



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**EFFECTO DE EPINEFRINA Y NOREPINEFRINA EN LA
EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA EN
*Pasteurella multocida***

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MAYRA MARTINEZ ALFONZO

TUTOR

DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL

COMITÉ TUTOR

DRA. MARTHA OFELIA SALCEDO ÁLVAREZ

DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

DR. JUAN FERNANDO MONTES GARCÍA

DR. ERIC MONROY PÉREZ

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. Méx. Octubre, 2024





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de genética de la UMF
de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM
y fue financiado por
DGAPA-UNAM PAPIIT IN204122.

Dedicatoria

Este trabajo y mis años de carrera están dedicados a mis incondicionales, refiriéndome a esas dos personas que siempre han estado a mi lado, que no se han rendido conmigo y a quienes amaré eternamente sin importar qué. A mi madre, mi más grande amor, mujer admirable de las montañas, que, con tanto amor, dedicación, paciencia y resiliencia, me ha ensañado y motivado a seguir adelante y luchar por mis sueños sin importar las adversidades.

A mi padre (QEPD), quién me dio valor y su apoyo para hacer cada cosa que creía difícil. Gracias, papá, por ser cómplice en mis decisiones y darme fortaleza para afrontar consecuencias. Gracias por tu amor, trabajo y tu más grande sacrificio.

A mi hermano, por ser mi eterno compañero de vida, mi cómplice, darme ánimos, ser uno de mis más grandes amores y motivos para nunca rendirme y seguir aquí, por siempre nutrir mi mente con cosas nuevas. Gracias por enseñarme a creer en mí misma y sostenerme.

A mi nena, mi sol, mi cielo, mi luna y mis estrellas, mi perrita, quien llego a mitad del camino, y me eligió para amarme, acompañarme y cuidarme, quien a pesar de las circunstancias siempre me llena de amor y le da alegría a mi corazón, gracias por la compañía en las noches de desvelo y por tu espera en mis días de ausencia.

Agradecimientos

Agradezco profundamente al Dr. Erasmo, por aceptarme en su laboratorio sin ningún prejuicio. Gracias por su invaluable orientación, conocimiento, enseñanza, paciencia y tiempo invertido en mí. Le estoy eternamente agradecida por su apoyo profesional y personal, es un tutor digno de admirar, y su respaldo a sido fundamental durante mi último año de carrera.

A los miembros de mi comité asesor, les agradezco por su retroalimentación, crítica y sugerencias en este trabajo.

Agradezco al Dr. Juan Fernando por su enseñanza en el área y por alimentar mis sueños. Su papel como punto de aterrizaje y orientación en el mundo real ha sido de ayuda en mi formación.

A mis comadres y ahora colegas, Alicia y Verónica, gracias por integrarme en el laboratorio a mi llegada y hacer una estancia más que agradable. Agradezco su apoyo para poder desarrollarme como científica, así como esos días de risas y desayunos que, más que alimentar al ser, alimentaban mi alma y corazón en momentos difíciles. Gracias por convertirse en mis amigas, son un par de mujeres increíbles.

A mis compañeros de laboratorio, Antonio y Bucio, gracias por sus consejos, correcciones y los momentos compartidos, que hicieron más llevadero el trabajo.

A mis amigos y compañeros de carrera Andrea, Angélica, Jhony, Luis e Isaac por acompañarme durante los últimos años de carrera y hacer más amenos los días de estudiante.

A mis amigas y amores de toda la vida Mitzi, Andrea y Génesis gracias por siempre alentarme a continuar, por escucharme, acompañarme en los momentos más difíciles. Me enseñaron que familia no es la de sangre, si no por quien la darías.

Finalmente, gracias a la familia Villareal Anzaldo por abrirnos las perspectivas y las puertas del conocimiento a través de sus libros. Agradezco su apoyo a la familia durante años; sus consejos, pláticas y perspectivas lograron expandir la mente y

conocimiento de una niña curiosa, y enseñarnos que no hay límites para las aspiraciones de la niñez ni para el origen cultural.

