



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO DE CATECOLAMINAS EN *Gallibacterium anatis*
12656-12 MUTANTE EN *QseC***

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

MORA NORIEGA FRANCISCO JAVIER

DIRECTOR DE TESIS

DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2021



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 proyecto se llevó a cabo en el
laboratorio de genética de la Unidad de
Morfofisiología y Función (FES Iztacala),
apoyado por PAPIIT IN219919

Dedicatoria

A mis padres Francisco e Irene por siempre buscar lo mejor para mi y mi hermano, gracias por tanto amor, apoyo y todo lo que nos han brindado, no hay suficientes palabras para agradecerles todo. Este logro, así como los que he tenido y tendré, es por y para ustedes. Espero enorgulleclos, así como ustedes me enorgullecen.

A Gabriel, aunque seamos como la mayoría de los hermanos y "peleemos" a cada rato siempre es bueno tener tu compañía y apoyo.

A Esmeralda muchas gracias por tantos años de compañía, por tu apoyo, cariño, sé que lograremos todos nuestros objetivos y espero que sigamos compartiendo todo. "I want her everywhere and if She's beside me I know I need never care".

"It is not our abilities that show what we truly are. It is our choices" - Albus Dumbledore

Agradecimientos

Al Dr. Sergio Vaca (Q.E.P.D.) por abrirme las puertas del laboratorio, un gran maestro y mejor persona.

Al Dr. Erasmo por aceptarme como su alumno, su tiempo y ayuda, así como la convivencia que tuvimos.

A las Doctoras Gloria Luz Paniagua, Martha Ofelia Salcedo, Alina Uribe García y al maestro Juan Fernando Montes García por su asesoría, tiempo y consejos en la realización de este trabajo.

A los compis del lab, Pam, Diana, Isa, Ivan (Goku), Cesar, Angel “El hermano” Fer y la Dra. Alina, gracias por su apoyo, toda la convivencia que tuvimos y la buena onda.

Al mejor equipo, compañeros y amigos de la carrera, Brenda, Jess, Naye, Barreto, Paco, Raz y Vic. Gracias por todos los buenos momentos, risas y aprendizajes, son los mejores.

A Viry, por siempre estar cuando te necesito, por los buenos momentos, gracias, querida amiga.

*You don't need anybody to tell you who you are or what you are.
You are what you are! - Jhon Lennon*

Contenido

Resumen.....	1
Introducción	2
Familia <i>Pasteurellaceae</i>	2
Género <i>Gallibacterium</i>	2
<i>Gallibacterium anatis</i>	2
Factores de virulencia reportados en <i>G. anatis</i>	3
Biopelículas.....	4
Regulación de la expresión génica	5
Moléculas autoinductoras.....	6
Clasificación de los sistemas de quorum sensing.....	6
Catecolaminas como moléculas señalizadoras.....	7
Sistemas de dos componentes (SDC).....	8
Histidina quinasa (HK).....	8
Proteína reguladora de respuesta (RR).....	9
Mecanismo de acción de las HKs	9
Importancia de los sistemas de dos componentes	10
QseC.....	11
Importancia del hierro en las bacterias.....	12
Antecedentes	13
Justificación.....	15
Objetivos	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares.....	16
Materiales y métodos	17
Cepas	17
Tratamientos.....	17
Efecto de catecolaminas y sus combinaciones con FeCl ₃ en el crecimiento de <i>G. anatis</i>	17
Obtención de proteínas de membrana externa (OMP's) y extractos totales (ET).....	18
Obtención de proteínas secretadas (PS)	18
Electroforesis (SDS-PAGE).....	19
Inmunoreconocimiento (Western Blotting).....	19
Actividad proteolítica.....	19
Formación de biopelícula.....	20
Resultados	21

Efecto de catecolaminas y sus combinaciones con FeCl ₃ en el crecimiento de <i>G. anatis</i> 12656-12 y 12656-12 Ω <i>qseC</i>	21
Patrones de proteínas, actividad proteolítica y patrones de inmunoreconocimiento de <i>G. anatis</i> 12656-12 y 12656-12 Ω <i>qseC</i> adicionando E, N, FeCl ₃ y sus combinaciones.....	22
Efecto de catecolaminas y FeCl ₃ en la formación de biopelícula de <i>G. anatis</i>	28
Discusión.....	29
Conclusiones	35
Perspectivas.....	36
Bibliografía	37

Resumen

Gallibacterium anatis es una bacteria patógena, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*, causante de diversas lesiones en aves, por ejemplo: septicemia, peritonitis, atrofia folicular, alteraciones en la formación, tamaño y producción de huevos, entre otras. *G. anatis* cuenta con diversos factores de virulencia, destacando la producción de toxinas, proteasas y la capacidad de formar biopelículas. La regulación de los factores de virulencia se da mediante un proceso de comunicación celular denominado Quorum sensing o percepción del quorum, este proceso se lleva a cabo cuando se producen, secretan y posteriormente se detectan moléculas señalizadoras (autoinductores). En el presente estudio se realizó la caracterización parcial del sistema de dos componentes QseC, sistema capaz de detectar al autoinductor 3, epinefrina (E) y norepinefrina (N), usando la cepa 12656-12 de *G. anatis* y su mutante en el gen *qseC*. Al evaluar el crecimiento de *G. anatis* se observó que la presencia de E o N no muestra diferencias significativas en ambas cepas, en la cepa mutante el crecimiento se ve favorecido al añadir N+FeCl₃. Observando los patrones de proteínas e Inmunoreconocimientos de las diferentes fracciones evaluadas, el FeCl₃, E, N y sus respectivas combinaciones provocan cambios en la expresión proteica de ambas cepas. Adicionando FeCl₃, E, E+FeCl₃ se favorece la actividad proteolítica de la cepa silvestre, en el caso de la mutante la N es la que causa este efecto. En la cepa 12656-12 la formación de biopelícula es menor al agregar FeCl₃ o N+FeCl₃, pero si se añade N esta producción incrementa, mientras que, en la cepa mutante la E y su combinación con FeCl₃ favorecen la producción de la biopelícula. Los cambios provocados en *G. anatis* sugieren que QseC cumple una importante función en la percepción y respuesta de estímulos, participando en la regulación de proteasas y formación de biopelículas. Se sugiere que las catecolaminas evaluadas podrían actuar como moléculas señalizadoras y como sideróforos.

Introducción

Familia *Pasteurellaceae*

La familia *Pasteurellaceae* incluye 38 especies propiamente clasificadas en adición a otras 24 que aún no han sido clasificadas correctamente. Muchas especies de la familia *Pasteurellaceae* son de gran importancia económica debido al impacto comercial dado que se consideran como patógenos potenciales, primarios o comensales (Christensen & Bisgaard, 2008).

Género *Gallibacterium*

Kjos-Hansen en 1950 aisló una bacteria de la cloaca de pollos sanos, por sus similitudes al género *Pasteurella* fue inicialmente nombrada *Pasteurella anatis*. A partir de una reclasificación tomando en cuenta las secuencias 16s de ARNr Bisgaard en 1982 nombro por primera vez a *Gallibacterium* como un nuevo género en la familia (Singh, *et al.*, 2016). En este género se agrupan las especies bacterianas: *G. anatis* biovar hemolítico y anatis, *G. melopsittací*, *G. salpingitidis*, *G. trehalosifermentans* y las genomospecies 1, 2 y 3 (Martínez, 2013).

Gallibacterium anatis

Gallibacterium anatis puede ocasionar pérdidas económicas a la industria avícola debido a que es causante de diversas afecciones en aves entre las que encontramos: lesiones como atrofia folicular, ooforitis, septicemia, folículos deformes, peritonitis, enteritis, edema en el tracto respiratorio, salpingitis, agrandamiento en los riñones, además de alteración en la formación del cascarón, tamaño y disminución en la producción de huevo (Osuna, *et al.*, 2017).

Factores de virulencia reportados en *G. anatis*

Se han reportado diversos factores de virulencia en *G. anatis* como: las vesículas de membrana externa, la cápsula, los elementos conjugativos e integrativos (ICEs), las pequeñas colonias variantes (SCVs), las fimbrias (F17), las metaloproteasas capaces de degradar IgG aviar, las toxinas RTX y GtxA responsables de la actividad β -hemolítica y de la evasión de la respuesta inmune respectivamente además de la capacidad de formar las biopelículas (Persson & Bojesen, 2015).

- Vesículas de membrana externa (OMVs): virtualmente se presentan en todas las bacterias Gram negativas, son estructuras complejas con gran cantidad de funciones, en *G. anatis* se ha demostrado que la producción de OMVs *in vitro* se ve altamente influenciada por las condiciones de crecimiento (Bager, *et al*, 2013). Las OMVs tienen diversas funciones en las bacterias, se encargan de diseminar los productos bacterianos e interactuar con el ambiente, en bacterias patógenas, las OMVs pueden participar en la adherencia, en la adquisición de nutrientes e inclusive participar en la eliminación de agentes que dañen a la bacteria (Kulp & Kuehn, 2010).
- Pequeñas colonias variantes (SCVs por sus siglas en inglés): Han sido reportadas en varios géneros de bacterias, como su nombre lo indica las SCVs se caracterizan por ser hasta diez veces más pequeñas, se cree que las SCVs pueden ser causantes de infecciones persistentes, causar la resistencia contra antibióticos e inclusive ser partícipes en el transporte de electrones (Proctor, *et al*, 2006). En *G. anatis* se ha reportado la presencia de SCVs principalmente en cultivos primarios (Persson & Bojesen, 2015).
- Fimbrias: *G. anatis* F149^T es capaz de expresar fimbrias, las cuales contribuyen a la adhesión y pueden ser importantes para la colonización

del tracto respiratorio, los genes encargados de codificar fimbrias también se pueden encontrar en el genoma de la cepa 12656-12 (Lucio, *et al*, 2012). En la cepa 12656-12 de *G. anatis* se han caracterizado fimbrias expuestas a la superficie compuestas de la proteína FlfA, estas fimbrias son similares a las F17 (Bager, *et al*, 2013).

- Metaloproteasas capaces de degradar IgG aviar: *G. anatis* puede secretar proteasas, una de ellas con un peso molecular aproximado de 100 kDa, la cual es capaz de degradar IgG de pollo después de ser incubada por 24h (García-Gómez, *et al*, 2005).

- Toxinas: El biovar hemolítico de *G. anatis* produce la citotoxina GtxA, perteneciente a la familia de toxinas RTX, la cual es responsable de la actividad hemolítica y leucotóxica (Kristensen & Bojesen, 2011).

Biopelículas

Las biopelículas son comunidades de microorganismos que crecen agregados y se rodean por una matriz extracelular compuesta por proteínas, ADN extracelular y exopolisacáridos. La matriz extracelular otorga a los microorganismos embebidos en ella la capacidad de evadir la respuesta inmune del huésped, así como inducir la respuesta inflamatoria crónica (Ortega-Peña & Hernández-Zamora, 2018).

La biopelícula además de proporcionar protección les permite a las bacterias tener un "sistema circulatorio primitivo", es decir, posee un sistema de canales que sirven como vínculo con el medio exterior para realizar intercambios de nutrientes y eliminación de metabolitos de desecho (Betancourth, *et al*, 2004).

El proceso de formación de biopelículas se puede dividir en 3 fases:

1. Adhesión: la bacteria utiliza Pili o flagelos y adhesinas para llegar a una superficie adecuada, donde se llevará a cabo la adsorción reversible y posteriormente la adhesión irreversible. Los sustratos con superficies

- ásperas, hidrofóbicas, con temperatura adecuada y concentraciones de nutrientes necesarios para la bacteria facilitan la adhesión (Nazar, 2007).
2. Crecimiento: después de la adhesión se lleva a cabo la multiplicación celular, extendiéndose alrededor del sitio de unión, se comienza a formar una microcolonia, cuando las células superan el umbral de concentración, las bacterias comienzan a secretar un exopolisacárido que constituirá la matriz de la biopelícula y formará estructuras parecidas a setas donde se pueden apreciar canales. La composición del exopolisacárido es variable entre los microorganismos, por ejemplo, alginato (*Pseudomonas aeruginosa*), celulosa (*Salmonella typhimurium*), poly-N-acetilglucosamina (*Staphylococcus aureus*) y exopolisacáridos ricos en glucosa y galactosa (*Vibrio cholerae*). Además, la composición del exopolisacárido se ve influenciada por las condiciones ambientales en las que se encuentre la bacteria (Lasa, *et al*, 2005).
 3. Separación o dispersión: Esta estrategia permite a la bacteria escapar y colonizar nuevos nichos cuando los nutrientes, entre otros recursos esenciales, se vuelven limitados o cuando los productos de desecho se acumulan. Existen diferentes mecanismos para que una biopelícula se disperse, por mencionar algunos: detener la síntesis de los componentes de la matriz, degradar la matriz e interrumpir las interacciones entre sus componentes (Solano, *et al*, 2014).

