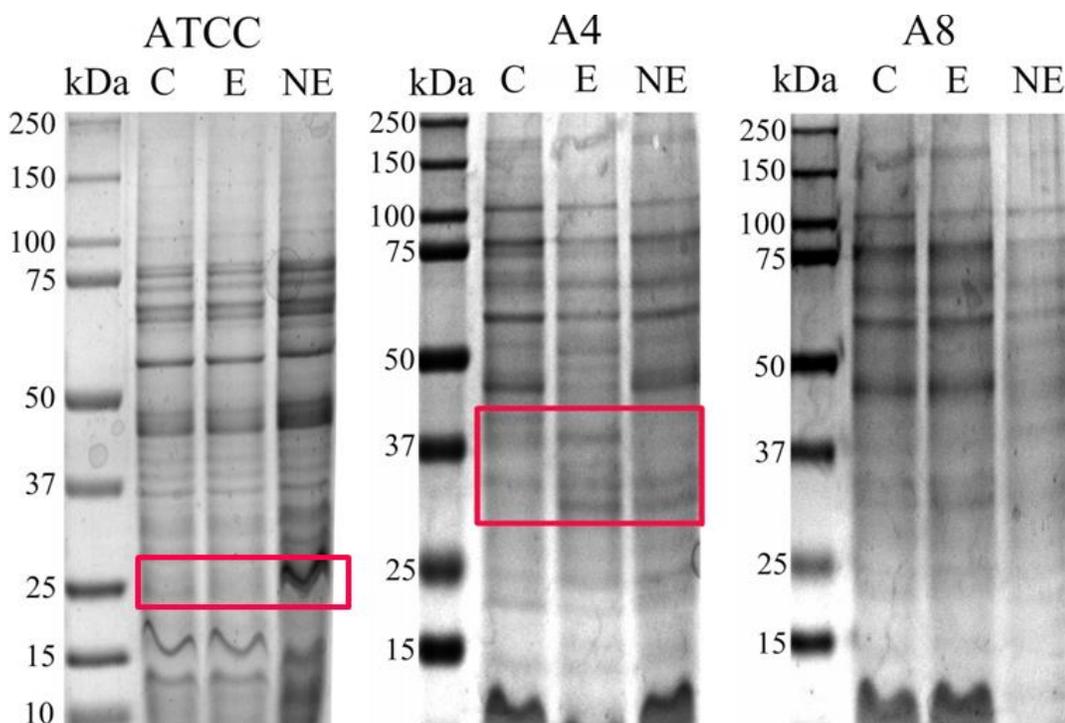


Figura 11. Gel de poliacrilamida al 10% donde se muestra el patrón de proteínas secretadas de *A. seminis* en medio TSB con una temperatura de incubación de 37°C: (C) en ausencia de hormonas, (E) epinefrina y (NE) norepinefrina.

8.2.2. Medio LB

Con el fin de determinar si el crecimiento de *A. seminis* en un medio menos rico, en este caso el medio LB, permitía observar más diferencias en los patrones de proteínas, se evaluaron las mismas variables probadas en los experimentos con medio TSB. En los patrones totales de proteína se observaron incrementos en bandas de 60 y 37 kDa en las muestras de la cepa de referencia crecidas en presencia de E así como incrementos en bandas de 200 y 35 kDa en presencia de ambas hormonas, para las muestras de la cepa A8. Sin embargo en las muestras de la cepa A4 no se observaron cambios (Figura 12).

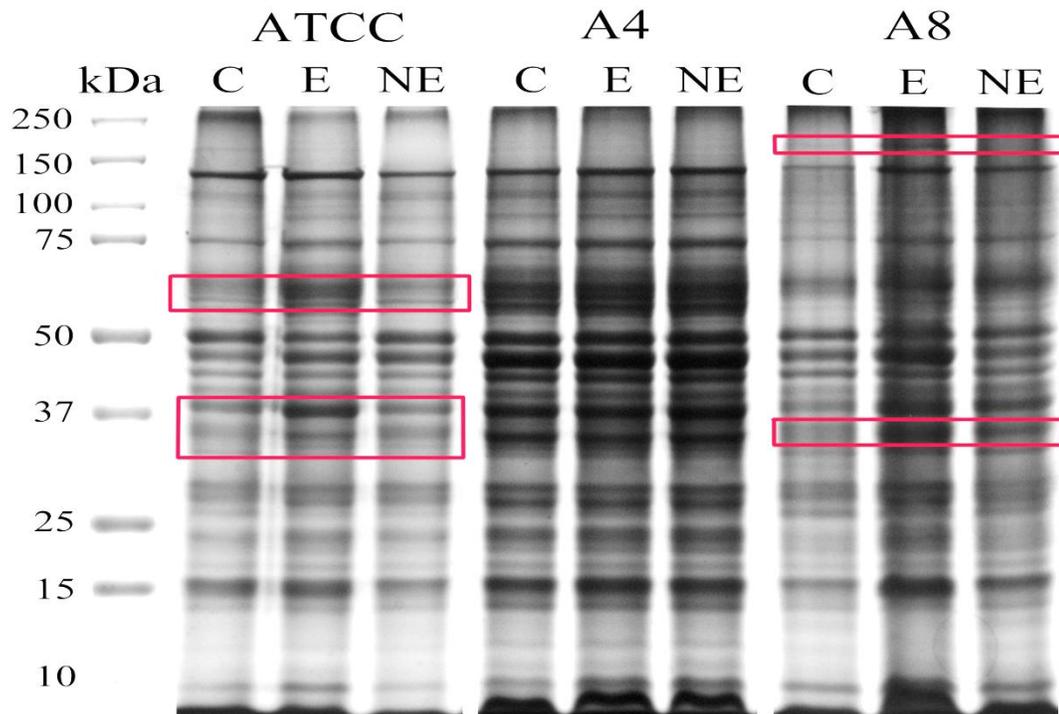


Figura 12. Gel de poliacrilamida al 10% donde se muestra el patrón de proteínas totales de *A. seminis* en medio LB con una temperatura de incubación de 37°C: (C) en ausencia de hormonas, (E) epinefrina y (NE) norepinefrina.

Con respecto a las proteínas secretadas, se pudo observar la expresión de bandas de 100 y 200 kDa en las muestras de la cepa de referencia crecida en presencia de E, así como una disminución de una banda de aprox. 75 kDa en la muestra de la cepa A4 crecida en presencia de NE. Los patrones de proteínas de la cepa A8 no pudieron ser evaluados pues presentaban muchas variaciones (Figura 13).

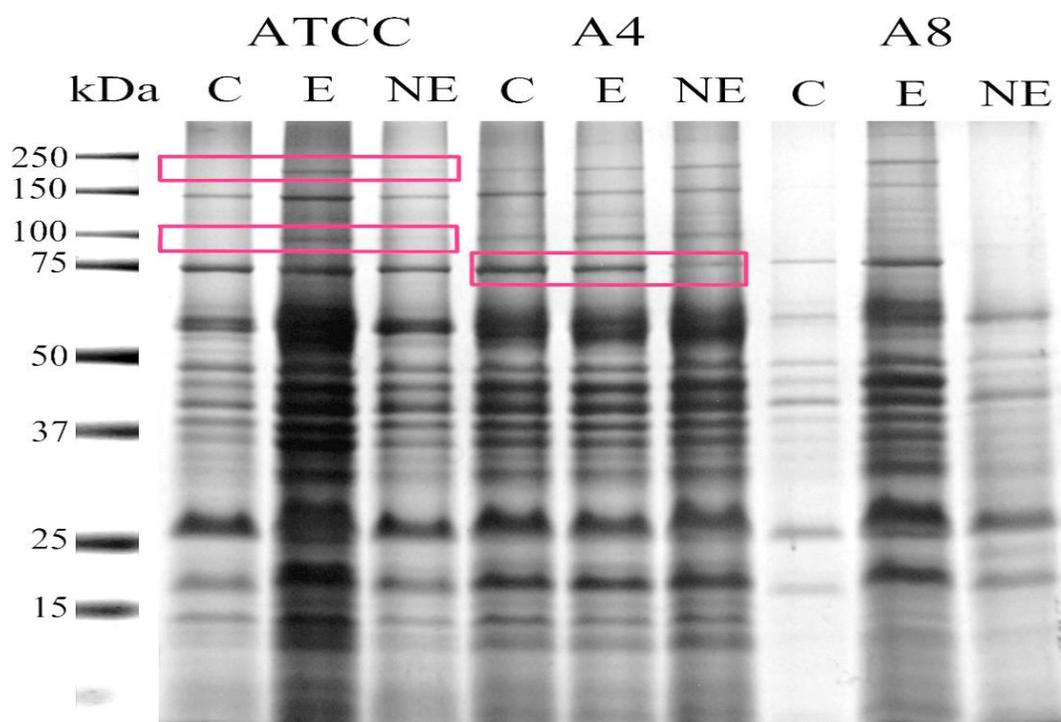


Figura 13. Gel de poliacrilamida al 10% donde se muestra el patrón de proteínas secretadas de *A. seminis* en medio LB con una temperatura de incubación de 37°C: (C) en ausencia de hormonas, (E) epinefrina, (NE) norepinefrina.