ÍNDICE

RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
Generalidades	11
Transmisión	12
Neumonía por pasteurelosis y rinitis atrófica	13
Factores de virulencia	14
Cápsula	15
Lipopolisacáridos (LPS)	16
Proteínas de membrana externa (OMP)	16
Adquisición de hierro	17
Fimbrias y adhesinas	17
Biopelículas	18
Comunicación intercelular Quórum sensing	19
Catecolaminas; Epinefrina y Norepinefrina	20
ANTECEDENTES	21
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
General	24
Particulares	24
METODOLOGÍA	24
Crecimiento bacteriano	24
Obtención de proteínas totales	25
Obtención de proteínas secretadas	25
Cuantificación de proteínas	25
Electroforesis	25
Zimograma	26
Formación de biopelículas	26
Dispersión de biopelículas	26
Unión Rojo Congo	27

RESULTADOS	27
Cinética de crecimiento	27
Patrones de proteínas totales y proteínas secretadas	29
Zimogramas	33
Formación de biopelículas	37
Dispersión de biopelículas	39
Unión a Rojo Congo	40
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Cinética de crecimiento de *P. multocida* sin adiciones (Control) o con norepinefrina (NE)28
- FIGURA 2.** Cinética de crecimiento de *P. multocida* sin adiciones (Control) o con epinefrina (E).....29
- FIGURA 3.** Patrón de proteínas totales de *P. multocida* en gel SDS-PAGE al 10% en presencia de NE (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y con (7) 50 μ M. Las flechas señalan los cambios observados.....30
- FIGURA 4.** Patrón de proteínas totales de *P. multocida* en gel SDS-PAGE al 10% en presencia de E. (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y con (7) 50 μ M. Las flechas señalan los cambios observados.....31
- FIGURA 5.** Patrón de proteínas secretadas de *P. multocida* en gel SDS-PAGE al 10% en presencia de en presencia de NE. (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y con (7) 50 μ M. Las flechas indican los cambios observados.....32
- FIGURA 6.** Patrón de proteínas secretadas de *P. multocida* en gel SDS-PAGE al 10% en presencia de en presencia de E. (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y con (7) 50 μ M. Las flechas indican los cambios observados.....33
- FIGURA 7.** Zimograma con gelatina porcina 1% de proteínas totales de *P. multocida* en presencia de NE. (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y con (7) 50 μ M. Las flechas indican los cambios observados.....34
- FIGURA 8.** Zimograma con gelatina porcina 1% de proteínas totales de *P. multocida* en presencia de E. (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y con (7) 50 μ M. Las flechas indican los cambios observados.....35
- FIGURA 9.** Zimograma con gelatina porcina 1% de proteínas secretadas de *P. multocida* en presencia de NE. (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y con (7) 50 μ M.....36

- FIGURA 10.** Zimograma con gelatina porcina 1% de proteínas secretadas de *P. multocida* en presencia de E. (1) MPM, (2) control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y con (7) 50 μ M. Las flechas indican los cambios observados.....37
- FIGURA 11.** Formación de biopelícula de *P. multocida* en presencia de norepinefrina. Sin adiciones (Control) o con 10, 20, 30, 40, 50 μ M NE.....38
- FIGURA 12.** Formación de biopelícula de *P. multocida* en presencia de epinefrina. Sin adiciones (Control) o con 10, 20, 30, 40, 50 μ M de E.....38
- FIGURA 13.** Dispersión de biopelícula de *P. multocida* en presencia de norepinefrina. Sin adiciones (Control) o con 10, 20, 30, 40, 50 μ M de NE.....39
- FIGURA 14.** Dispersión de biopelícula de *P. multocida* en presencia de epinefrina. Sin adiciones (Control) o con 10, 20, 30, 40, 50 μ M de E.....40
- FIGURA 15.** Capacidad de unión al colorante rojo Congo en presencia de norepinefrina. Sin adiciones (Control) o con 10, 20, 30, 40, 50 μ M de NE.....41
- FIGURA 16.** Capacidad de unión al colorante rojo Congo en presencia de epinefrina. Sin adiciones (Control) o con 10, 20, 30, 40, 50 μ M de E.....41