Regulación de la expresión génica

Las bacterias Gram negativas se comunican a través de las moléculas autoproducidas (autoinductores), las cuales son secretadas al ambiente y su concentración es dependiente de la densidad poblacional. A este proceso de comunicación se le conoce como Quorum sensing (QS) (Badía, 2011).

El QS regula diversos procesos fisiológicos incluidos la transformación genética, la esporulación y la bioluminiscencia, entre otros, además de la expresión de factores de virulencia tales como: los factores de adherencia, la producción de toxinas, los sistemas de secreción y la formación de

biopelículas. Este proceso se realiza mediante la producción, la secreción y posteriormente la detección de moléculas autoinductoras las cuales se difunden y entran con facilidad a las membranas celulares, las células que reaccionan a estas señales poseen reguladores transcripcionales que modulan la expresión genética (Plottinger, *et al*, 2017).

Moléculas autoinductoras

Existen 3 tipos de moléculas autoinductoras; en las bacterias Gram negativas las homoserina lactonas (HSLs) son producidas por las LuxI sintetetas. En las bacterias Gram positivas los oligopéptidos requieren para su síntesis la expresión de genes codificantes de péptidos precursores, estos son procesados, modificados y exportados mediante sistemas de flujo de tipo ABC. Para la comunicación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas intra e inter-especies tenemos al furanosil borato diéster mejor conocido como AI-2, cuya síntesis requiere de la proteína LuxS (Barreto & Retamal, 2016).

Los criterios que deben cumplir estas moléculas son: a) acumularse en el ambiente extracelular y ser reconocidas por moléculas receptoras en la superficie celular, b) su producción se debe llevar a cabo durante etapas específicas de crecimiento o en respuesta a cambios en el ambiente, c) su acumulación por encima del umbral de concentración debe provocar una respuesta celular más allá de los cambios fisiológicos necesarios para metabolizar o detoxificar la molécula (March & Eiros, 2013).

Clasificación de los sistemas de quorum sensing

Usando las moléculas autoinductoras como base de los sistemas de QS se pueden clasificar en:

- Sistemas de QS con un autoinductor: son sistemas sencillos y los primeros en ser estudiados, cuyo modelo más representativo es la bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*.
- Sistemas de QS con dos o más autoinductores: son los más frecuentes, donde encontramos dos tipos de funcionamiento que son los sistemas

cooperativos, en los cuales la acción de distintas moléculas tiene una acción positiva sobre los mismos y los sistemas competitivos donde las moléculas autoinductoras tienen efectos antagónicos en el proceso que es regulado, estos últimos regulan las rutas alternas en el organismo (Díaz & Sen, 2010).

Catecolaminas como moléculas señalizadoras

Las catecolaminas se derivan de la tirosina, generalmente se encuentran como transmisores sinápticos tanto en vertebrados como en invertebrados. 3 catecolaminas también funcionan como hormonas en vertebrados: epinefrina (E) conocida como adrenalina, norepinefrina (N) también llamada noradrenalina y dopamina (Hill, *et al*, 2012).

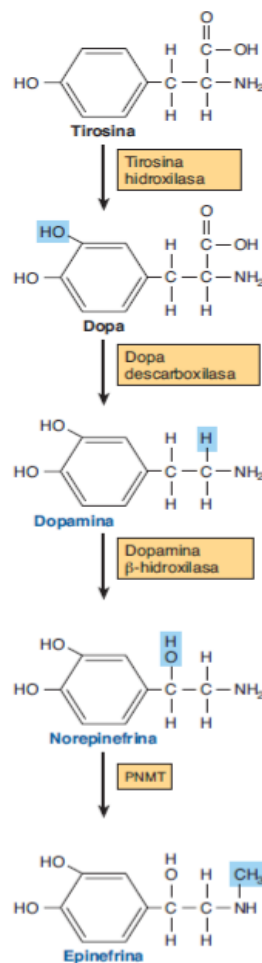


Fig. 1 Biosíntesis de catecolaminas a partir de tirosina (Weil, 2013).

La epinefrina es sintetizada por las células cromafines de la medula suprarrenal y constituye alrededor del 80% de las catecolaminas presentes, mientras que la mayoría de la norepinefrina presente en órganos inervados por nervios simpáticos se sintetiza *in situ*; ambas pueden ser producidas y almacenadas en diferentes células en la medula suprarrenal y en tejidos cromafines (Weil, 2013).

En años recientes se ha descubierto que algunas bacterias patógenas son capaces de detectar y responder a hormonas liberadas por el hospedero incluyendo catecolaminas que son neurotransmisores y juegan un rol importante en la respuesta al estrés, por ejemplo, la epinefrina y la norepinefrina (Intarak, *et al*, 2014).

Sistemas de dos componentes (SDC)

Los sistemas de 2 componentes (SDC) se encuentran en las bacterias, las arqueas, los hongos, los mohos mucilaginosos y las plantas. En estos sistemas se involucran las histidinas quinasa, que pueden presentar proteínas transportadoras de fósforo, y un regulador de respuesta (Binder, *et al*, 2018).

Histidina quinasa (HK)

Las HKs poseen 3 dominios que cumplen diferentes funciones.

El dominio sensor donde se encuentra un dominio N-terminal expuesto al periplasma que detecta estímulos ambientales. El dominio de dimerización donde se fosforila un residuo de histidina conservando un grupo fosfato y el dominio catalítico (dominio catalítico de unión a ATP) es un núcleo catalítico citoplasmático de quinasa fundamental para la actividad enzimática (Galicia-Jiménez, *et al*, 2017).

Proteína reguladora de respuesta (RR)

La proteína reguladora de respuesta posee 2 dominios:

El dominio receptor que contiene un residuo de aspartato conservado, que recibirá el grupo fosfato proveniente de la histidina quinasa y el dominio efector, generalmente asociado a un factor transcripcional, que al activarse induce o reprime la expresión genética (Álvarez & Georgellis, 2016).

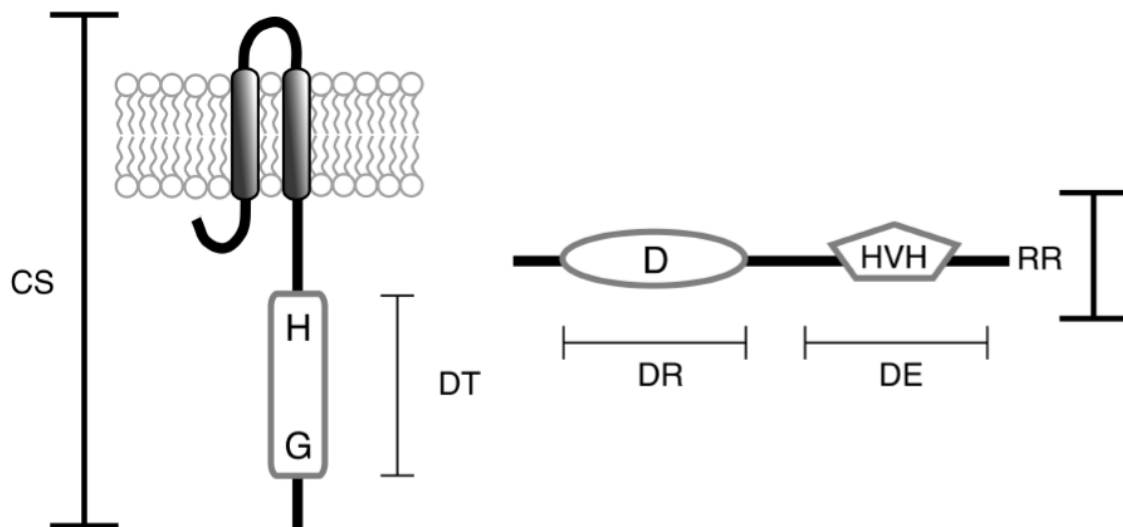


Fig. 2 Esquema típico de una histidina quinasa, CS (quinasa sensora) DT. (dominio transmisor) con un residuo de histidina (H), caja G importante para la unión del ATP (G) y su proteína reguladora de respuesta (RR), DR (dominio receptor) con un residuo de aspartato (D) y DE (dominio efector) con un sitio de unión al ADN (HVH) (Barba-Ostria, 2014).

Mecanismo de acción de las HKs

La señalización de los sistemas de dos componentes consiste en general de 4 pasos, inicialmente la histidina sensora quinasa se autofosforila por medio del residuo de histidina en el dominio transmisor, el grupo fosfato es transmitido a un aspartato en el regulador de respuesta, después el regulador de respuesta fosforilado interactúa con genes o proteínas desencadenando la respuesta

celular, finalmente el regulador de respuesta es desfosforilado por medio de la actividad autofosfatasa intrínseca o inducida por la HK (Casino, *et al*, 2009).

Importancia de los sistemas de dos componentes

Se ha reportado que los SDC participan en la virulencia de un gran número de bacterias, siendo afectados por señales o condiciones ambientales como pueden ser la concentración de iones, pH, osmolalidad, disponibilidad de oxígeno y sales biliares, entre muchos otros (Calva & Oropeza, 2006).

Se han identificado alrededor de 4000 SDC en 145 genomas bacterianos y se descubrió que mientras mayor sea el genoma existe mayor número de SDC. Se sugiere que las bacterias cuyo metabolismo es más versátil suelen presentar más SDC, probablemente por la adaptación que tuvieron como patógenos, y bacterias simbióticas en nichos dentro de un huésped humano o animal. La señalización en estos sistemas exige diferentes niveles de complejidad, por ejemplo, cuando varios sistemas integran una misma red de regulación. En *Salmonella* y *Staphylococcus* la participación de los SDC ha sido eficazmente caracterizada, se sabe que existe una sofisticada interacción de SDC y otros mecanismos adicionales para el control de la expresión de los factores de virulencia en las diferentes etapas de infección (Beier & Gross, 2006).

En el cuadro 1 se pueden observar algunos ejemplos de SDC, los estímulos que reciben y las funciones en las que participan.

Sistema	Función	Molécula señalizadora
ArcB/ArcA	Detección de oxígeno y estados redox	Las quinonas que reflejan el estado redox
NarX/NarL	Respiración de nitritos y nitros	Nitrato, nitrito
CitA/CitB	Transporte y metabolismo anaerobio del citrato	Citrato
CheA/CheY	Quimiotaxis	Quimioatrayentes, serina y aspartato
FixL/FixJ	Fijación del nitrógeno	Oxígeno, Dióxido de carbono, Monóxido de nitrógeno
LovK/LovR	Fijación de las células bacterianas	Luz azul
TodS/TodT	Degradación de derivados de benceno	Compuestos monoaromáticos
NtrB/NtrC	Utilización de nitrógeno	2-cetoglutarato, glutamina
KdpD/KdpE	Suministro de potasio	Potasio
VanS/VanR	Antibióticos	Vancomicina
EnvZ/OmpR	Osmolaridad	?
KinB/Spo0F	Esporulación	ATP como señal secundaria
BvgS/BvgA	Virulencia	Temperatura, iones sulfato, ácido nicotínico
LuxQ/LuxO	Quorum sensing	Autoinductor 2
DesR/DesK	Modificación de lípidos	Temperatura

Cuadro 1. Sistemas de dos componentes, sus respectivas las funciones y las moléculas señalizadoras (Krell, *et al*, 2010).

QseC

En mamíferos, la E y la N, son reconocidas por receptores adrenérgicos, los cuales son parte de la familia de receptores acoplados a proteína G. En bacterias existen análogos usualmente anclados a la membrana pertenecientes a la familia de las histidinas quinasas (Moreira & Sperandio, 2016).

QseBC es un sistema de 2 componentes que se basa en QS, es decir, censa señales del AI-3 e incluso es capaz de captar hormonas como epinefrina y norepinefrina. QseC es una proteína transmembranal crucial para la señalización entre diferentes reinos que fosforila a su regulador de respuesta QseB, el cual, se encarga de controlar la expresión de genes asociados a virulencia (He, *et al*, 2018).

En *Escherichia coli* enterohemorrágica la señalización inicia cuando se percibe un estímulo, ya sea E, N o el autoinductor 3, por medio de QseC provocando su autofosforilación y la comunicación con su regulador de respuesta QseB, aunque también puede fosforilar QseF (que es el RR de QseE y participa en la polimerización de la actina y formación de lesiones de unión y rasurado), KdpE (importante en la regulación de potasio y osmolaridad) y stx2A (encargada de regular la toxina Shiga) (Hughes, *et al*, 2009).