El crecimiento de *A. seminis* a 35°C permitió observar la inducción de bandas de aprox. 70 kDa para la cepa de referencia en presencia de ambas hormonas. Un efecto similar fue observado en bandas de 75 y 40 kDa de las muestras de la cepa A8 con ambas hormonas así como la desaparición de bandas de 70 kDa. En las muestras de la cepa A4 no se observaron cambios (Figura 14).

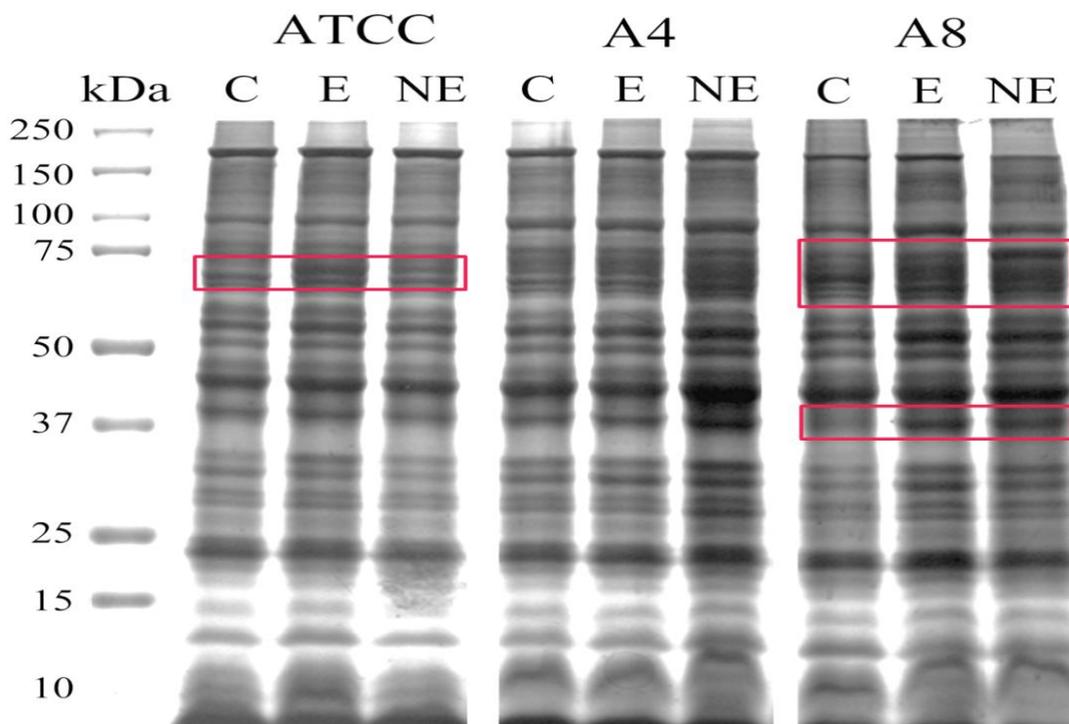


Figura 14. Patrón de proteínas totales de las cepas ATCC, A4 y A8 de *A. seminis* en presencia o no de catecolaminas en medio LB con una temperatura de incubación de 35°C: (C) en ausencia de hormonas, (E) epinefrina y (NE) norepinefrina.

Los patrones de proteínas secretadas por *A. seminis* crecida a 35 °C en medio LB permitió visualizar la aparición de bandas de 120, 60 y 14 kD en presencia de hormonas de la cepa de referencia, así como la ausencia de una banda de aprox. 40 kDa. Con respecto a la cepa A8 se observó la expresión de bandas de aprox. 150, 100, 75 y 50 kDa en presencia de hormonas y la omisión de bandas de 120 y 35 kDa. En las muestras de la cepa A4 no se observaron diferencias en estos patrones de proteínas (Figura 15).

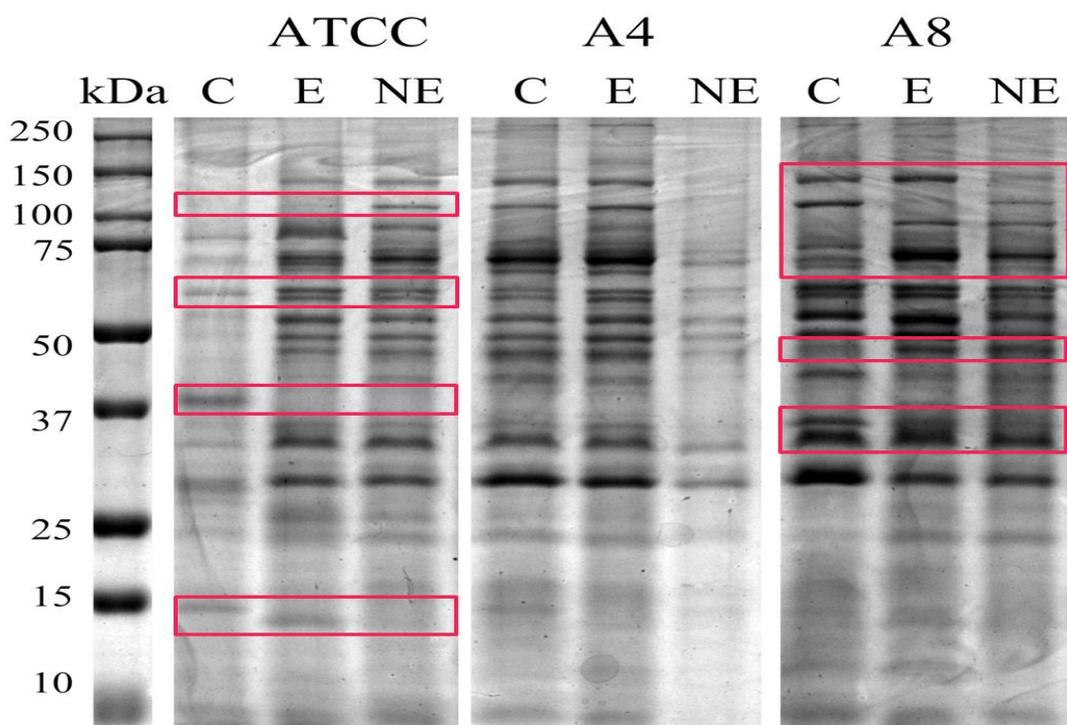


Figura 15. Patrón de proteínas secretadas de las cepas ATCC, A4 y A8 de *A. seminis* en presencia o no de catecolaminas en medio LB con una temperatura de incubación de 35°C: (C) en ausencia de hormonas, (E) epinefrina y (NE) norepinefrina.

8.3. Actividad proteolítica

Para determinar si la presencia de las hormonas inducía cambios en la actividad proteolítica expresada por *A. seminis* se tomaron las muestras de proteínas totales obtenidas de los cultivos en medio TSB a 37°C y fueron separadas electroforéticamente en zimogramas con caseína o gelatina. En los patrones de proteínas totales se observó la omisión de bandas de actividad en el gel de gelatina porcina de aprox. 250 y 60 kDa en la cepa A8 en presencia de hormonas (Figura 16).