RESUMEN

Pasteurella multocida, es una bacteria Gram negativa, miembro de la familia *Pasteurellaceae* que forma parte de la microbiota orofaríngea de diversos animales domésticos y silvestres. Se le considera de importancia médica, y económica ya que es un patógeno oportunista que afecta diversos animales incluyendo al ser humano. El presente trabajo tuvo como objetivo analizar el efecto de catecolaminas (10-50 μM): epinefrina (E) y norepinefrina (NE); hormonas asociadas a la respuesta al estrés en el hospedero. Se evaluó el crecimiento bacteriano, patrones proteicos, actividad proteolítica, formación y dispersión de biopelículas y unión de rojo Congo (RC) en *P. multocida*. Tanto E como NE favorecen el crecimiento de *P. multocida* siendo más evidente con NE a partir de las 3h de cultivo, en concentraciones de 30, 40 y 50 μM para ambas hormonas. En los patrones de proteínas totales se observa la disminución de proteínas de 270, 180 y 85 kDa, en presencia de NE y la expresión de 3 bandas en el rango de 80-130 kDa con E. En los patrones de proteínas secretadas, se aprecia la ausencia de una banda de 95 kDa y la expresión de una de 20 kDa con NE y otra de 200 kDa con E. Una banda de actividad proteolítica de 52 kDa se observa con todas las concentraciones de NE pero disminuye con 20-30 μM en muestras de proteínas totales, mientras que con E esta actividad se mantiene. Sin embargo, esta actividad proteolítica desaparece en muestras de proteínas secretadas de cultivos con E y NE. La formación de biopelículas se incrementa en presencia de NE y E de manera dosis dependiente; su dispersión se ve inducida por NE (10-30 μM) pero E la induce de manera dependiente de concentración. Ambas hormonas, incrementan la unión de rojo Congo siendo más significativo con concentraciones con 20 y 30 μM . Estos hallazgos sugieren que las catecolaminas pueden regular la expresión de factores de virulencia en *P. multocida*.

Palabras clave: *Pasteurella multocida*, epinefrina, norepinefrina, factores de virulencia.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

La familia *Pasteurellaceae* alberga un grupo de bacterias Gram negativas, que exhiben una amplia diversidad morfológica y biológica. Estas bacterias, cuyo tamaño oscila entre 0,3 y 1,0 μm de ancho y 1,0 y 2,0 μm de longitud, presentan una forma de cocobacilo pleomórfico que puede variar desde formas cocoides hasta bacilos cortos o filamentosos. Además, se caracterizan por ser bacterias anaerobias facultativas y no esporuladas, y se pueden encontrar tanto aisladas como en agrupaciones, en parejas o cadenas cortas (INSST, 2022).

Dentro del género *Pasteurella*, se engloban actualmente unas 20 especies, en su mayoría consideradas patógenos de animales, pero que en determinadas circunstancias pueden también causar infecciones en los seres humanos (Harper, et al. 2006). A su vez, la especie *Pasteurella multocida* se subdivide en cuatro subespecies; *multocida*, que incluye la especie tipo y otras tres gallicida, septica y tigris (Boyce et al., 2010). La mayoría de las afecciones son producidas por *Pasteurella multocida*, aunque también, con menor frecuencia, pueden afectar al ser humano, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis* y *Pasteurella dagmatis*. (Harper, et al. 2006).

Los aislados de *P. multocida* se clasifican basándose en una combinación de serotipado de polisacáridos capsulares, que distingue a los aislados en uno de los cinco serogrupos capsulares: A (ácido hialurónico), B (arabinosa, manosa y galactosa), D (heparina), E (sin caracterizar) o F (condroitina). Estos a su vez, se subdividen en 16 serovares distintos en función de sus lipopolisacáridos (LPS). Las designaciones de los aislados incluyen una letra que indica el serogrupo capsular, seguida de un número que indica el serovar, por ejemplo, A:1, A:2, A:3, B:2, etc. (Wilson & Ho, 2013).

Transmisión

P. multocida es un patógeno oportunista común entre las poblaciones animales, donde a menudo se encuentran como parte de la microbiota normal de los tractos oral, nasofaríngeo y respiratorio superior de perros, gatos y otros animales, así como de la mayoría del ganado y de los animales domésticos y salvajes, incluidos los pollos, los pavos y otras aves salvajes, bovinos, bisontes, porcinos, conejos, grandes felinos salvajes como tigres, leopardos, pumas y leones, cabras, chimpancés, mamíferos marinos; focas, leones marinos, morsas e incluso dragones de Komodo. (Wilson & Ho, 2013). Muchas especies de *Pasteurella* son patógenos oportunistas que pueden causar enfermedades endémicas y se asocian cada vez más a brotes epizooticos. (INSST, 2022).