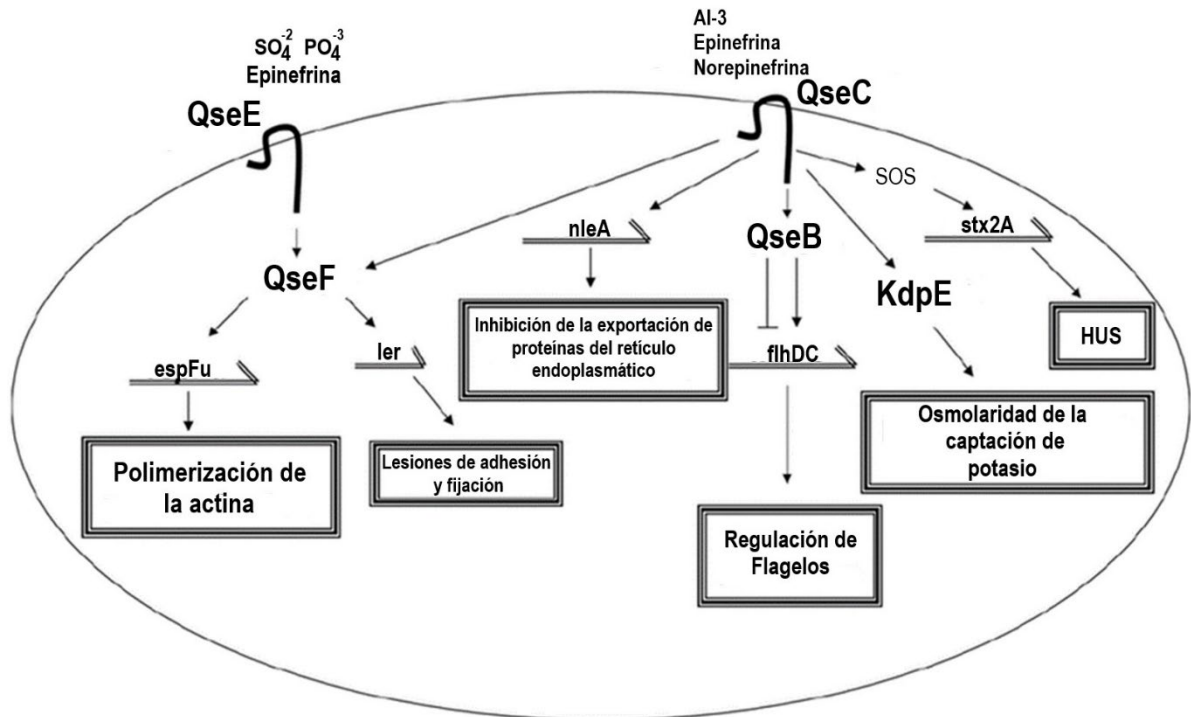


Figura 3. Cascada de señalización en *E. coli* enterohemorrágica iniciada por la percepción de estímulos en histidina quinasa (QseE y QseC), las flechas indican las interacciones que pueden ocurrir, destacando los reguladores de respuesta (QseF y QseB respectivamente) (Hughes, *et al*, 2009).

Importancia del hierro en las bacterias

El hierro es el 4° elemento más abundante en la tierra y es necesario para la mayoría de los organismos, siendo el hierro ferroso Fe^{+2} y el hierro férrico Fe^{+3} los estados en los que este se presenta; el hierro férrico es el predominante en ambientes oxigenados, mientras que el hierro ferroso es el dominante en ambientes carentes de oxígeno (Zughaier & Cornelis, 2018).

A pesar de ser un elemento abundante, su disponibilidad es escasa, la presencia de moléculas como transferrina y lactoferrina, que poseen una alta afinidad al hierro, mantienen regulada la disponibilidad de hierro libre en el organismo, se ha reportado que estas moléculas pueden disminuir el crecimiento bacteriano (Bullen, *et al*, 1978). La presencia de ferritina no es exclusiva de animales, tanto plantas, hongos y bacterias sintetizan sus propias

ferritinas que difieren en cuanto a su estructura química, pero cumplen funciones similares. Además, las bacterias sintetizan compuestos altamente afines al hierro, estos compuestos son conocidos como sideróforos y se encargan de tomar el hierro de proteínas como la transferrina y la ferritina (Ratledge & Dover, 2000).

El hierro es un nutriente esencial para la proliferación y metabolismo de casi todos los microorganismos además puede actuar como cofactor de diversos procesos metabólicos y enzimáticos. La capacidad de un microorganismo para captar hierro es indispensable para sobrevivir y provocar enfermedades, por ejemplo, *Listeria monocytogenes* en presencia de altas concentraciones de hierro aumenta la predisposición a ser infecciosa (Carroll & Hobden, 2016).

Antecedentes

1. En 2013 Martínez evaluó el efecto de adicionar sobrenadantes libres de células, E, N y medio DMEM condicionado (en contacto con células MCF7 durante 24h) en la formación de biopelícula, crecimiento y expresión proteica de *G. anatis* cepas F149^T (no hemolítica) y 12656/12 (hemolítica). Encontrando una disminución en crecimiento y formación de biopelícula cuando se añaden los distintos sobrenadantes y el medio condicionado en ambas cepas, por otra parte, la adición de E o N incrementa el crecimiento solo en la cepa 12656/12; la formación de biopelícula se vio favorecida en las 2 cepas en presencia de ambas hormonas. De igual manera, la presencia de hormonas afecta la expresión proteica. Además, determino la presencia del gen *luxS* en ambas cepas, responsable de producir un AI y probablemente implicado en la regulación del crecimiento, expresión de factores de virulencia y formación de biopelícula.
2. López-Ochoa y col. en 2019, generaron un vector de integración para *G. anatis* a partir de los plásmidos pOV de *Pasteurella multocida* y pBluescript II KS(-). Este vector permite la generación de mutantes en genes específicos de *G. anatis*, interrumpidos por un cartucho de resistencia a estreptomicina, proveniente del plásmido pOV, a través de

una recombinación homóloga. Mediante la amplificación por PCR inverso, se amplificaron los genes *qseC* y *luxS* clonados en el plásmido pBluescript II KS(-). Los genes *qseC* y *luxS* fueron interrumpidos ligando el cartucho de resistencia a estreptomicina; esta construcción fue utilizada para genera así mutantes por recombinación homóloga.

Estudios previos han demostrado que la presencia de epinefrina y norepinefrina pueden ser un factor importante en la regulación de los factores de virulencia y de crecimiento. Se han realizado diversos estudios relacionados con QseC, teniendo como modelo *Escherichia coli*.

3. Rooks y colaboradores en 2017 obtuvieron una mutación en QseC de *E. coli* (LF82) observando una disminución en la expresión de genes en el regulón flagelar (*flhDC*) así como genes implicados en el ensamblaje y motilidad (*fliA*, *fliC* y *motB*) causando una reducción o una completa pérdida de los flagelos en $\Delta qseC$. También evaluaron el efecto de la N en la expresión flagelar dando como resultado que al agregar N se incrementa la producción de flagelos en la cepa silvestre, pero no en la mutante. Por último, se demostró que *qseC* interviene en la expresión del sensor *qseE* (una vía alterna para la captación de N) que se ve reducida en la mutante $\Delta qseC$ aun en presencia de N.
4. Weigel y col. en 2015 utilizaron como modelo de estudio *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* para evaluar el efecto de catecolaminas (E o N [50µM]), hierro (FeCl₃ o FeCl₂ [100µM]) y sus combinaciones en la inducción de *ygiW-qseBC* (estos genes se expresan de manera conjunta). La bacteria fue crecida en medio químicamente definido (CDM). La adición de hormonas con hierro aumento casi 5 veces la actividad de *lacZ* (β-galactosidasa) en comparación al control. Además, reportaron que QseC estimula la expresión de genes involucrados en el metabolismo anaerobio permitiendo que el organismo pueda crecer en ambientes anaerobios del hospedero e inclusive QseBC facilita la adquisición de hierro a partir de la lactoferrina.

La caracterización de la cepa de *G. anatis* mutante en el gen *qseC* no ha sido realizada

Justificación

En la actualidad la resistencia que presentan las bacterias a antimicrobianos es uno de los principales problemas en cuestiones de salud, por lo cual, diversas investigaciones se han centrado en conocer los mecanismos y causas que hacen posible esta resistencia (Serra, 2017).

Uno de estos mecanismos es la regulación de los factores de resistencia a antimicrobianos mediante SDC. Por ejemplo, la resistencia a vancomicina en *Enterococcus faecium* (VanS/VanR), *E. coli* (VanSa/VanRa) y *S. aureus* (VraR/VraS). La resistencia a penicilina y cefotaxima en *Streptococcus pneumoniae* es mediada por CiaH/CiaR. En *S. typhimurium* el sistema PhoQ/PhoP interviene en la resistencia a polimixina B (Matsushita & Janda, 2002).

En años recientes la inhibición del quorum (Quorum quenching) ha sido motivo de controversia como una de las posibles alternativas a usar en el futuro, los inhibidores de QS usados tratan de atenuar la virulencia bacteriana mediante diversos blancos de acción, HSLs en células Gram negativas y diversos péptidos autoinductores en Gram positivas (Cárdenas, *et al*, 2018), en ambos casos, el uso de estos inhibidores genera discusión, por lo cual, la investigación debe ampliarse para ser considerados como métodos efectivos y seguros.

La especificidad de los SDC es uno de los factores más atractivos para lograr la inhibición del QS, el presente estudio podría permitir el conocer la regulación de diversos factores de virulencia asociados a QseC en *G. anatis* y la inhibición de QseC podría permitirnos entender su participación en la patogénesis de *G. anatis*.

Objetivos

Objetivo general

- Determinar los efectos de catecolaminas y FeCl_3 en *G. anatis* 12656-12 y 12656-12 $\Omega qseC$

Objetivos particulares

- Evaluar el crecimiento de *G. anatis* 12656-12 y 12656-12 $\Omega qseC$ en presencia de E o N y sus combinaciones con FeCl_3
- Obtener patrones de proteínas de *G. anatis* 12656-12 y 12656-12 $\Omega qseC$ en presencia de E o N y sus combinaciones con FeCl_3
- Observar la actividad proteolítica de *G. anatis* 12656-12 y 12656-12 $\Omega qseC$ en presencia de E o N y sus combinaciones con FeCl_3
- Obtener pruebas inmunogénicas de los patrones de proteínas de *G. anatis* 12656-12 y 12656-12 $\Omega qseC$ en presencia de E o N y sus combinaciones con FeCl_3
- Determinar la formación de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 y 12656-12 $\Omega qseC$ en presencia de E o N y sus combinaciones con FeCl_3

Materiales y métodos

Cepas

En el presente estudio se utilizaron las cepas del biovar hemolítico (12656-12) y su mutante en el gen *qseC* (12656-12 Ω *qseC*), para su conservación se utilizaron placas de agar infusión cerebro corazón (BHI) adicionado con sangre de borrego al 5%.

Tratamientos

1. Control (Sin adiciones)
 2. FeCl_3
 3. Epinefrina (E)
 4. Epinefrina + FeCl_3
 5. Norepinefrina (N)
 6. Norepinefrina + FeCl_3
- Las concentraciones utilizadas fueron:
E y N (50 μM)
 FeCl_3 (100 μM)

Efecto de catecolaminas y sus combinaciones con FeCl_3 en el crecimiento de *G. anatis*

Para evaluar los efectos en el crecimiento de *G. anatis* en presencia de catecolaminas y FeCl_3 ambas cepas se crecieron en tubos con 3mL de caldo soya tripticaseína (TSB) en agitación a 180 rpm durante 24h a 37°C. Este precultivo se usó para inocular tubos con 3mL de caldo TSB al 1%; al alcanzar la densidad óptica de 0.1 se añadían FeCl_3 , E, N y sus combinaciones para volverlas a incubar, cada hora se realizaron lecturas de densidad óptica a 600nm.

Obtención de proteínas de membrana externa (OMP's) y extractos totales (ET)

Para la obtención de las muestras se realizó un precultivo de ambas cepas crecidas en caldo TSB por 24h a 37°C, posteriormente con este precultivo se inocularon al 1% matraces con 100mL de caldo TSB, cuando estos alcanzaban una densidad óptica de 0.1 se les añadió FeCl₃, E, N y sus combinaciones para después incubarlos en agitación durante 24h a 37°C.