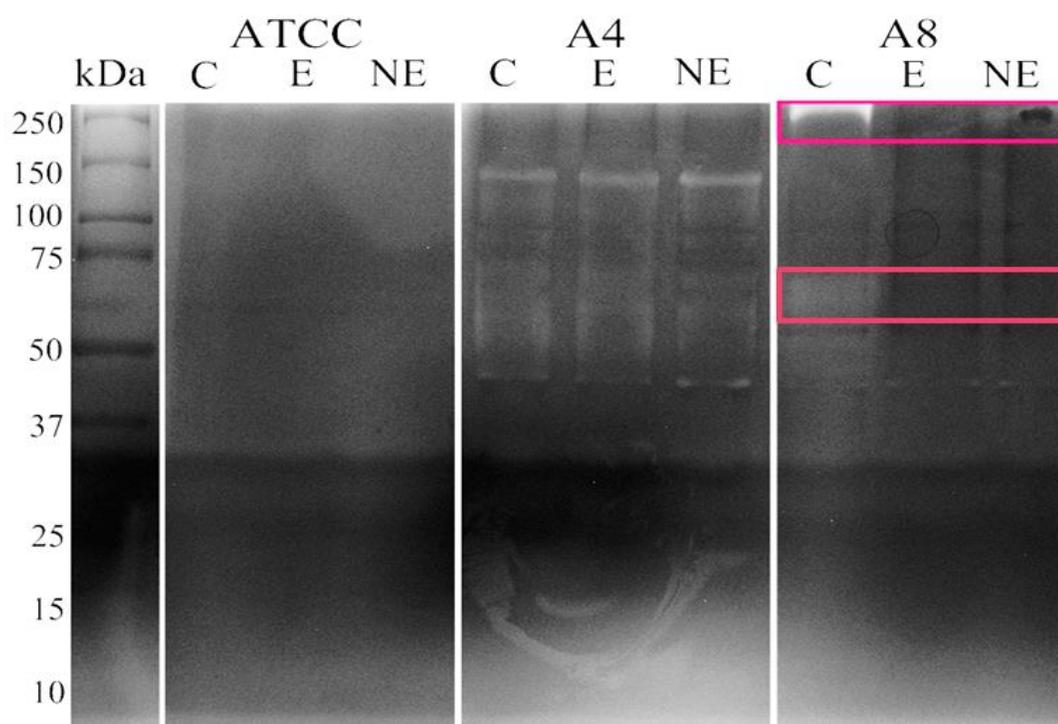


Figura 16. Zimograma en gelatina porcina de proteínas totales a 37° C de incubación en medio TSB de *A. seminis*.

En el patrón de proteínas totales de *A. seminis* crecida a 37° C en medio LB permitió ver una banda de actividad proteolítica de alrededor de 250 kDa en las muestras de la cepa de referencia crecida con NE y en la muestra control de la cepa A4. El resto de las muestras no presento actividad proteolítica en zimogramas con gelatina porcina (Figura 17). En zimogramas con caseína, se observó actividad proteolítica en las muestras control de A4 y E de la cepa A8, en ambas a alto peso molecular (Figura 18).

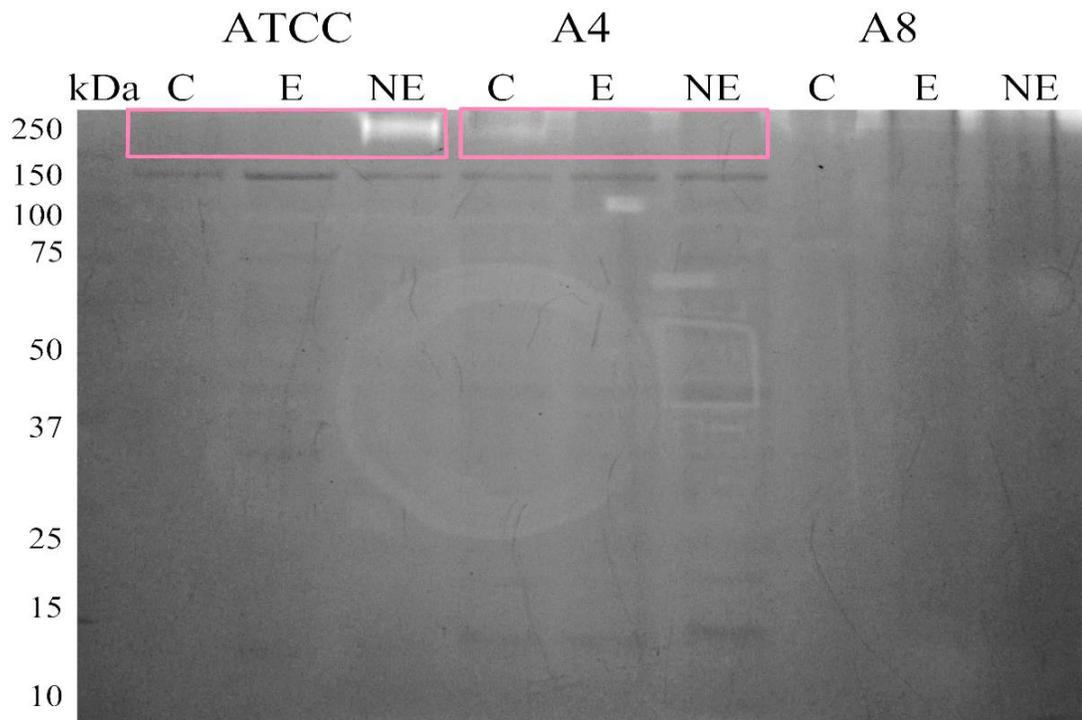


Figura 17. Zimograma en gelatina porcina de proteínas totales a 37° C de incubación en medio TSB de *A. seminis*.

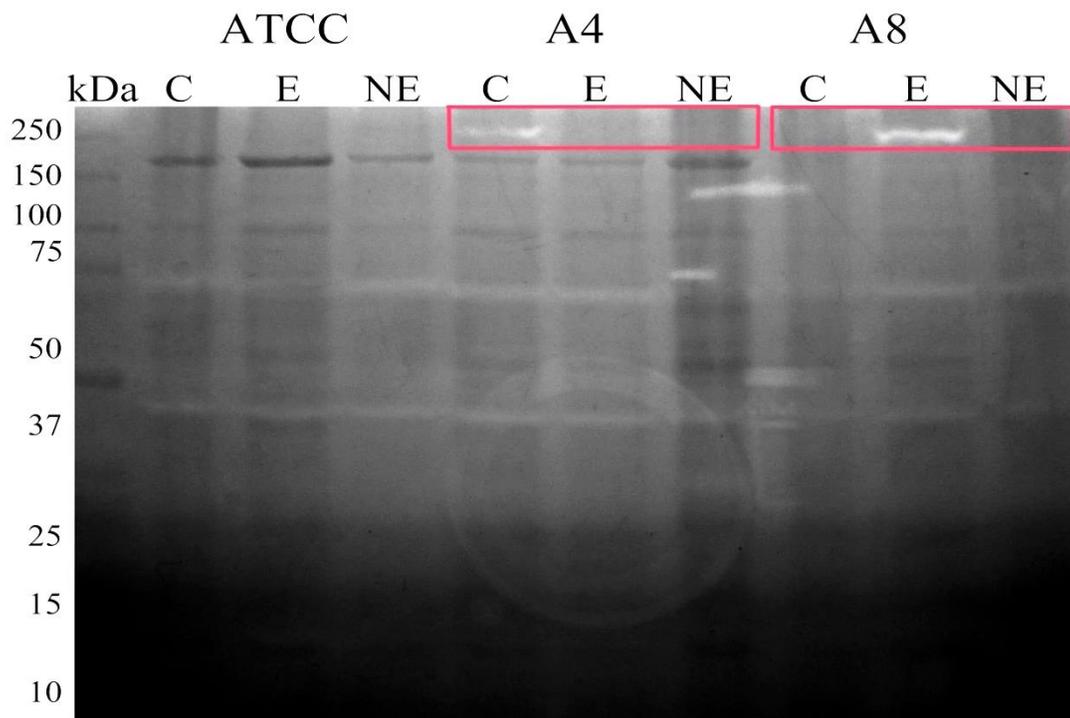


Figura 18. Zimograma en caseína de proteínas totales a 37° C de incubación en medio LB de *A. seminis*.

8.4. Inmunoreconocimiento

Con el fin de determinar si las diferencias observadas en los patrones de proteínas también se podían presentar en los patrones de reconocimiento, se utilizaron las muestras crecidas en medio TSB para realizar western blot y far-western para interaccionar con moléculas involucradas en la captación o transporte de hierro o que funcionaran como adhesinas. Se observó que aquellas bandas que presentaban cambios en intensidad, también presentaron esos cambios en reconocimiento al usar suero de borrego con epididimitis (Figura 19). A su vez, no se percibieron reconocimientos asociados a las diferencias observadas en las muestras de proteínas secretadas (Figura 20).