La transmisión zoonótica a humanos suele producirse por mordeduras o rasguños de animales o contacto con secreciones nasales, siendo *P. multocida* el patógeno que con mayor frecuencia ha sido observado en infecciones humanas (Wilson, citado en INSST, 2022). Estos microorganismos se conocen por su patogenicidad en el entorno veterinario, pero han llegado a ser también una causa de enfermedad zoonótica en seres humanos (Félix, *et al.* 2002).

En un mundo en el que la mayoría de las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes son zoonóticas por naturaleza y en el que abundan nuestros contactos con animales domésticos y salvajes, cada vez hay más conciencia de la posibilidad de que el ser humano adquiera enfermedades animales (Wilson & Ho, 2013).

P. multocida es capaz de infectar a un amplio espectro de mamíferos domésticos y salvajes, aves y reptiles, así como humanos (Zhongpeng, 2019). Las enfermedades asociadas más comunes en animales de importancia económica para la ganadería mundial incluyen el cólera aviar en especies aviares, la septicemia hemorrágica, la enfermedad respiratoria bovina en rumiantes, la rinitis atrófica progresiva, la pasteurelosis neumónica en cerdos, y el resfriado en conejos. En humanos, las infecciones oportunistas resultantes de heridas por mordeduras o rasguños son

relativamente comunes, especialmente en personas de edad avanzada e inmunocomprometidas, aunque la infección pulmonar crónica en humanos puede resultar de la exposición a secreciones mucosas de animales o mascotas con colonización o infección respiratoria (Zhongpeng, 2019).

P. multocida es uno de los patógenos más importantes que infectan a los conejos, provocando importantes pérdidas económicas en la cría comercial. Las patologías respiratorias en las granjas cunícolas ocupan el segundo lugar en importancia, tanto por su alcance sobre las pérdidas económicas, como por el número de animales infectados y porcentaje de granjas afectadas. La transmisión directa, de conejo a conejo, puede ocurrir a través de aerosoles generados al estornudar o mediante comederos y bebederos compartidos. La capacidad de diseminación de las bacterias juega un papel importante siendo uno de los factores epidemiológicos más influyentes en la evolución clínica del proceso, y tanto los dueños de las granjas, como los veterinarios pueden actuar como vectores de transmisión (Van et al, 2020).

Neumonía por pasteurelisis y rinitis atrófica

El síndrome predominante de la pasteurelisis en animales salvajes y domésticos como los ya mencionados, se manifiesta como una enfermedad respiratoria, afectando tanto las vías respiratorias superiores (rinitis) como las inferiores (neumonía). Los síntomas pueden variar de leves a graves, incluyendo estornudos, secreciones mucosas, rinitis leve, neumonía leve, dificultad respiratoria y fiebre. Estos síntomas pueden progresar a enfermedades más graves, como septicemia hemorrágica y rinitis atrófica, esta última asociada con cepas toxígenas de *P. multocida*.

P. multocida es a menudo endémica en colonias de conejos y manadas de cerdos, causando principalmente rinitis y neumonía, comúnmente conocida como "snuffles". En los conejos, la pasteurelisis se considera una de las enfermedades más comunes y la tasa de prevalencia oscila entre el 4,3 y el 100%. (Yang et al, 2022). En casos graves, los síntomas pueden evolucionar hacia rinitis atrófica, insuficiencia renal, atrofia testicular y esplénica, y necrosis hepática. En conejos, la rinitis atrófica

también puede provocar pérdida de peso, retraso del crecimiento y, frecuentemente, la muerte (Selva, *et al.* 2007). Los serotipos capsulares tóxicos serotipo D y algunas cepas del serotipo A de *P. multocida* se asocian con síntomas más graves de rinitis atrófica en conejos, siendo el serotipo A más prevalente en esta especie (Wilson y Ho,2013). Se sabe que en conejos se puede presentar una rinitis exudativa que va de aguda a crónica, especialmente en animales desatendidos. En algunos casos, puede provocar una neumonía supurativa fulminante. Esto está asociado con la colonización del tracto respiratorio superior por *P. multocida*, principalmente tipo capsular A, sin embargo, el tipo D, también puede estar presente, ya sea en combinación con el tipo A, o solo (Selva et al, 2007)

El primer signo clínico de rinitis es una secreción nasal serosa, que progresa a una secreción mucopurulenta, a medida que aumenta la gravedad de la rinitis. Los conejos con rinitis eventualmente se recuperan, sin embargo, en algunos conejos, las bacterias se propagan a los pulmones, donde pueden causar una neumonía lobular crónica localizada o una neumonía fibrinopurulenta grave y fulminante y pleuritis, en cuyo caso los signos clínicos incluyen tos, fiebre, dificultad respiratoria leve o grave y, finalmente, la muerte (Wilkie *et al.*, 2012).