Los cultivos celulares fueron centrifugados a 10500 rpm durante 25 min, la pastilla celular se resuspendió en HEPES-lisozima 10mM pH 7.4 y se dejó incubar 1h a 37°C, luego de ser incubadas las células se rompieron por sonicación durante 4 min en ciclos de 15 seg y 10 seg de descanso, a continuación, las células se centrifugaban por 3 min a 13000 rpm. Las células no lisadas se desechaban y 100 µL del sobrenadante se guardaban (fracción de extractos totales), el resto del sobrenadante se centrifugo 30 min a 13000 rpm.

La pastilla fue resuspendida en HEPES 10mM pH 7.4 y HEPES 10 mM pH 7.4 con 2% de tritón X-100 y se dejaron en incubación por 1h, después se centrifugo 30 min y se separaron las fracciones en proteínas solubles en tritón (sobrenadante) y OMP's (pastilla), estas últimas se resuspendieron en PBS. Las muestras se conservaron en refrigeración.

Obtención de proteínas secretadas (PS)

El sobrenadante libre de células fue precipitado con sulfato de amonio al 60% de saturación toda la noche en refrigeración, las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación a 10500rpm por 25 min, la pastilla se resuspendió en PBS y las muestras se mantuvieron en refrigeración.

Electroforesis (SDS-PAGE)

Para observar los efectos de las catecolaminas y FeCl_3 en la expresión proteica de *G. anatis* de las fracciones antes mencionadas, a las que se les añadió Buffer de muestra 6X y β -mercaptoetanol al 5%, fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% a 90V durante 100 min. Los geles se tiñeron en una solución de azul de coomassie 0.1%, metanol 40% y ácido acético 10% y se destiñeron en ácido acético al 10%.

Inmunoreconocimiento (Western Blotting)

Con el fin de determinar si los cambios en los patrones de proteínas también representaban cambios en patrones de inmunoreconocimiento, se hicieron separaciones electroforéticas de las muestras en geles de poliacrilamida al 10 % para después transferirlos a una membrana de nitrocelulosa (300 mA durante 70 min). La membrana se bloqueó con caseína (1%) y PBS-TWEEN (0.5%) por 1h en agitación a 37°C, se le dieron 3 lavados (10 min cada uno) con PBS-TWEEN (0.5%), al terminar los lavados se colocaron en agitación durante 4h con un anticuerpo primario (suero de aves infectadas con *G. anatis* 1:500), se volvieron a realizar 3 lavados y se le añadió anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-pollo marcado con peroxidasa) dejándolo en refrigeración 1 noche. Se le dieron 3 lavados más con PBS-TWEEN (0.5%) y se puso a interaccionar con una solución de ácido fosfórico 10 mM pH 7.4 que contenía Diaminobenzidina, cloruro de níquel, cloruro de cobalto y 30 μL de peróxido de hidrógeno.

Actividad proteolítica

A las muestras de OMP's y ET se les añadió buffer de muestra 6X y fueron separadas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al

10% co-polimerizado con gelatina porcina al 0.1%. Al terminar la separación, el gel se incubo con Tritón X-100 al 2.5% por 1h y posteriormente en buffer de activación (Tris 20 mM, CaCl₂ 10mM. pH 7) durante 1 noche. El gel fue teñido con azul de coomassie y el exceso de colorante fue eliminado por incubación con ácido acético al 10%.

Formación de biopelícula

Se realizaron pre-cultivos de ambas cepa con las condiciones ya mencionadas, con ellos se inocularon tubos con 3mL de medio TSB al 10% añadiendo FeCl₃, E, N y sus combinaciones, después se colocaron 200 µL de ambas cepas con su respectivo tratamiento en placas de poliestireno de 96 pozos, se incubaron a 37°C por 24h. Posteriormente, el medio de cultivo fue eliminado tratando de no retirar la biopelícula, a continuación, la biopelícula se fijó con metanol por 15 min, el metanol fue retirado y la biopelícula fue teñida con cristal violeta al 0.1% por 15 min; el exceso de colorante fue eliminado con agua corriente. Después de secar la placa, se añadió ácido acético al 30% y el colorante previamente captado por la biopelícula fue disuelto y recuperado para su cuantificación por espectrofotometría en un lector ELISA a 630nm. Previa dilución 1:5

Resultados

Efecto de catecolaminas y sus combinaciones con FeCl_3 en el crecimiento de *G. anatis* 12656-12 y 12656-12 Ω qseC

El crecimiento de ambas cepas no es afectado por la presencia de hormonas, como se observa en la Fig. 4, pero, se puede observar que la cepa mutante tiene un crecimiento menor a la cepa silvestre.

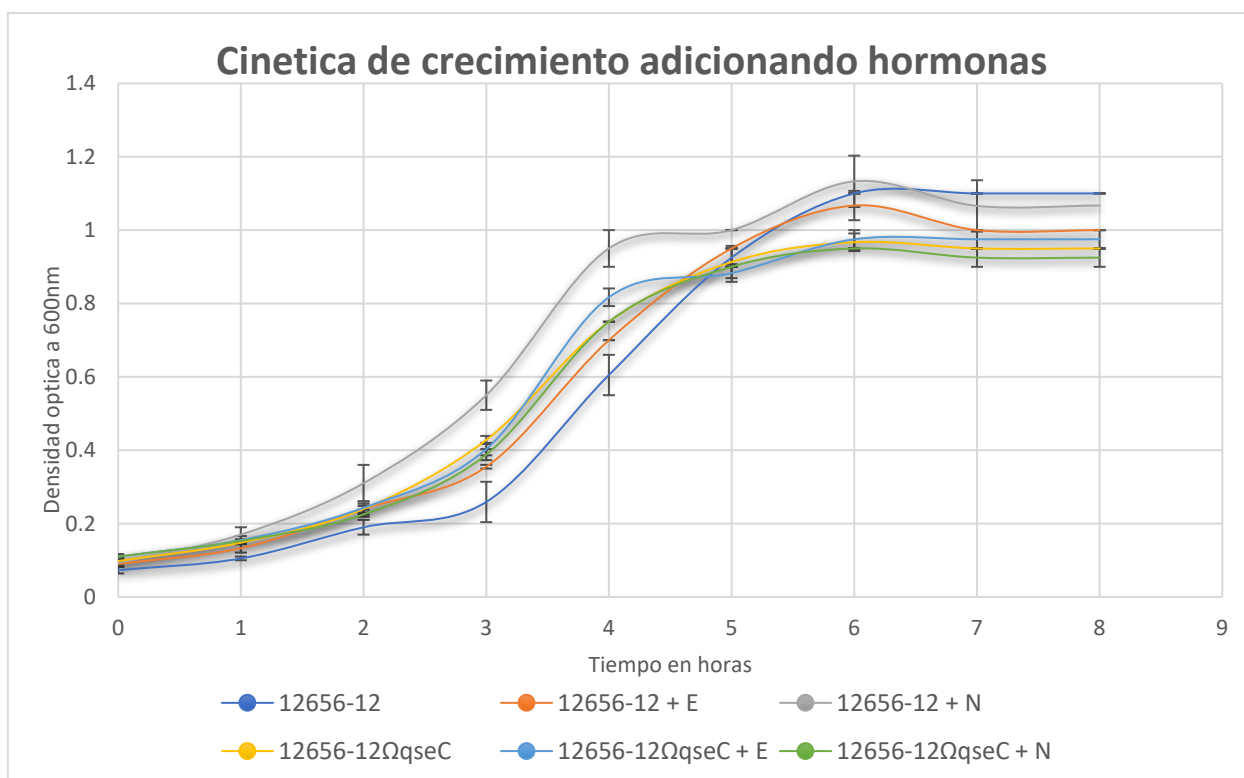


Fig. 4 La cinética de crecimiento de las cepas 12656-12 y 12656-12 Ω qseC de *G. anatis* en presencia de E o N.

En la Fig. 5 podemos observar que ambas cepas tienen un crecimiento similar al añadir FeCl_3 , la cepa silvestre disminuye su crecimiento al combinar FeCl_3 + E o N, en la cepa mutante el crecimiento disminuye al adicionar E+ FeCl_3 , pero se observa un incremento al añadir N+ FeCl_3 .

En la Fig. 5 podemos observar que la densidad óptica (DO) de la cepa 12656-12 + FeCl_3 es menor (aproximadamente un 18%) a la observada en el grupo control de la misma cepa (Fig. 4) especialmente cuando se combina E o N + FeCl_3 donde la

reducción en el crecimiento es mayor al 20% en ambos casos. En cuanto a la cepa mutante se puede observar algo similar, exceptuando la combinación de N + FeCl₃ donde el crecimiento es parecido al observado en la Fig. 4.

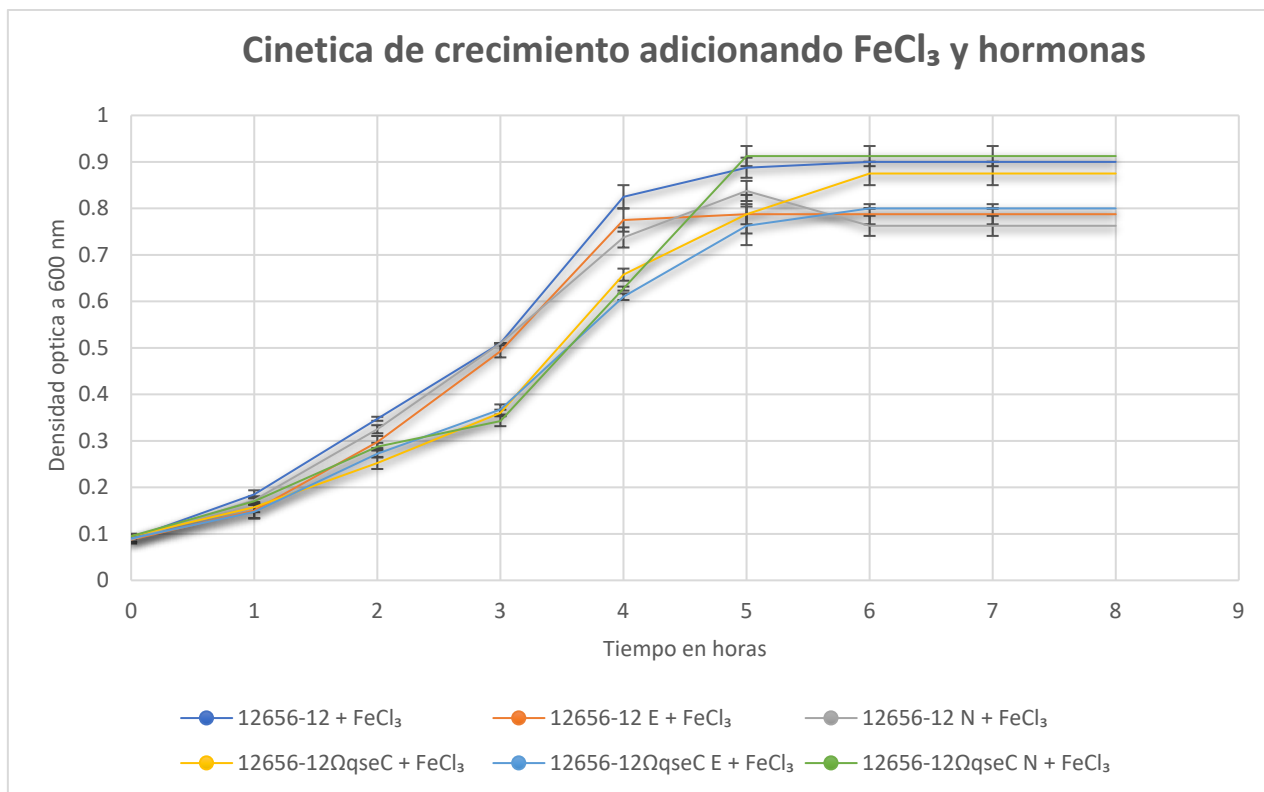


Fig. 5 La cinética de crecimiento de las cepas 12656-12 y 12656-12 Ω qseC de *G. anatis* en presencia de FeCl₃ combinado con E o N.

Patrones de proteínas, actividad proteolítica y patrones de inmunoreconocimiento de *G. anatis* 12656-12 y 12656-12 Ω qseC adicionando E, N, FeCl₃ y sus combinaciones

En la fracción de ET (Fig. 6 y cuadro 2) los cambios observados en el patrón de proteínas (A) muestran una reducción en la expresión proteica, resaltando que la cepa mutante es la más afectada cuando se agrega FeCl₃ solo o combinado. En el gel de actividad proteolítica (B) se observan cambios en la cepa silvestre cuando se agrega FeCl₃, E, E+FeCl₃ y N, al igual que en el grupo control, con respecto a la cepa mutante los cambios se observan al añadir N. Por último, la cepa silvestre muestra cambios en el grupo control y en presencia de N+FeCl₃, en la cepa

mutante los cambios se observan tanto en el control como en presencia de E, E + FeCl₃, N y N+FeCl₃.