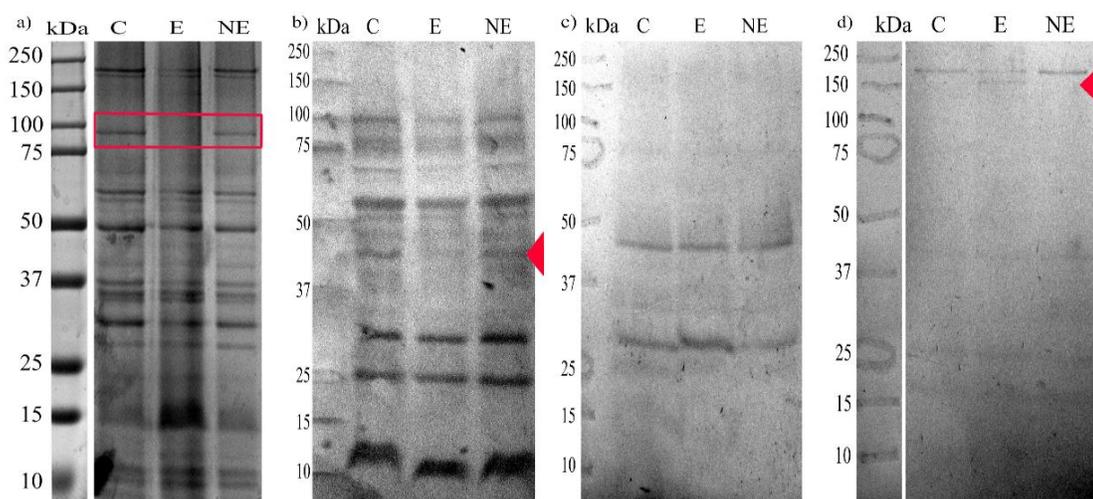


Figura 19. a) Patrón de proteínas totales de la cepa ATCC, Westerns blot y Far W b) suero de borrego c) fibrinógeno y d) lactoferrina bovina en presencia o no de catecolaminas en medio TSB con una temperatura de crecimiento de 37°C: (C) en control, (E) epinefrina, (NE) norepinefrina.

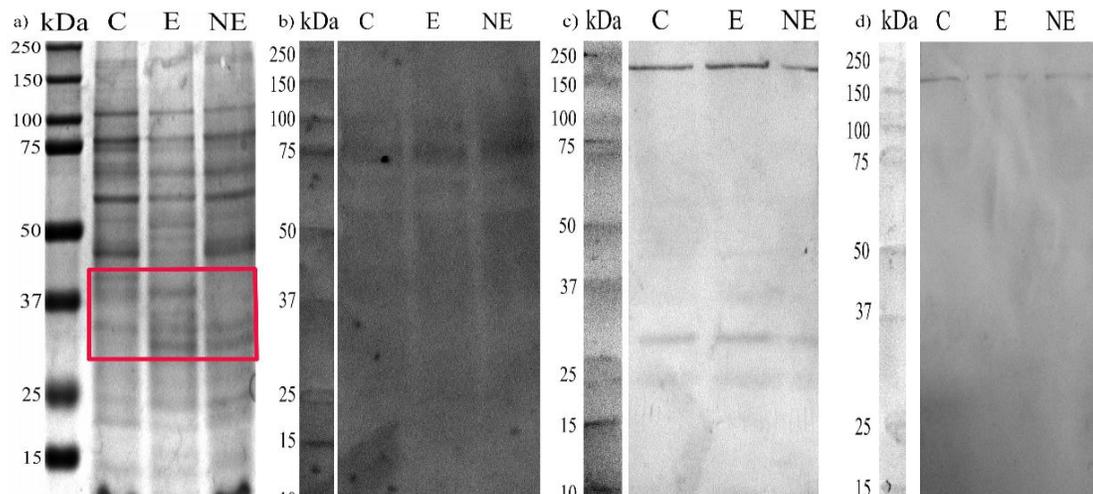


Figura 20. a) Patrón de proteínas secretadas de la cepa ATCC, Westerns blot y Far W b) suero de borrego c) fibrinógeno y d) lactoferrina bovina en presencia o no de catecolaminas en medio TSB con una temperatura de crecimiento de 37°C: (C) en control, (E) epinefrina, (NE) norepinefrina.

Los patrones de proteínas totales de la cepa de referencia crecida en LB a 37 °C se presentó reconocimiento de bandas de 90 kDa aprox., con suero de borrego con epididimitis en muestras en presencia de hormonas (Figura 21b). Se percibió una banda de alrededor de 45 kDa que interacciona con fibrinógeno sugiriendo posibles adhesinas (Figura 21c). A su vez, en las interacciones con lactoferrina bovina no se observaron diferencias asociadas a las bandas en los geles de poliacrilamida (Figura 21d).

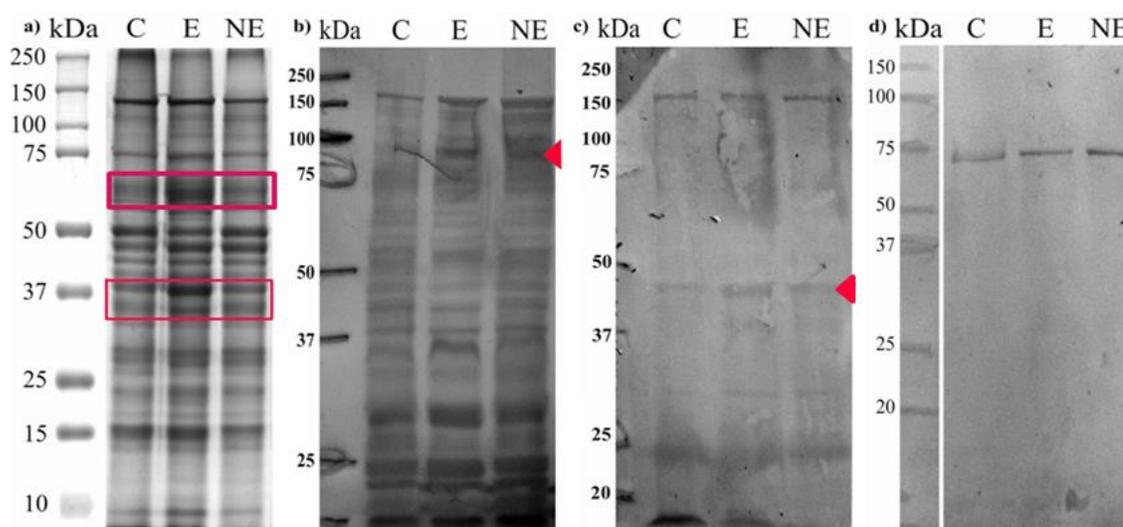


Figura 21. a) Patrón de proteínas totales de la cepa ATCC, Westerns blot y Far W b) suero de borrego c) fibrinógeno y d) lactoferrina bovina en presencia o no de catecolaminas en medio LB con una temperatura de crecimiento de 37°C: (C) en control, (E) epinefrina y (NE) norepinefrina.

En el caso de las muestras de proteínas totales de la cepa de referencia crecida en medio LB se observaron variaciones en la intensidad de reconocimiento de bandas de 200 y 70 kDa en muestras crecidas en presencia de NE que se incubaron con el suero de borrego con epididimitis. En las pruebas de far WB con fibrinógeno o lactoferrina de borrego no se observaron diferencias (Figura 22).

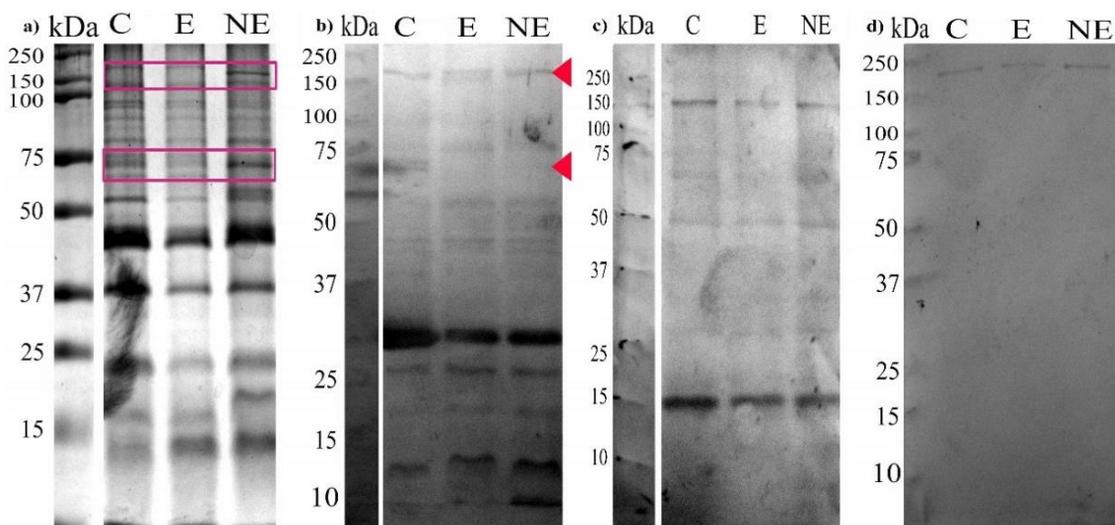


Figura 22. a) Patrón de proteínas secretadas de la cepa ATCC, Westerns blot b) suero de borrego c) fibrinógeno y d) lactoferrina bovina en presencia o no de catecolaminas en medio LB con una temperatura de crecimiento de 37°: (C) en control, (E) epinefrina y (NE) norepinefrina.

Con respecto a las muestras de proteínas de la cepa de referencia crecida a 35 °C se observó una intensidad mayor en el reconocimiento de bandas de aprox. 90, 30 y 12 kDa en las muestras de bacterias crecidas en presencia de hormonas (Figura 23b). Estas diferencias no se observaron cuando se utilizó fibrinógeno o lactoferrina de borrego (Figura 23c y d).

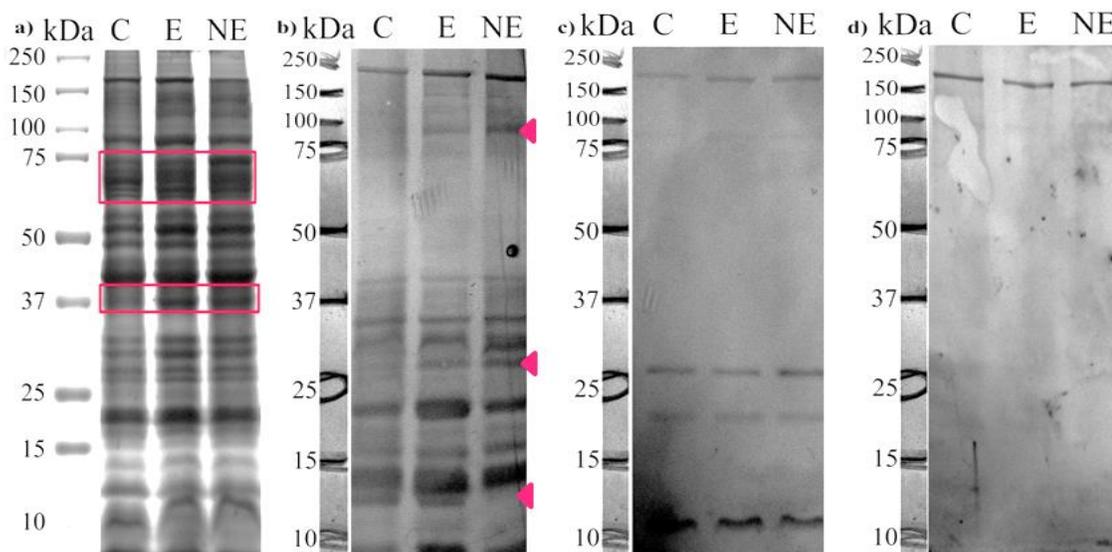


Figura 23. a) Patrón de proteínas totales de la cepa ATCC, Western blot b) suero de borrego c) fibrinógeno y d) lactoferrina bovina en presencia o no de catecolaminas en medio LB con una temperatura de crecimiento de 35°: (C) en control, (E) epinefrina y (NE) norepinefrina.

De las proteínas secretadas de la misma cepa a 35° C se observó poca diferencia en los patrones de reconocimiento (Figura 24b). Tampoco se observaron cambios en las muestras incubadas con fibrinógeno o transferrina de borrego (Figura 24c y d).

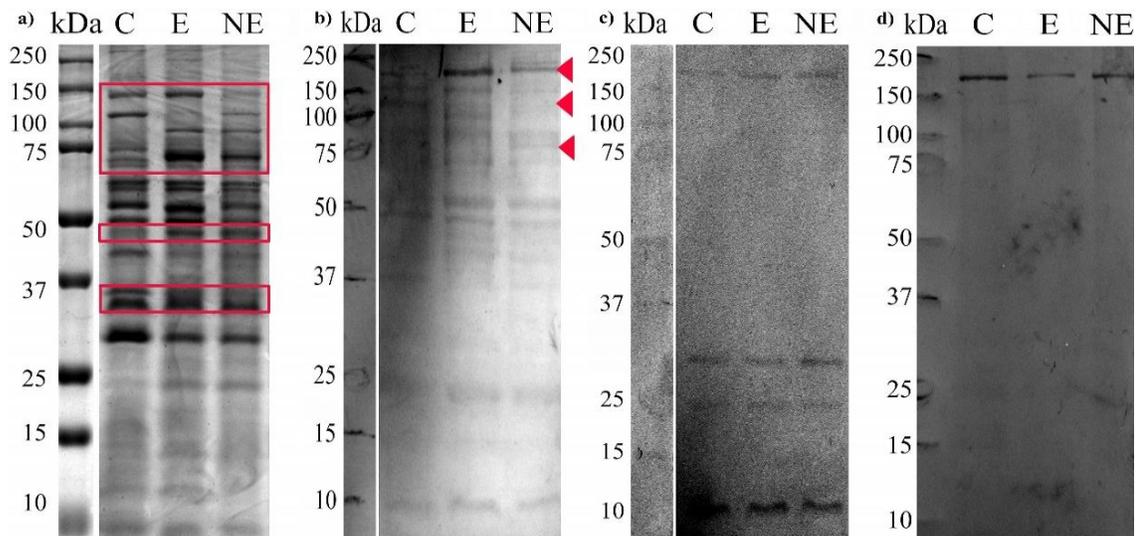


Figura 24. a) Patrón de proteínas secretadas de la cepa ATCC, Westerns blot b) suero de borrego c) fibrinógeno y d) lactoferrina bovina en presencia o no de catecolaminas en medio LB con una temperatura de crecimiento de 35°: (C) en control, (E) epinefrina y (NE) norepinefrina.

8.5. Formación de biopelícula

La cantidad de biopelícula formada fue muy similar entre las bacterias crecidas en presencia o no de E, sin embargo la cantidad de biopelícula formada por la cepa A4 fue ligeramente mayor con una diferencia significativa (Figura 25a). Por otro lado la adición de NE afecto la formación en mayor cantidad a la cepa de referencia pero afectó en menor medida a las cepas de campo (Figura 25b).

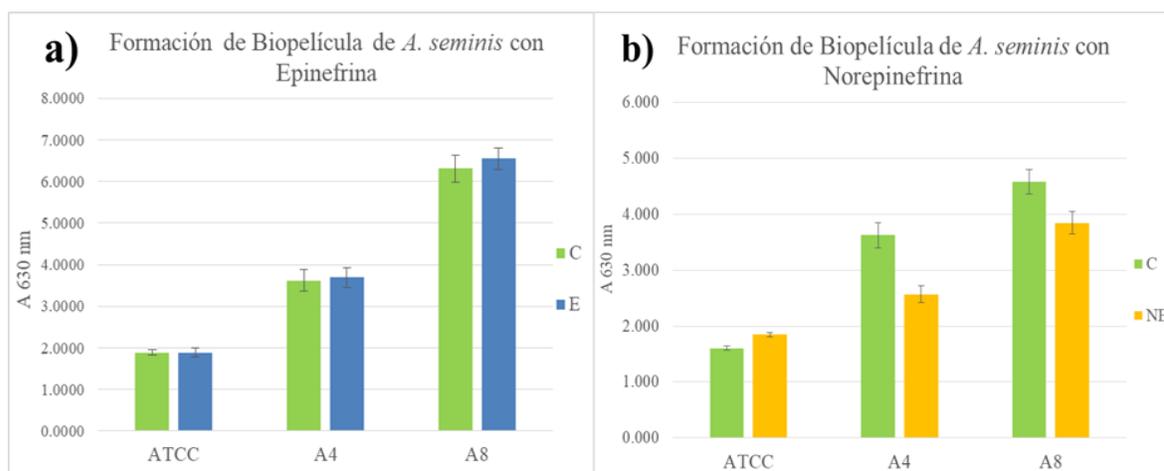


Figura 25. Formación de biopelícula de las cepas de *A. seminis* en presencia o no de catecolaminas a 37 ° C en medio TSB: a) con E, b) con NE.

El efecto de las hormonas en biopelículas ya formadas fue muy evidente. Cuando éstas se incubaron con E todas presentaron una disminución en su cantidad, siendo más evidente en la cepa de referencia (Figura 26a) con una disminución de alrededor del 50%, mientras que en las cepas de campo disminuyó alrededor del 40%. En el caso de la NE la dispersión fue totalmente en la cepa de referencia mientras que disminuyó en aprox. un 35% en las cepas de campo (Figura 26b).