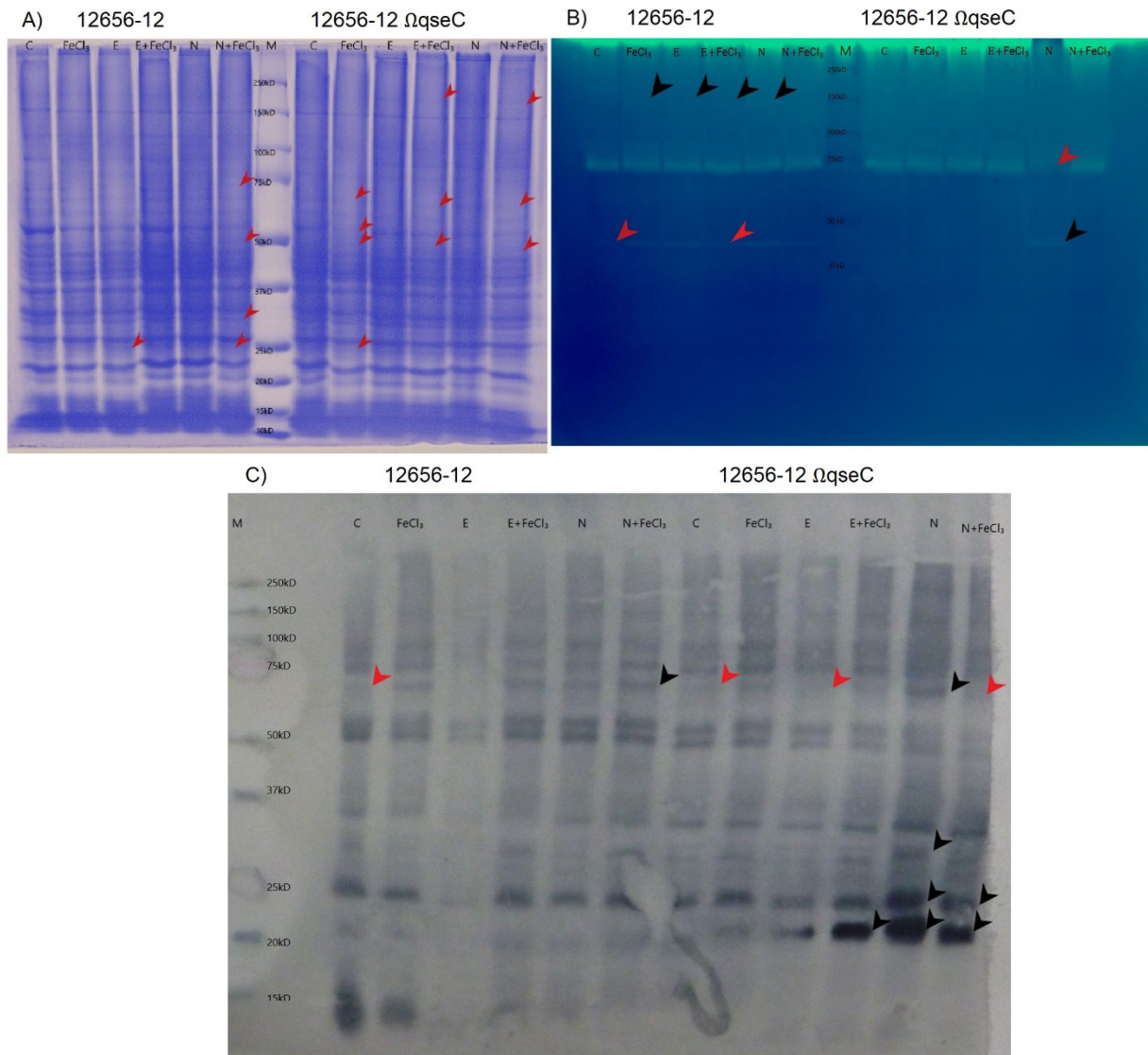


Fig. 6 Extractos totales. A) Patrón de proteínas B) Gel de actividad proteolítica C) Inmunoreconocimiento. Las flechas rojas indican una disminución o ausencia de bandas, las flechas negras indican la aparición o incremento de bandas.

A) Patrón de proteínas				B) Gel de actividad proteolítica				C) Patrón de inmunoreconocimiento			
Peso molecular	Cepa	Condición	Efecto	Peso molecular	Cepa	Condición	Efecto	Peso molecular	Cepa	Condición	Efecto
176 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	E+FeCl ₃ N+FeCl ₃	Disminución	154 kDa	12656-12	FeCl ₃ E E+FeCl ₃ N	Favorece la actividad proteolítica	70 kDa	12656-12	C	Menor interacción
74.6 kDa	12656-12	N+FeCl ₃	Disminución							N+FeCl ₃	Mayor interacción
61 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	FeCl ₃ E+FeCl ₃ N+FeCl ₃	Disminución	74 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	N	Disminución		12656-12 <i>ΩqseC</i>	C E N+FeCl ₃	Menor interacción
53 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	FeCl ₃	Ausencia	40 kDa	12656-12	C E+FeCl ₃	Disminución			N	Mayor interacción
49.6 kDa	12656-12	N+FeCl ₃	Disminución		12656-12 <i>ΩqseC</i>	12656-12 <i>ΩqseC</i>	N	Favorece la actividad proteolítica	28 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	N
	27.2 kDa	12656-12	N+FeCl ₃	Disminución					24 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	N N+FeCl ₃
25.2 kDa	12656-12	E N+FeCl ₃	Ausencia					20 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	E+FeCl ₃ N N+FeCl ₃	Mayor interacción
	12656-12 <i>ΩqseC</i>	FeCl ₃	Ausencia								

Cuadro 2. Cambios observados en la fracción de extractos totales.

En la fracción de proteínas solubles en tritón (Fig. 7 cuadro 3) podemos observar en el patrón de proteínas que la mayoría de los cambios se da en la cepa mutante, especialmente cuando se adiciona E y E+FeCl₃. En el patrón de inmunorreconocimiento la cepa 12656-12 presenta cambios en el grupo control y cuando se añade E. Respecto a la cepa mutante la adición de FeCl₃, E, E+FeCl₃ y N, el ultimo carril correspondiente al tratamiento de N+FeCl₃ no se aprecia con claridad por lo que no fue comparada con el resto.

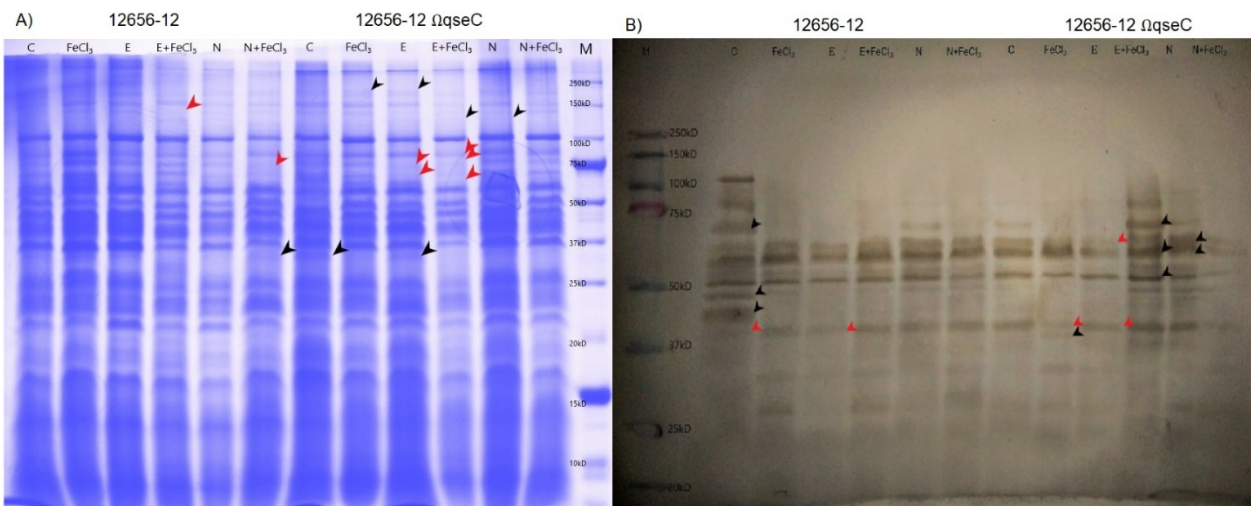


Fig.7 Proteínas solubles en tritón. A) Patrón de proteínas B) Inmunoreconocimiento

A) Patrón de proteínas				B) Patrón de inmunoreconocimiento			
Peso molecular	Cepa	Condición	Efecto	Peso molecular	Cepa	Condición	Efecto
175 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	FeCl ₃ E	Banda muy ligera aparece	70 kDa	12656-12	C	Aumento
					12656-12 <i>ΩqseC</i>	E+FeCl ₃	Aumento
120 kDa	12656-12	E+FeCl ₃	Disminución	63 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	E	Disminución
						N	Aumento
115 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	E+FeCl ₃ N	Banda muy ligera aparece	60 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	E+FeCl ₃ N	Aumento
				51 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	N	Aumento
82 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	E+FeCl ₃	Disminución	46 kDa	12656-12	C	Aumento
	12656-12	N+FeCl ₃	Disminución	44 kDa	12656-12	C	Aumento
78.5 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	E E+FeCl ₃	Disminución	42 kDa	12656-12	C E	Disminución
73 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	E	Ausencia		12656-12 <i>ΩqseC</i>	FeCl ₃ E	Disminución
70 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	E+FeCl ₃	Ausencia				
35 kDa	12656-12	N+FeCl ₃	Aumento	39 kDa	12656-12 <i>ΩqseC</i>	FeCl ₃	Aparición de una nueva banda
	12656-12 <i>ΩqseC</i>	C E	Banda aparece				

Cuadro 3. Cambios observados en la fracción de proteínas solubles en tritón.

En la fracción de OMP's (Fig. 8 cuadro 4) el patrón de proteínas (A) nos muestra cambios únicamente en la cepa mutante, en el gel de actividad proteolítica (B) podemos observar una reducción en la actividad proteolítica en los grupos control, FeCl₃, E + FeCl₃ y N + FeCl₃. En la prueba de inmunoreconocimiento (C) la cepa silvestre muestra cambios en todos los tratamientos excepto en el control, en cuanto a la cepa mutante se presentan 2 nuevas bandas de 110 y 39kDa, dichas bandas no se aprecian en la cepa silvestre.

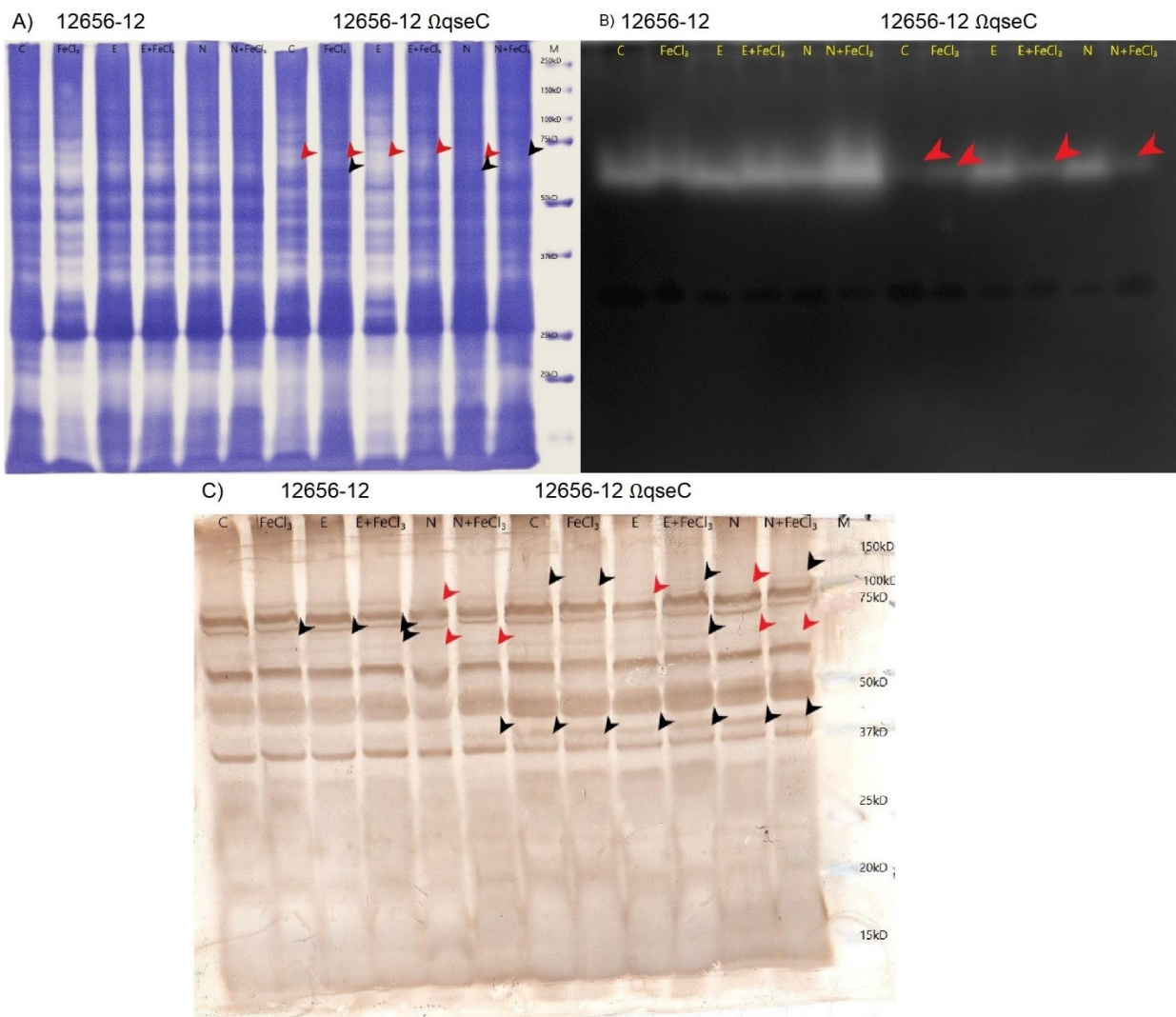


Fig. 8 Proteínas de membrana externa (OMP's). A) Patrón de proteínas B) Gel de actividad proteolítica C) Inmunoreconocimiento