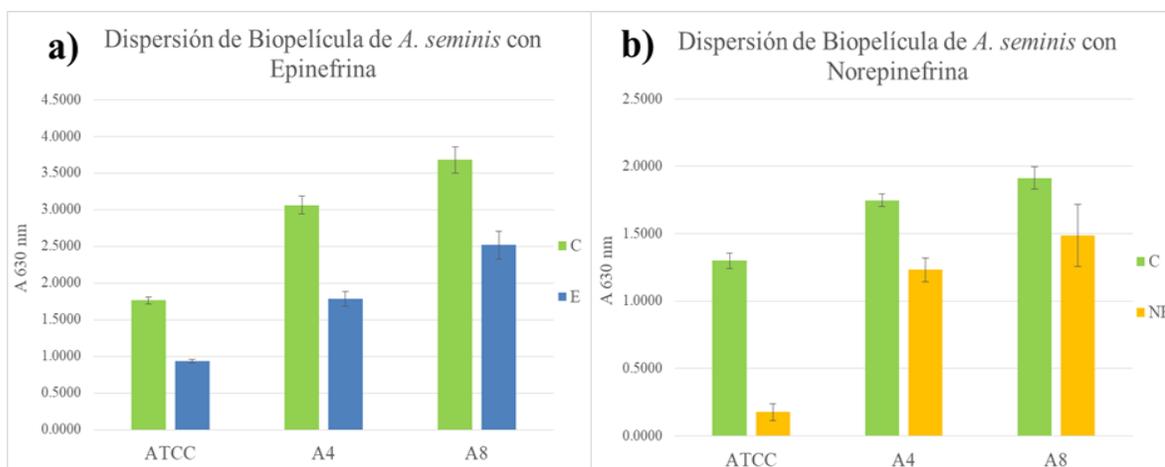


Figura 26. Cuantificación de la biopelícula formada de las cepas de *A. seminis* en presencia o no de catecolaminas en medio TSB a 37 ° C: a) con E, b) con NE.

9. DISCUSIÓN

El Ganado ovino aporta el 40% de la producción agrícola mundial, siendo China quien cuenta con la mayor cantidad de este recurso, a su vez que Australia y Nueva Zelanda son los principales exportadores de carne y ganado en pie. México aporta el 0.57% de la producción mundial y este recurso pecuario ocupa el 4° lugar en valor de producción, el estado de México e Hidalgo son quienes cuenta con el mayor porcentaje del inventario ovino y si bien la exportación de carne es nula, países como Ecuador, Panamá, Guatemala y Belice importan ganado Mexicano con fines reproductivos (Hérrnandez-Marin 2017).

Actinobacillus seminis es una bacteria Gram negativa que se ha encontrado en la flora vaginal y en cavidades prepuciales, este microorganismo se considera un patógeno oportunista, es conocido debido a su relación con la epididimitis y la orquitis y aunque éste no es el principal organismo causal si es una de las bacterias más frecuentes en este tipo de padecimientos. La epididimitis ha sido considerada como una causa importante de infertilidad en los carneros durante muchos años, siendo *A. seminis* causante de disminuir la tasa de fertilidad y generar la pérdida del 10% (Cebra y Cebra, 2012; dos Santos *et al.* 2014).

Por otro lado *A. seminis* tiene diversos efectos negativos en ovinos, por ejemplo pérdida de peso, contaminación causada por productos bacterianos o células inflamatorias, permeabilidad de los conductos genitales, la baja calidad del semen debido a los defectos que este presenta tales como anormalidades en cabeza y cola, cambios cromosómicos y gotitas citoplasmáticas. A su vez diversos estudios señalan que también genera daños a las hembras como placentitis necrótica o abortos (Burgess, 1982).

Actinobacillus seminis a pesar de ser reconocido por su papel en la epididimitis es un microorganismo poco estudiado, la detección de esta bacteria en los rebaños es complicada debido a que los exámenes patológicos no son plenamente confiables ya que sus sintomatología es similar a la de *Brucella ovis*. Otra forma para identificar a *A. seminis* es mediante pruebas serológicas aunque la prueba más habitual es el ensayo de fijación del complemento sin embargo se sugiere que tiene limitaciones, como procedimiento de diagnóstico, ya que los animales pueden dar falsos negativos (Burgess, 1982; Baynes y Simmons, 1960).

Las catecolaminas son hormonas de mucha importancia ya que están involucradas en diversas reacciones biológicas como la respuesta de “lucha o huida”, sin embargo el

exceso o el contacto por un periodo prolongado con estas sustancias puede tener repercusiones al generar deficiencias en el sistema inmune. La adición de E o NE a los medios de cultivo TSB o LB en donde crecía *A. seminis* no indujo diferencias en la densidad poblacional, siendo esto contrastante con lo reportado con Belay y Sonnenfeld en el 2002; o lo de Basal y colaboradores en el 2007 quienes demostraron que estas hormonas favorecían el crecimiento de bacterias como *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus* o *E. coli*. El efecto de estas catecolaminas es muy variado siendo capaz de aumentar, disminuir o tener un nulo impacto en el crecimiento, un ejemplo de esto es el estudio realizado por Jentsch y colaboradores en el 2013 donde probaron el efecto de estas mismas hormonas en *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* y *Eikenella corrodens*, encontrando efectos variados; en *F. nucleatum* el crecimiento se vio favorecido mientras que en *P. intermedia* y *E. corrodens* tuvo el efecto contrario, en el caso de *P. gingivalis* las hormonas no tuvieron un efecto significativo. A su vez, diversos trabajos señalan que el efecto de estas hormonas en el crecimiento bacteriano puede variar de acuerdo al método empleado así como la concentración empleada.

En el presente estudio se muestran los resultados preliminares en la expresión de proteínas de *A. seminis* en presencia o no de las hormonas (E o NE) crecidas en dos medios diferentes (TSB y LB) a dos temperaturas diferentes (35° y 37° C). Se observó que en el medio LB a 35 ° C fue donde se presentaron más cambios. Sharaff en el 2012 observó diferencias en los patrones de proteínas de *P. aeruginosa* en presencia de E y NE, encontrando 16 proteínas que se expresaban en presencia de NE.

En los Zimogramas realizados se presentó actividad proteolítica en diferentes cepas; en el zimograma con gelatina porcina con muestras crecidas en medio TSB, la actividad proteolítica solo se observó en la muestra control de la cepa A8, mientras que en las muestras obtenidas de LB se observó una banda de alto peso molecular en la muestra control de la cepa A4, con ambos sustratos, sin embargo estos resultados no son concluyentes.

Para la detección inmune se utilizó el suero de borregos con epididimitis, con el fin de determinar si las proteínas inducidas por la presencia de hormonas en los medios de cultivo eran inmunogénicas, es decir, se expresaban *in vivo*. Una de las proteínas reconocidas podría tratarse de la proteína EF-Tu; a su vez, se uso fibronectina la cual es una proteína que se encuentra en la matriz extracelular asociada a adhesión celular y lactoferrina que es una

glicoproteína asociada al transporte de hierro (Rodríguez-Franco *et al.*, 2005; Lucena *et al.*, 2007). En estas pruebas hubo diferencias reconocidas por el suero de borrego en casi todas las condiciones. La función de EF-Tu es transportar los RNAt amionocilados, sin embargo se ha mencionado que pueden tener diversas funciones como la adhesión, en el caso de *A. seminis* es reportada como una adhesina no fimbrial (Montes-García, 2018, Harvey *et al.* 2019).

Es importante mencionar que se deben realizar más ensayos para obtener patrones proteicos más definidos así como bandas más exactas que permitan identificar las proteínas que presentan actividad proteolítica o reconocimiento por algún anticuerpo, aun así es posible observar que las hormonas tienen efecto en estos rubros.

Los efectos de las catecolaminas probadas en la formación de biopelículas fueron diversos, en los cuales se observó que la presencia de la NE al inicio favoreció la formación de biopelícula en la cepa de referencia; por su parte, también podrían generar una posible dispersión. Con respecto a este efecto, la E fue quien indujo una mayor disminución de biopelícula con 50% en la cepa ATCC y 40% en las cepas de campo, un efecto parecido a lo reportado por Pillai y colaboradores en el 2018. En biopelícula formadas por *Mannheimia haemolytica*, se demostrando que las hormonas disminuyeron la producción de la biopelícula con respecto al control, siendo la E quien tuvo un mayor efecto. La dispersión en las biopelículas es un proceso importante debido a que este permite la diseminación de células bacterianas al medio con la finalidad de colonizar otras locaciones (Petrova y Sauer, 2016). Boyanova en su artículo de revisión señala que el efecto de las catecolaminas se ve afectado tanto por los métodos de evaluación empleados así como por la concentración probada, a su vez, en bacterias como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Salmonella enterica* se ha visto que en presencia de hormonas, el crecimiento poblacional y la virulencia se ven favorecidas. Aunque también los resultados observados son variables como lo observado aquí, siendo en algunos caso que la virulencia se ve afectada de forma positiva o negativa (Figura 27). Resultados similares fueron reportados por Roberts y colaboradores en 2002, mostrando que entre cepas del mismo organismo pueden verse efectos distintos. En el trabajo realizado por Graziano y colaboradores en el 2013 quienes probaron una concentración de 100 μ M de E y NE en *P. gingivalis*, las catecolaminas no afectaron en el crecimiento, sin embargo, la expresión de

genes relacionados a la adquisición de hierro, estrés oxidativo y patogenicidad se vieron estimulados con la presencia de catecolaminas.

Bacterias Patógenas	Crecimiento bacteriano	Virulencia
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	-
<i>Bordetellabronchiseptica</i> , <i>B. pertussis</i>	+	+
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	-	+
<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+
<i>Clostridium perfringens</i>	-	+
<i>Escherichia coli</i> (commensal and pathogenic)	+	+
<i>Klebsiellaoxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i>	+	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	-
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
<i>Salmonella enterica</i>	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>V. mimicus</i> , <i>V. vulnificus</i>	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-

Figura 27. Bacterias sensibles al estrés hormonal (Sarkodie *et al.*, 2019).

Las bacterias son capaces de captar señales producidas por otras células bacterianas de diferentes especies mediante el quorum sensing, sin embargo se ha mencionado que estos microorganismos son capaces de percibir las señales producidas por el hospedero como las catecolaminas E y NE, las cuales son reconocidas por el receptor QseC que se encuentra en la membrana, este sensor en particular participa en la recepción del AI-3, que es una histidina quinasa y se ha encontrado en *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Erwinia carotovora*, *Chromobacterium violaceum*, *Rubrivivax gelatinosus*, *Thiobacillus denitrificans*, *Ralstonia eutropa* y *Pshychrobacter sp.*, y en miembros de familia Pasterullaceae como *Pasteurella* y *Actinobacillus* (Weigel y Demuth, 2016), pero no en *A. seminis* (Montes García *et al.*, 2020). Por lo que otras proteínas podrían también funcionar como receptores de estas moléculas.

En el trabajo realizado por Clarke y colaboradores 2006 se reporta que QseC es un receptor bacteriano que activa genes asociados a virulencia y a su vez permite la comunicación interespecie. Freestone en el 2013 señala que en las bacterias que ocupan una variedad de nichos es común que entren en contacto con las catecolaminas. Estas hormonas se encuentran ampliamente dispersas en los reinos animal y vegetal, y si bien no se han encontrado sensores de histidina quinasa en animales, si se presentan en otros eucariotas como levaduras, hongos, plantas y protozoos. Es por ello que es posible que las bacterias como *A. seminis* sean capaces de identificar e interactuar con el estrés de su hospedero mediante la detección de las hormonas y de igual forma mediante el sensor QseC u otra proteína receptora que pueda iniciar la expresión de genes involucrados en procesos como fijación o dispersión de biopelículas.

10. CONCLUSIONES

- ◊ No se observaron efectos significativos en el crecimiento de *A. seminis*.
- ◊ Se puede observar que *A. seminis* responde a la presencia de hormonas en los patrones de proteínas, zimogramas e inmunoreconocimientos.
- ◊ La NE tuvo efecto en la formación de biopelículas de *A. seminis*.
- ◊ La presencia de hormonas indujo una dispersión de la biopelícula ya formada.
- ◊ Debido a los cambios observados en la expresión de proteínas y de biopelículas de *A. seminis* en presencia de hormonas, esta bacteria podría tener mecanismos de comunicación similares a los presentados por otros microorganismos.

11. PERSPECTIVAS

- ◆ Determinar patrones de proteínas más reproducibles.
- ◆ Identificar las proteínas que inducen la dispersión de la biopelícula de *A. seminis*.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bansal T., Englert D., Lee J., Hegde M., Wood T. K. y Jayaraman A. (2007). Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infection and Immunity*. 75(9): 4597-4607.
2. Baynes I.D. y Simmons G.C., (1960). Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*, N. Sp. *The Australian Veterinary Journal*. 36(12): 454-459.
3. Belay T. y Sonnenfeld G. (2002). Differential effects of catecholamines on *in vitro* growth of pathogenic bacteria. *Life Sciences*. 71(4): 447-456.
4. Blaschko H., Bloom F. E., Coupland R. E., Euler U. S., Furchgott R. F., Haefely W., Himms-Hagen, Holzbauer M., Kopin I. J., Kosterlitz H. W., Lees G. M., Marley E., Muscholl E., Sandler M., Sharman D. F., Smitch A. D., Stephenson J. D., Stjärne, Thoenen H., Trendelenburg U., Welsh J. H., Winkler H. (1972). Catecholamines. Springer-verlag. Berlin Heidelberg. 1051p.
5. Brandan, N. C., Llanos, B., Ruiz, D. A. N. D., & Rodríguez, A. (2010). Hormonas catecolaminas adrenales. *Cátedra de Bioquímica Facultad de Medicina*. [acceso: 4 de abril de 2015]. Disponible en: <http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/catecolaminas.pdf>.
6. Boyanova L. (2017). Stress hormone epinephrine (adrenaline) and norepinephrine (noradrenaline) effects on the anaerobic bacteria. *Anaerobe*. 44:13-19.
7. Burgess G. W. (1982). Ovine contagious epididymitis: a review. *Veterinary Microbiology*. 7: 551-575.
8. Cárdenas-Perea M. E., Cruz L. O. R., Gándara-Ramírez J. L. y Pérez-Hernández M. A. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos* 94. 35-43.
9. Casadevall A. y Pirofski L. A. (1999). Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and immunity*. 67(8):3703-3713.
10. Cebra C y Cebra M. (2012). Diseases of the hematologic, immunologic, and lymphatic systems (Multisystem Diseases). EN: Pugh D. y Baird N. *Sheep and Goat Medicine*. Saunders. 466-502 pp.

11. Clarke M. B., Hughes D. T., Zhu C., Boedeker E. C. y Sperandio V. (2006). The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103 (27): 10420-10425.
12. Craig J. (1964). The causes and control of infertility of rams. *Journal of the Department of Agriculture*. 11(3): 881-887.
13. Cross A. S. (2008). What is a virulence factor? *Critical care*. 12 (6): 196.
14. De la Cruz M. A. H. (2015). Caracterización de proteasas de *Actinobacillus seminis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tlalnepantla Edo. de México.
15. dos Santos F. A., de Azevedo E. O., de Azevedo S. S., Garino J. F., Mota R. A., de Cássia P. K. P., Gomes A. L. y Alves C. J. (2014). Isolation of *Actinobacillus seminis* from a goat with clinical epididymo-orchitis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(1): 205-208.
16. Duval F., González F. y Rabia H. (2010). Neurobiología del estrés. *Revista chilena de neuro-psiquiatria*. 48 (4): 307-318.
17. Escrivá J. J., Carbajal J. A. y Mendaza A. (2002). Endocrinología. EN: Gamundi P. C. Farmacia hospitalaria Tomo II. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. 877- 918.
18. Fredheim, EGA, Klingenberg, C., Rohde, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flægstad, T., y Sollid, JE (2009). Formación de biopelículas por *Staphylococcus haemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 47 (4), 1172-1180.
19. Freestone P. (2013). Communication between bacteria and their hosts. *Scientifica (El Cairo)*. 2013: 361073.
20. Foster R. A. (2015). Male Genital System. En: Maxie G. Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 3. 6° Edición. Saunders Ltd. 465-510 p.
21. Foster R. A. (2017). Male Reproductive System. En: Zachary J. F. y McGavin M. D. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 6° edición. Mosby. 1194-1222 p.
22. Graziano T.S., Closs P., Poppi T., Franco G.C., Cortelli J.R., Groppo F.C. y Cogo K. (2013). Catecholamines promote the expression of virulence and oxidative stress genes in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*. 49(5): 660-669.
23. Gospodarek E., Bogiel T., y Zalas-Wiecek P. (2009). Communication between microorganisms as a basis for production of virulence factors. *Polish Journal of Microbiology*. 58(3): 191-198.