A) Patrón de proteínas				B) Gel de actividad proteolítica				C) Patrón de inmunoreconocimiento			
Peso molecular	Cepa	Condición	Efecto	Peso molecular	Cepa	Condición	Efecto	Peso molecular	Cepa	Condición	Efecto
61.8 kDa	12656-12 Δ qseC	C FeCl ₃ E E+FeCl ₃ N	Disminución	54 kDa	12656-12 Δ qseC	C FeCl ₃ E+FeCl ₃ N+FeCl ₃	Disminución	110 kDa	12656-12 Δ qseC	C FeCl ₃ E+FeCl ₃ N+FeCl ₃	Ligera interacción
		N+FeCl ₃				Aumento		103 kDa		12656-12	N
FeCl ₃ N	Aumento	12656-12 Δ qseC	E N			No hay interacción					
61 kDa			12656-12			FeCl ₃ E E+FeCl ₃		Ligera interacción			
	12656-12 Δ qseC	E+FeCl ₃ N N+FeCl ₃				Mayor interacción Ligera interacción					
		E+FeCl ₃ N N+FeCl ₃				mayor interacción Ligera interacción					
	39 kDa	12656-12 Δ qseC				Todas las condiciones		Nueva interacción			

Cuadro 4. Cambios observados en la fracción de OMP's

En la Fig. 9 y cuadro 5 podemos observar los cambios en la fracción de proteínas secretadas, el patrón de proteínas nos muestra una disminución en la expresión proteica, resaltando ambos grupos control, en la cepa 12656-12 podemos ver una aparición de una banda de 96kDa la cual no se aprecia en el resto de las columnas, de igual forma, se observa un incremento en una banda alrededor de los 35kDa cuando se añade E+ FeCl₃, en el caso de la cepa mutante el control presenta una disminución considerable en 3 bandas de 48, 39 y 21kDa.

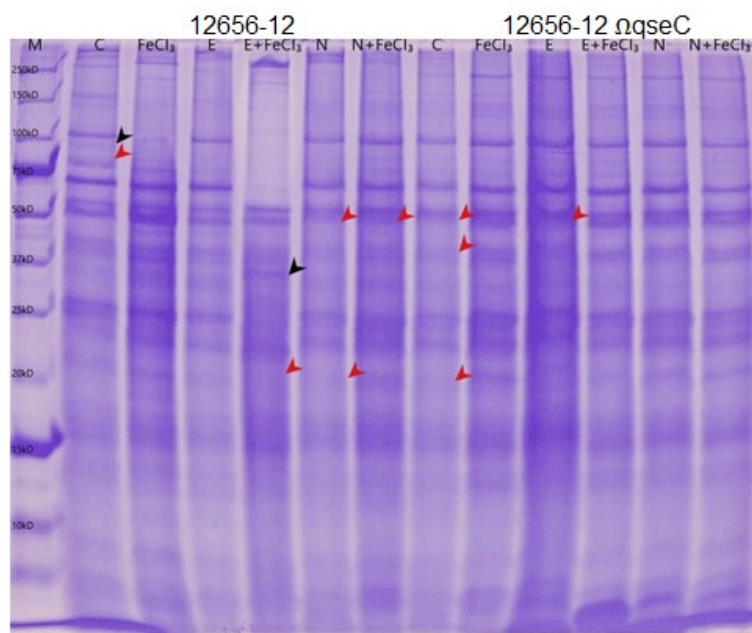


Fig. 9 Patrón de proteínas secretadas

Patrón de proteínas			
Peso molecular	Cepa	Condición	Efecto
96 kDa	12656-12	C	Aumento
80 kDa	12656-12	C	Disminución
48 kDa	12656-12	N+FeCl ₃	Disminución
	12656-12 Δ qseC	C	Disminución
		FeCl ₃ E+FeCl ₃	
39 kDa	12656-12 Δ qseC	C	Disminución
35 kDa	12656-12	E+FeCl ₃	Aumento
21 kDa	12656-12	E+FeCl ₃ N	Disminución
	12656-12 Δ qseC	C	Disminución

Cuadro 5. Cambios observados en la fracción de proteínas secretadas

Efecto de catecolaminas y FeCl_3 en la formación de biopelícula de *G. anatis*

Como se puede observar en la Fig. 10, la formación de biopelícula se ve afectada en ambas cepas por los tratamientos aplicados, para comprobar diferencias significativas se compararon los datos de los diferentes tratamientos con su respectivo control usando la prueba Anova, obteniendo como resultado lo siguiente:

En la cepa 12656-12 los tratamientos de FeCl_3 y la combinación N+ FeCl_3 mostraron tener un efecto adverso en la producción de biopelícula disminuyendo su cantidad con respecto al grupo control, mientras que la adición de N favorece la producción. Al comparar únicamente los controles, la cepa 12656-12 produce más biopelícula que la cepa mutante.

En la cepa 12656-12 $\Omega qseC$ la producción de biopelícula se ve favorecida cuando se agrega E o E+ FeCl_3 , en ambos casos la producción de biopelícula fue estadísticamente igual a la producida por la cepa 12656-12 sin adiciones.

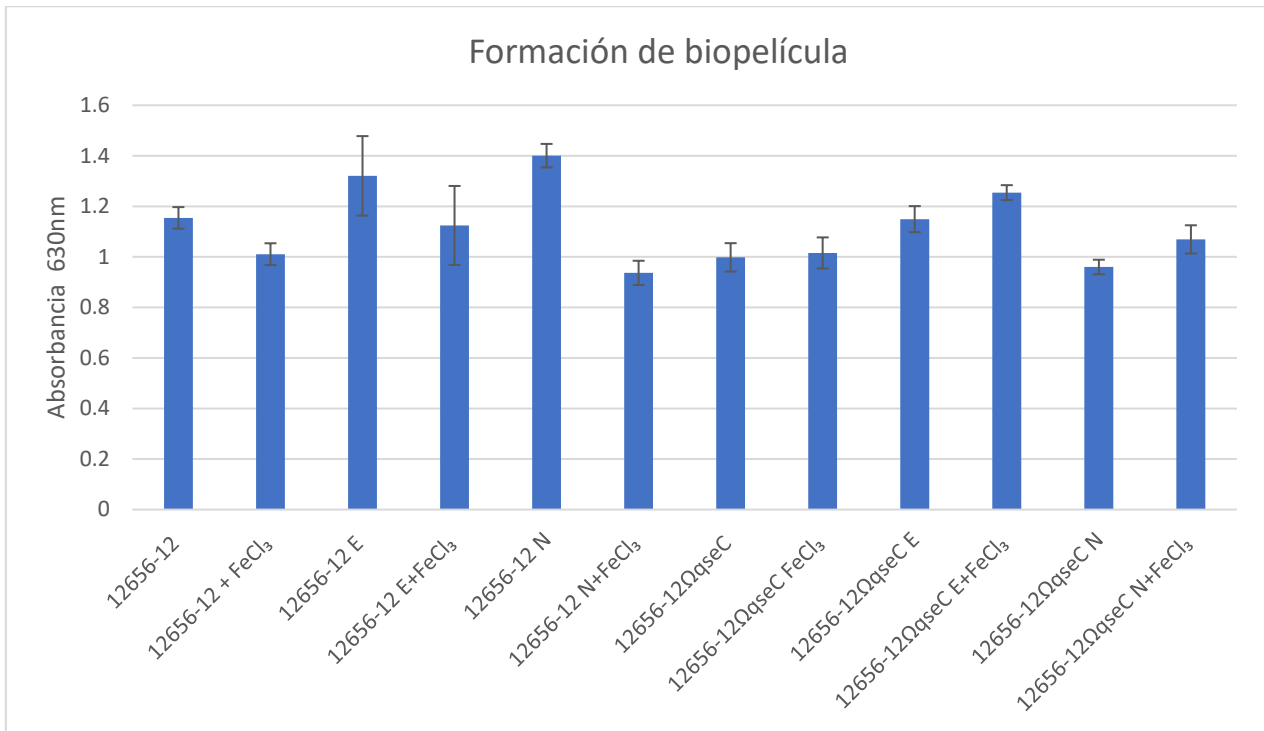


Fig. 10. Efecto de catecolaminas y FeCl_3 en la formación de biopelícula de *G. anatis* (12656-12 y 12656-12 $\Omega qseC$)

Discusión

Como se mencionó con anterioridad, el QS es reconocido como un mecanismo de comunicación entre comunidades bacterianas, estas comunidades modifican su comportamiento conforme a su densidad poblacional y las condiciones ambientales en el que se encuentran, este proceso se lleva a cabo cuando se detectan señales químicas tales como autoinductores, ácidos grasos, cetonas, epinefrina, norepinefrina o quinolonas (Munir, *et al*, 2020).

En el proceso de QS las bacterias coordinan la expresión de ciertos genes en respuesta a los estímulos recibidos, detectando señales por diversos mecanismos que poseen, la detección de estas señales y la generación de una respuesta es una pieza clave para la regulación de factores de virulencia en bacterias patógenas de plantas, animales y humanos (Defoirdt, 2018).

Una de las vías de señalización más abundantes en la naturaleza son los SDC, compuestos por una HK y un RR, las HKs son capaces de detectar gran variedad de estímulos incluidos pequeñas moléculas, luz, turgencia, potencial redox y gradientes electroquímicos (Gao & Stock, 2009). La presencia de múltiples SDC para la detección de una o pocas señales otorga una ventaja adaptativa a diversos ambientes debido a la especificidad que estos poseen, dichos sistemas por lo general al percibir una señal generan una respuesta cuyo resultado final es la expresión genética diferencial (Terán-Melo, *et al*, 2019). Por ejemplo, algunas bacterias patógenas, responden a estímulos específicos del hospedero muchas veces por medio de SDC, en *Bacillus subtilis* la esporulación se lleva a cabo mediante la detección de señales por medio de múltiples HKs (Rosales-Hurtado, *et al*, 2020).

El SDC motivo de este estudio es QseC, capaz de percibir y responder a estímulos como el autoinductor 2, epinefrina o norepinefrina, diversos autores reportan que este sistema tiene una participación importante en la formación de biopelícula y la expresión de factores de virulencia.

Como se observa en las fig. 4 y 5 la presencia de hormonas no afecta el crecimiento de *G. anatis* de manera significativa, sin embargo, la adición de FeCl_3 y sus respectivas combinaciones provoca una reducción del crecimiento, excluyendo a la cepa mutante cuando se le agrega N+ FeCl_3 .

La adición de hormonas tuvo resultados similares al estudio de Graziano y col. del 2014 donde evaluaron el efecto de E y N a [100 μM] en el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* usando medio SAPI y TBS, ambos se probaron con y sin hemina y menadiona, los resultados no mostraron diferencias significativas en el crecimiento. En este estudio se reportó que las catecolaminas promueven la expresión de genes relacionados con la actividad hemolítica, el estrés oxidativo y la adquisición de hierro.

Existe una reducción en el crecimiento, tal como se muestra en la Fig. 5, que puede estar relacionado a la presencia de hierro, prácticamente en todos los tratamientos hubo una disminución en la DO, sin embargo, en la cepa mutante la presencia de N combinada con hierro causó un crecimiento similar al de los grupos control, inclusive llegando a ser ligeramente mayor que estos, pero no de una manera significativa.

En el estudio realizado por Li y col. en 2015 se usó como modelo de estudio *Actinobacillus pleuropneumoniae*, miembro de la Fam. *Pasteurellaceae*, reportando que la presencia de transferrina reduce el crecimiento de la bacteria cuando se usa medio químicamente definido (CDM), al agregar E, N o dopamina; este efecto puede ser inhibido dado que las catecolaminas pueden regular la adquisición de hierro promoviendo así el crecimiento de la bacteria, esto sin la intervención de QseC. En un estudio que realizaron previamente usando medio TSB no se observaron diferencias significativas en el crecimiento, de igual forma se reportó que QseC interviene en un gran número de genes asociados a la infección y metabolismo de *A. pleuropneumoniae*.

En el presente estudio el uso de medio TSB pudo ser un factor importante en los resultados obtenidos, de igual forma, no se obtuvo evidencia suficiente para

garantizar que QseC interviene en el crecimiento de *G. anatis*. Jentsch, März & Krüger en 2013 reportan que las condiciones de crecimiento pueden variar dependiendo de la metodología que se aplique, ellos realizaron un estudio evaluando el crecimiento de *Fusobacterium nucleatum*, regulado por mecanismos de QS, reportando un incremento en un medio sólido adicionado con hormonas, contrastando con los reportes previos en los que *F. nucleatum* no muestra un crecimiento significativamente diferente cuando se utiliza un medio líquido (Roberts, *et al*, 2002).

Otra alternativa que se ha tomado en cuenta es que los tratamientos aplicados no influyen en el crecimiento de ambas cepas, más bien los tratamientos podrían causar cambios en la composición de la membrana bacteriana. Resultados preliminares sugieren que la presencia de hormonas influye en la composición lipídica de la membrana; estos resultados necesitan ser confirmados.

La gran mayoría de los cambios observados se presentó en la cepa mutante. La presencia de hormonas y sus respectivas combinaciones parecen tener efectos en la expresión de proteínas, por lo que se podría sugerir que QseC desempeña una función importante en la regulación de proteínas, algunas de las cuales pueden ser factores de virulencia, por ejemplo, los patrones de actividad proteolítica. Se sugiere que QseC cumple funciones tanto de activador como de represor en la expresión proteica dado que existieron diversas disminuciones e incluso hubo aumentos en la intensidad de las bandas.

En la fracción de extractos totales es importante recalcar la expresión de proteasas de 154kDa y de 40kDa en la cepa silvestre, en todas las condiciones muestran actividad, mientras que en la cepa mutante la adición de N es la que permite visualizar la presencia de una banda de 40kDa. En estas mismas muestras, se observa un incremento en el inmunoreconocimiento en bandas con un peso molecular entre los 28kDa y 20kDa en presencia de N y su combinación con FeCl₃. Sería interesante el conocer la identidad de estas proteínas y su posible participación en la patogénesis.

La mayoría de los cambios observados en la fracción de proteínas solubles en tritón (Fig. 7), de la cepa mutante, se dio cuando adicionamos E y su combinación con FeCl₃. Estos cambios son evidentes en el inmunoreconocimiento. Sería interesante el continuar con esta caracterización.

En el patrón de proteínas y el gel de actividad proteolítica de OMP's (Fig. 8) podemos observar que la cepa mutante muestra una disminución en la expresión proteica y en la actividad proteolítica.

En el caso de las proteínas secretadas (Fig. 9) los cambios en la cepa silvestre son disminuciones en la expresión de proteínas en el grupo control, E+FeCl₃, N y N+FeCl₃.

Boyanova en 2017 menciona que las catecolaminas no solo pueden intervenir en el crecimiento y la regulación genética bacteriana, también pueden actuar como sideróforos, mecanismos de captación de hierro, importantes para la expresión de factores de virulencia. Bearson (2016) menciona que en bacterias como *S. typhimurium* en presencia de N, se induce la expresión de genes asociados a flagelos, y se incrementa el crecimiento debido a que N actúa como un sideróforo capaz de retirar el hierro de la transferrina. Respecto a la adición de E menciona que esta es importante para la invasión de células eucariotas y resistencia a antimicrobianos. En el presente estudio al adicionar N+FeCl₃ el crecimiento de la cepa mutante es favorecido, por lo cual es posible que en *G. anatis* las hormonas puedan llegar a actuar como sideróforos.

Curtis y col. en 2014 reportaron que la inhibición de QseC usando un profármaco (LED209) en *S. typhimurium*, provoca una disminución en la expresión de genes importantes para la motilidad flagelar, invasión de células epiteliales y supervivencia en macrófagos. Clarke y col. en 2006 evaluaron los efectos de la delección de QseC en la virulencia de *E. coli* enteropatogénica, capaz de causar lesiones en células intestinales y diarrea, usando un modelo *in vivo* en conejos, los resultados muestran que la mutante de QseC no provoca diarrea en los conejos, mientras que, los conejos inoculados con la cepa silvestre tuvieron casos de diarrea, por lo que se

concluyó que la mutación de QseC causa una atenuación en los factores de virulencia. En el caso de *G. anatis*, sería interesante evaluar la virulencia de esta bacteria y compararla con la de su mutante QseC en modelos animales.

En cuanto a la formación de biopelícula de *G. anatis* (Fig. 10) los tratamientos aplicados que muestran diferencias significativas son FeCl₃ o N+FeCl₃ en el caso de la cepa silvestre donde se ve una disminución en la cantidad producida con respecto al grupo control, contrario a lo que ocurre cuando se adiciona N, donde la producción incrementa; en la cepa mutante los tratamientos que tuvieron efecto son E o E+FeCl₃ los cuales causaron un aumento en la producción de biopelícula. Al comparar los grupos control de ambas cepas es evidente que la cepa mutante produce menor cantidad de biopelícula. En *G. anatis* observamos que la presencia de hierro es importante para la expresión de factores de virulencia, la N puede actuar como un sideróforo en la cepa silvestre; QseC podría regular la detección de E, por ende, al encontrarse inhibido la producción de biopelícula aumenta.

Estudios como el de He y colaboradores (2018) en *Haemophilus parasuis* reportan que QseC es capaz de responder a catecolaminas, involucrándose en la respuesta al estrés osmótico, oxidativo, respuesta al choque térmico, regular mecanismos de captación de hierro y formación de biopelículas, la mutante que usaron mostró una producción de biopelícula menor a la cepa silvestre, similar al presente estudio.

En 2010 Novak y col. estudiaron el sistema QseBC de *A. actinomycetemcomitans* demostrando que este sistema es capaz de percibir y responder al autoinductor 2, además, realizaron pruebas de formación de biopelícula con una mutante en QseC la cual produjo menor cantidad de biopelícula comparándola con su respectiva cepa silvestre.

Diversos autores reportan que la presencia de hormonas (E o N) puede ocasionar cambios en la producción de biopelícula. En 2020 Cambronel y col. realizaron un estudio en 3 diferentes cepas de *Enterococcus faecalis* donde los resultados mostraron que la presencia de E puede modificar el biovolumen, talla y densidad de la biopelícula provocando un incremento comparado con el grupo control, al evaluar

el uso de N se demostró que tiene un menor efecto que la E. En esta bacteria la percepción de estímulos se da mediante VicK, que tiene una similitud del 46% a QseC.

En 2014 Yang y colaboradores estudiaron la función de QseC en la motilidad y formación de biopelícula de *E. coli*, la adición de E o N muestra un incremento en la formación de biopelícula de la cepa silvestre, la cepa mutante no pudo estimular la formación de biopelícula. Lo mismo ocurrió en las pruebas de motilidad, la mutante en QseC mostro una reducción y la cepa silvestre un incremento.

Pillay, Cha & Mosier en 2018 evaluaron el efecto de E o N en la formación de biopelícula de *Mannheimia haemolytica*, los resultados obtenidos mostraron que las hormonas después de 72h de incubación *in vitro* existe un efecto dispersor, especialmente al adicionar E, reduciendo un 59% la biomasa de la biopelícula; en el caso de la N la reducción fue menor 32.7%.

En el presente estudio se realizaron pruebas de dispersión de biopelícula, sin embargo, los datos obtenidos tenían una desviación estándar considerable por lo que se decidió descartarlos, se debe tomar en cuenta que las disminuciones en la cantidad de biopelícula pueden ser por un efecto dispersor de estas hormonas.

Conclusiones

- El crecimiento de *G. anatis* (12656-12 y 12656-12 Ω qseC) no muestra diferencias significativas al añadir FeCl₃, E, N y sus respectivas combinaciones.
- La presencia de hormonas, FeCl₃ y sus combinaciones provocan cambios en la expresión proteica en las diferentes fracciones evaluadas.
- La presencia de FeCl₃, E, E+FeCl₃ y N favorece la actividad proteolítica de la cepa 12656-12 a los 154kDa en la fracción de extractos totales.
- En la fracción de extractos totales podemos observar que la adición de N en la cepa mutante disminuye la actividad proteolítica a los 74kDa, pero se ve favorecida a los 40kDa.
- En las proteínas de membrana externa se aprecia actividad proteolítica en ambas cepas a los 54kDa, la actividad proteolítica de la cepa mutante disminuye en el grupo control y al adicionar FeCl₃ con o sin hormonas.
- La presencia de FeCl₃ o N+FeCl₃ tiene efectos adversos en la producción de biopelícula en la cepa 12656-12.
- La formación de biopelícula en la cepa 12656-12 se incrementa al adicionar N.
- La adición de E o E+FeCl₃ aumenta la producción de biopelícula en la cepa 12656-12 Ω qseC.

Perspectivas

- Usar un medio mínimo para evaluar el crecimiento de *G. anatis* (12656-12 y su mutante en QseC).
- Identificar posibles factores de virulencia por espectrometría de masas y caracterizarlos
- Considerar el uso de algún inhibidor de QseC como agente terapéutico.

Bibliografía

- Álvarez, A. F., & Georgellis, D. (2016). Características y funcionamiento de los sistemas de dos Componentes de organismos procariontes y eucariotas. *Química Viva*, 15(3), 11–27. Disponible en: www.redalyc.org/articulo.oa?id=86348856003.
- Badía, M. M. R. (2011). Quorum sensing en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIII (2), 135-143. Disponible en: www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752011000200012&lng=en&tlng=.
- Bager, R. J., Nesta, B., Pors, S. E., Soriani, M., Serino, L., Boyce, J. D., Adler, B., & Bojesen, A. M. (2013). The fimbrial protein FlfA from *Gallibacterium anatis* is a virulence factor and vaccine candidate. *Infection and Immunity*, 81(6), 1964–1973. DOI: 10.1128/IAI.00059-13.
- 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*. *Veterinary Microbiology*, 167(3), 565-572. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.09.005.
- Barba-Ostria, C. A. (2014). Los sistemas de dos componentes: Circuitos moleculares versátiles. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1). 67-76 DOI: 10.1016/S1405-888X(14)70320-1.
- Barreto R., M., & Retamal M., P. (2016). Comunicación intercelular en bacterias: conversaciones entre especies. *TecnoVet*, 10(3), 12-18. Disponible en: <https://tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/38969>.
- Bearson, B. L. (2016). Molecular profiling: Catecholamine modulation of gene expression in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 874, 167–182. DOI: 10.1007/978-3-319-20215-0_7

- Beier, D., & Gross, R. (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 143–152. DOI: 10.1016/j.mib.2006.01.005.
- Betancourth, M., Botero, J. E., & Rivera, S. P. (2004). Biopelículas: Una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica*, 35(3), 34-39. Disponible en: colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/312.
- Binder, B. M., Kim, H. J., Mathews, D. E., Hutchison, C. E., Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2018). A role for two-component signaling elements in the Arabidopsis growth recovery response to ethylene. *Plant Direct*, 2(5), e00058. DOI: 10.1002/pld3.58
- Boyanova, L. (2017). Stress hormone epinephrine (adrenaline) and norepinephrine (noradrenaline) effects on the anaerobic bacteria. *Anaerobe*, 44, 13–19. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2017.01.003.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., & Griffiths, E. (1978). Role of iron in bacterial infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1–35.
- Calva, E., & Oropeza, R. (2006). Two-component signal transduction systems, environmental signals, and virulence. *Microbial Ecology*, 51(2), 166–176. DOI: 10.1007/s00248-005-0087-1.
- Cambronel, M., Nilly, F., Mesguida, O., Boukerb, A. M., Racine, P.-J., Baccouri, O., Borrel, V., Martel, J., Fécamp, F., Knowlton, R., Zimmermann, K., Domann, E., Rodrigues, S., Feuilleley, M., & Connil, N. (2020). Influence of catecholamines (Epinephrine/Norepinephrine) on biofilm formation and adhesion in pathogenic and probiotic strains of *Enterococcus faecalis*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1501. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01501
- Cárdenas, J., Castillo, O., De Cámara, C., & González, V. (2018). Combatiendo la resistencia bacteriana: Una revisión sobre las terapias alternativas a los antibióticos convencionales. *Boletín Venezolano de Infectología*, 29(1).