24. Hajtós I., Fodor L., Glávits R. y Vargas J. (1987). Isolation and characterization of *Actinobacillus seminis* strains from ovine semen samples and epididymitis. *Journal of Veterinary Medicine, Series B.* 34(1-10): 138-147.
25. Harvey K. L., Jarocki V. M., Charles I. G. y Djordjevic S. P. (2019). The diverse functional roles of elongation factor Tu (EF-Tu) in microbial pathogenesis. *Frontiers in Microbiology.* 10: 2351.
26. Hernández-Marín J. A., Valencia-Posadas M., Ruíz-Nieto J. E., Mireles-Arriaga A. I., Cortez-Romero C. y Gallegos-Sánchez J. (2017). Contribución de la ovinocultura al sector pecuario en México. *Agroproductividad.* 10 (3):87-93.
27. Jentsch H. F. R., März D. y Krüger M. (2013). The effects of stress hormones on growth of selected periodontitis related bacteria. *Anaerobe.* 24: 49-54.
28. Jimenez-Pacheco A., Nuñez-Del Arco A. y Salas-Téllez E. (2008). Microvesicles of *Actinobacillus seminis* Show Proteolytic Activity. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 7(5): 616-619.
29. Kendall M. M., Sperandio V. (2016). What a Dinner Party! Mechanisms and functions of interkingdom signaling in host-pathogen associations, *mBio.* 7:1-14.
30. Lasa I., del Pozo J. L., Penadés R. J. y Leiva J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra.* 28 (2): 163-175.
31. Li L., Xu Z., Zhou Y., Sun, L., Liu Z., Chen H. y Zhou R. (2012). Global effects of catecholamines on *Actinobacillus pleuropneumoniae* gene expression. *PLoS One.* 7(2): 1-12.
32. López-Calderón B. A. (2005). Estrés. En: Tresguerreros J. A. F., Ariznavarreta C., Cachafeiro V., Cardinali D., Escriche E., Gil-Loyzaga P., Lahera V. J., Mora T. F., Romano P. M. y Tamargo M. J. Fisiología Humana. 3ra Edición. MCGRAW-HILL. 1097-1105 pp.
33. Lucena S., Arocha P. C. L. y Guerrero Belsy. (2007). Fibronectina. Estructura y función asociada a la hemostasia. Revisión. *Investigación Clínica.* 48(2): 249-262.
34. Marquina D. D. y Santos S. A. (2010). Sistemas de quorum sensing en bacterias. *Recursos Educativos.* 3(5):39-55.
35. March R. G. A. y Eiros B. J. M. (2013). Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Medicina Clínica.* 141(8): 353-357.

36. Martínez-Antonio A. y Soberón-Chávez G. (2002). El complejo lenguaje de las bacterias. *Ciencia*. 60-67.
37. Martínez-González K. K. (2013). Análisis de la expresión de factores de virulencia regulados por *Quorum sensing* en *Gallibacterium anatis*. Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
38. Miller M. B. y Bassler B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 55: 165-199.
39. Montes-García J. F., Martínez D. A. C., Vaca P. S., Vásquez C. C., Sánchez A. P., Xicohtencatl C. J. Trujillo-Ruiz H. y Negrete-Abascal. (2018). Identification of two adhesins of *Actinobacillus seminis*. *Small Ruminant Research*. 167: 100-103.
40. Montes-García J. F., Delgado-Tapia W. A., Vázquez-Cruz, Vaca S., Cruz-Córdova A. y Negrete-Abascal E. (2019). *Actinobacillus seminis* GroEL-homologous protein agglutinates sheep erythrocytes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 112 (11); 1655-1662.
41. Montes-García J. F., Rojas L., Zenteno E., Cruz C. V. y Abascal E. N. (2020). Characterization of *Actinobacillus seminis* biofilm formation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1-13. doi: 10.1007/s10482-020-01447-w.
42. Nazar C. J. (2007). Biofilms Bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*. 67: 61-72.
43. Nelson D. L. y Cox M. M. (2009). Regulación hormonal e integración del metabolismo de los mamíferos. En: Lehninger. Principios de Bioquímica. 5° edición. Ediciones Omega. 901-944.
44. Negrete-Abascal E., Tenorio V. R., Guerrero A. L., García R. M., Reyes M. E. y de la Garza M. (1998). Purificación y caracterización de una proteasa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, un antígeno común a todos los serotipos. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 62(3):183-190.
45. Negrete-Abascal E., Tenorio V. R. y de la Garza M. (1999). Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Current Microbiology*. 38(1): 64-67.
46. Núñez del Arco, 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.

47. Odeón M. M. y Romera S. A. (2017). Estrés en ganado: causas y consecuencias. *Revista veterinaria*. 28(1): 69-77.
48. Padgett D. A. y Glaser R. (2003). How stress influences the immune response. *TRENDS in Immunology*. 24 (8): 444-448.
49. Pierson L. S., Maier R. M. y Pepper I. L. (2009). Microbial Communication: Bacteria–Bacteria and Bacteria–Host. En: Pepper I. L., Gentry T. J. y Maier R. M. (2009). *Environmental Microbiology*. 2° Edición. Prensa Académica. 335-346 pp.
50. Petrova O. E. y Sauer K. (2016). Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Current Opinion in Microbiology*. 30: 67–78.
51. Pillai D. K., Cha E. y Mosier D. (2018). Role of the stress-associated chemicals norepinephrine, epinephrine and substance P in dispersal of *Mannheimia haemolytica* from biofilms. *Veterinary Microbiology*. 215:11-17.
52. Reyes M. E. (2018). Respuesta al estrés por hierro de *Actinobacillus seminis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tlalnepantla Edo. De México.
53. Rycroft A. N. y Garside L. H. (2000). *Actinobacillus* Species and their role in animal disease. *The Veterinary Journal*. 159(1): 18-36.
54. Roberts A., Matthews J. B., Socransky S. S., Freestone P. P. E., Williams P. H. y Chapple I. L. C. (2002). Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria in vitro. *Oral Microbiology and Immunology*. 17 (5): 296-303.
55. Rodriguez-Franco D. A., Vazquez-Moreno L. y Ramos-Clamont M. G. (2005). Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47(3-4): 102-111.
56. Sánchez Segura, Miriam, González García, René Marcos, Cos Padrón, Yanelkys, & Macías Abraham, Consuelo. (2007). Estrés y sistema inmune. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 23(2). Recuperado en 28 de abril de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892007000200001&lng=es&tlng=es.
57. Sharaff, F. F. C. S. M. (2012). The role of catecholamine stress hormones and inotropes in the promotion of bacterial growth, virulence and biofilm formation. Tesis de Doctorado. Universidad de Leicester. Leicester, Inglaterra.

58. Sarkodie E. K., Zhou S., Baidoo S. A., y Chu W. (2019). Influences of stress hormones on microbial infections. *Microbial pathogenesis*. 131: 270-276.
59. Sepúlveda C. C. y Puente P. J. (2000). Células natural killer y el sistema inmune innato en la patología infecciosa. *Revista médica de Chile*. 128 (12): 1361-1370.
60. Sneath P. y Stevens M. (1990). *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* Spa nov. , noma rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nova, *Pasteurella mairi* sp. nova, and *Pasteurella tvehalosi* Spa nova. *International journal of systematic bacteriology*. 40 (2):148-153.
61. Taira C. A., Carranza A., Bertera F. y Höcht C. (2013). Catecolaminas síntesis metabolismo. Receptores adrenérgicos y dopaminérgicos. En: Gómez L. H. y Piskorz D. (2013). Hipertensión Artesanal, epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica. 1° edición. Ed. Inter-Médica. 94-98.
62. Vadakkan K., Choudhury A. A., Gunasekaran R., Hemapriya J. y Vijayanand S. (2018). Quorum sensing intervened bacterial signaling: Pursuit of its cognizance and repression. *Jornal of Genetic Engineering and biotechnology*. 16 (2): 239-252.
63. Walters M., Sircili M. P y Sperandio V. (2006). AI-3 Synthesis Is Not Dependent on *luxS* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 188 (16): 5668-5681.
64. Walters M. y Sperandio V. (2006). Autoinducer 3 and Epinephrine Signaling in the Kinetics of Locus of Enterocyte Effacement Gene Expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 74 (10): 5445-5455.
65. Weil P. A. (2013). La diversidad del sistema endocrino En: Murray R. K., Bender D. A., Botham K. M., Kennelly P. J., Rodwell V. W. y Weil P. A. (2013). Harper Bioquímica ilustrada. 29° edición. McGraw Hill. 478-497.
66. Weigel W. A. y Demuth D. R. (2016). QseBC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in *Enterobacteriaceae* and *Pasteurellaceae*. *Molecular Oral Microbiology*. 31(5): 379-397.
67. Whitehead N. A., Barnard A. M., Slater H., Simpson N. J., y Salmond G. P. (2001). Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 25(4): 365-404.