- Casino, P., Rubio, V., & Marina, A. (2009). Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell*, 139(2), 325–336. DOI: 10.1016/j.cell.2009.08.032.
- Carroll, K. C., & Hobden, J. A. (2016). Patogénesis de la infección bacteriana. En Carroll, Karen C., Hobden, Jeffery A., Miller, Steve., Morse, Stephen A., Mietzner, Timothy A., Detrick, Barbara., Mitchell, Thomas. G., McKerrow, James H., & Sakanari, Judy A., *Microbiología médica*, 27a ed., (pp. 153–168). Mc Graw Hill.
- Christensen, H., y Bisgaard, M. (2008). Taxonomy and biodiversity of members of *Pasteurellaceae*. En Christensen, H., y Kuhnert, P. *Pasteurellaceae: Biology, genomics and molecular aspects*. (pp. 1-21) Norfolk, UK: Horizon Scientific Press.
- Clarke, M. B., Hughes, D. T., Zhu, C., Boedeker, E. C., & Sperandio, V. (2006). The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10420–10425. DOI: 10.1073/pnas.0604343103
- Curtis, M. M., Russell, R., Moreira, C. G., Adebisin, A. M., Wang, C., Williams, N. S., Taussig, R., Stewart, D., Zimmern, P., Lu, B., Prasad, R. N., Zhu, C., Rasko, D. A., Huntley, J. F., Falck, J. R., & Sperandio, V. (2014). QseC Inhibitors as an Antivirulence Approach for Gram-Negative Pathogens. *MBio*, 5(6), e02165. DOI: 10.1128/mBio.02165-14
- Díaz, D. M., & Sen, A. S. de la. (2010). Sistemas de quorum sensing en bacterias. *REDUCA (Biología)*, 3(5). Disponible en: revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/820.
- Defoirdt, T. (2018). Quorum-Sensing systems as targets for antivirulence therapy. *Trends in Microbiology*, 26(4), 313–328. DOI: 10.1016/j.tim.2017.10.005.
- Galicia-Jiménez, M. M., López-Garrido, S. J., Ávila-Serrano, N. Y., & Murialdo, S. E. (2017). Sistema de dos componentes: Un diálogo molecular entre las bacterias ruminales y partículas de alimento (Plantas forrajeras). *Tropical and Subtropical*

- Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 133–154. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073214.
- 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 Pathology*, 34(5), 426–429. DOI: 10.1080/03079450500267866.
- Graziano, T. S., Closs, P., Poppi, T., Franco, G. C., Cortelli, J. R., Groppo, F. C., & Cogo, K. (2014). Catecholamines promote the expression of virulence and oxidative stress genes in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*, 49(5), 660–669. DOI: 10.1111/jre.12148.
- He, L., Dai, K., Wen, X., Ding, L., Cao, S., Huang, X., Wu, R., Zhao, Q., Huang, Y., Yan, Q., Ma, X., Han, X., & Wen, Y. (2018). QseC mediates osmotic stress resistance and biofilm formation in *Haemophilus parasuis*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 212. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00212.
- Hill, R. W., Wyse, G. A., & Anderson M. (2012) Endocrine and neuroendocrine physiology. En Hill, R. W., Wyse, G. A., & Anderson M. *Animal physiology*, 3a ed., (pp. 420-455). Sinauer Associates.
- Hughes, D. T., Clarke, M. B., Yamamoto, K., Rasko, D. A., & Sperandio, V. (2009). The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). *PLOS Pathogens*, 5(8), e1000553. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000553.
- Intarak, N., Muangsombut, V., Vattanaviboon, P., Stevens, M. P., & Korbsrisate, S. (2014). Growth, motility and resistance to oxidative stress of the melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei* are enhanced by epinephrine. *Pathogens and Disease*, 72(1), 24–31. DOI: 10.1111/2049-632X.12181.

- Jentsch, H. F. R., März, D., & Krüger, M. (2013). The effects of stress hormones on growth of selected periodontitis related bacteria. *Anaerobe*, 24, 49–54. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.09.001.
- Johnson, T. J., Danzeisen, J. L., Trampel, D., Nolan, L. K., Seemann, T., Bager, R. J., & Bojesen, A. M. (2013). Genome analysis and phylogenetic relatedness of *Gallibacterium anatis* strains from poultry. *PLOS ONE*, 8(1), e54844. DOI: 10.1371/journal.pone.0054844.
- Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M.-E., & Ramos, J. L. (2010). Bacterial sensor kinases: Diversity in the recognition of environmental signals. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 539–559. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134054.
- Kristensen, B. M., Frees, D., & Bojesen, A. M. (2011). Expression and secretion of the RTX-toxin GtxA among members of the genus *Gallibacterium*. *Veterinary Microbiology*, 153(1), 116–123. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.05.019.
- Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 163–184. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.
- Lasa, I., Pozo, J. L. del, Penadés, J. R., & Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163–175. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es.
- Li, L., Chen, Z., Bei, W., Su, Z., Huang, Q., Zhang, L., Chen, H., & Zhou, R. (2015). Catecholamines promote *Actinobacillus pleuropneumoniae* growth by regulating iron metabolism. *PLOS ONE*, 10(4), e0121887. DOI: 10.1371/journal.pone.0121887.
- López-Ochoa A. J. (2019). Identificación de algunas proteínas tipo amiloide en *Gallibacterium anatis*: El papel de la proteína EF-Tu (Tesis de doctorado). Doctorado en Ciencias Microbiológicas. CICM-BUAP

- López-Ochoa, A. J., Sánchez-Alonso, P., Vázquez-Cruz, C., Horta-Valerdi, G., Negrete-Abascal, E., Vaca-Pacheco, S., Mejía, R., & Pérez-Márquez, M. (2019). Molecular and genetic characterization of the pOV plasmid from *Pasteurella multocida* and construction of an integration vector for *Gallibacterium anatis*. *Plasmid*, *103*, 45–52. DOI: 10.1016/j.plasmid.2019.04.003.
- Lucio, M. L. S., 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. *Advances in Microbiology*, *02*(04), 505-510. DOI: 10.4236/aim.2012.24064.
- March Rosselló, G. A., & Eiros Bouza, J. M. (2013). Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Medicina Clínica*, *141*(8), 353–357. DOI: 10.1016/j.medcli.2013.02.031.
- Martínez, G. K. K. (2013). Análisis de la expresión de factores de virulencia regulados por quorum sensing en *Gallibacterium anatis* (Tesis de Maestría). Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. UNAM.
- Matsushita, M., & Janda, K. D. (2002). Histidine kinases as targets for new antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *10*(4), 855–867. DOI: 10.1016/S0968-0896(01)00355-8.
- Moreira, C. G., & Sperandio, V. (2016). The Epinephrine/Norepinephrine /Autoinducer-3 interkingdom signaling system in *Escherichia coli* O157:H7. En M. Lyte (Ed.), *Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health* (Vol. 874, pp. 247–261). Springer International Publishing.
- Munir, S., Shah, A. A., Shahid, M., Manzoor, I., Aslam, B., Rasool, M. H., Saeed, M., Ayaz, S., Khurshid, M., Munir, S., Shah, A. A., Shahid, M., Manzoor, I., Aslam, B., Rasool, M. H., Saeed, M., Ayaz, S., & Khurshid, M. (2020). Quorum sensing interfering strategies and their Implications in the management of biofilm-associated bacterial infections. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *63*. DOI: 10.1590/1678-4324-2020190555.

- Nazar C, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 67(1),161–172. DOI: 10.4067/S0718-48162007000100011.
- Novak, E. A., Shao, H., Daep, C. A., & Demuth, D. R. (2010). Autoinducer-2 and QseC control biofilm formation and in vivo virulence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infection and Immunity*, 78(7), 2919–2926. DOI: 10.1128/IAI.01376-09.
- Ortega-Peña, S., & Hernández-Zamora, E. (2019). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 75(2), 665. DOI: 10.24875/BMHIM.M18000012.
- Osuna Chávez, R. F., Molina Barrios, R. M., Munguía Xóchihua, J. A., Hernández Chávez, J. F., López León, J. B., Acuña Yanes, M., Fernández Martínez, V. A., Robles Mascareño, J., Icedo Escalante, J. G. A. (2017). Resistencia antimicrobiana de *Gallibacterium anatis* aisladas de gallinas de postura comercial en Sonora, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 8(3), 305-312. DOI: 10.22319/rmcp.v8i3.4506.
- Persson, G., & Bojesen, A. M. (2015). Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry. *Veterinary research*, 46(1), 57. DOI: 10.1186/s13567-015-0206-z.
- 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. *Veterinary Microbiology*, 215, 11–17. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.11.025.
- Plottinger L. Paul, Kenneth J. Ryan, & Ray C. George. (2017). Patogénesis de la infección bacteriana. En Kenneth Ryan J., Ray George C., Plottinger Paul L., Ahmad Nafees., Reller Barth L., Drew Lawrence W., Sterling Charles R., & Lagunoff Michael. *Sherris Microbiología médica* 6a ed. (pp. 334–346). Mc Graw Hill.

- Proctor, R. A., von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., & Peters, G. (2006). Small colony variants: A pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(4), 295–305. DOI: 10.1038/nrmicro1384.
- Ratledge, C., & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 881–941. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.881.
- Roberts, A., Matthews, J. B., Socransky, S. S., Freestone, P. P. E., Williams, P. H., & 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. DOI: 10.1034/j.1399-302X.2002.170506.x.
- Rooks, M. G., Veiga, P., Reeves, A. Z., Lavoie, S., Yasuda, K., Asano, Y., Yoshihara, K., Michaud, M., Wardwell-Scott, L., Gallini, C. A., Glickman, J. N., Sudo, N., Huttenhower, C., Lesser, C. F., & Garrett, W. S. (2017). QseC inhibition as an antivirulence approach for colitis-associated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(1), 142–147. DOI: 10.1073/pnas.1612836114.
- Rosales-Hurtado, M., Meffre, P., Szurmant, H., & Benfodda, Z. (2020). Synthesis of histidine kinase inhibitors and their biological properties. *Medicinal Research Reviews*, 40(4), 1440–1495. DOI: doi.org/10.1002/med.21651.
- Serra V. M. Á., (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 402-419. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2013>.
- Singh, S., Singh, B., Sinha, D., Vinodhkumar, O., Vadhana, P., Bhardwaj, M., & Dubey, S. (2016). *Gallibacterium anatis*: An emerging pathogen of poultry birds and domiciled birds. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 7, 1000324. DOI: 10.4172/2157-7579.1000324.
- Solano, C., Echeverz, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 96–104. DOI: 10.1016/j.mib.2014.02.008.

- Terán-Melo, J. L., Rodríguez-Rangel, C., Georgellis, D., & Álvarez, A. F. (2019). Mecanismos de autofosforilación y transfosforilación en sistemas de dos componentes bacterianos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 22(0), 1-11. DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2019.0.162.
- Weigel, W. A., Demuth, D. R., Torres-Escobar, A., & Juárez-Rodríguez, M. D. (2015). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* QseBC is activated by catecholamines and iron and regulates genes encoding proteins associated with anaerobic respiration and metabolism. *Molecular Oral Microbiology*, 30(5), 384–398. DOI: 10.1111/omi.12101.
- Weil P. Anthony. (2013). La diversidad del sistema endocrino. En Murray K. Robert, Kennelly Peter J., Bender David A., Rodwell Victor W., Botham Kathleen M., & Weil Anthony P. Harper bioquímica ilustrada 29a ed (pp. 478–497). Mc Graw Hill.
- Yang, K., Meng, J., Huang, Y., Ye, L., Li, G., Huang, J., & Chen, H. (2014). The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in epinephrine-enhanced motility and biofilm formation by *Escherichia coli*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70(1), 391–398. DOI: 10.1007/s12013-014-9924-5.
- Zughaier, S. M., & Cornelis, P. (2018). Editorial: Role of iron in bacterial pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00344