Factores de virulencia

Los genomas de *P. multocida* albergan muchos genes que codifican factores de virulencia putativos que contribuyen a la patogenia de la bacteria. Estos incluyen la cápsula, LPS, fimbrias, toxinas (PMT), proteínas de adquisición y regulación de hierro, hialuronidasa, enzimas involucradas en el metabolismo del ácido siálico y varias proteínas de membrana externa. Sin embargo, algunos genes de virulencia se detectan solo en un número limitado de aislamientos y, por lo tanto, se asocian principalmente con tipos específicos de enfermedades y/o ciertas especies huésped (Wilkie et al, 2012).

Para mejorar la supervivencia de *P. multocida* en el hospedador, varios factores son cruciales: mecanismos de adquisición de hierro que facilitan el crecimiento in vivo, lipopolisacáridos (LPS) de membrana que proporcionan resistencia sérica, cápsula

que impide o previene la fagocitosis, componentes de superficie con propiedades de adherencia, enzimas como la hialuronidasa, la neuraminidasa y las proteasas que degradan la matriz extracelular, favoreciendo la colonización y diseminación. Además, algunas cepas con alta capacidad de virulencia pueden presentar una toxina dermonecrotica (PMT), que causa rinitis atrófica y dermonecrosis y pueden modular la respuesta inmunitaria (Wilson & Ho, 2013).

Por ejemplo, el tipo genotóxico está presente únicamente en cepas relacionadas con la rinitis atrófica progresiva en cerdos, mientras que el gen *tbpA* (transferrin binding protein A) ha sido reportado exclusivamente en aislamientos de origen bovino y ovino. Varios genes o grupos de genes, identificados a través de técnicas como mutagénesis por transposones y perfiles de expresión genómica, han sido considerados cruciales para entender la virulencia de *P. multocida* (INSST, 2022).

Cápsula

La cápsula de *P. multocida* es una estructura hidrofílica que es crucial para la virulencia de la bacteria, ya que inhibe la fagocitosis y la opsonización, que es la marcación mediada por complemento, impidiendo que el sistema inmune elimine de manera eficaz a la bacteria. La pérdida de la capacidad de biosíntesis de la capsula da lugar a cepas altamente atenuadas, es decir que ha perdido gran parte de su capacidad para causar enfermedad severa en comparación con su forma original o con otras cepas más virulentas (Wilson & Ho, 2013).

La composición de la cápsula de *P. multocida* varía entre los serotipos. En el serotipo A, la cápsula está compuesta principalmente de ácido hialurónico. Este componente confiere a la cápsula propiedades anti fagocíticas, facilitando la colonización del tracto respiratorio inferior en humanos. (Wilson & Ho, 2013).

Las cápsulas de los serogrupos D y F están compuestas por heparina y condroitina, respectivamente. Aunque los componentes de polisacáridos capsulares de los tipos D y F están estrechamente relacionados, son químicamente distintos del ácido hialurónico del tipo A. Por otro lado, la cápsula del serotipo B consiste en componentes de arabinosa, manosa y galactosa, mientras que la composición de la

cápsula del serotipo E aún no ha sido caracterizada (Zhongpeng *et al*, 2019). La presencia y la estructura específica de la cápsula en diferentes serotipos de *P. multocida* son determinantes clave de su virulencia y capacidad para causar enfermedad, reflejando su adaptación a diferentes hospedadores y entornos.

Lipopolisacáridos (LPS)

Los lipopolisacáridos (LPS) de *P. multocida* desempeñan un papel crucial en su virulencia al conferir resistencia al complemento sérico y proteger contra la fagocitosis (Wilson & Ho, 2013). Los LPS de *P. multocida* se caracteriza por dos glicofomas principales, designadas como tipo A y tipo B, que cambian en la estructura de su núcleo interno, pero comparten un núcleo externo en común. Este polisacárido complejo, compuesto por un extremo de lípido A hidrofóbico y un esqueleto de oligosacárido de núcleo interno y externo, ayuda a la resistencia y adaptabilidad de *P. multocida* en diferentes entornos hospedadores (Zhongpeng *et al*, 2019). Los LPS de *P. multocida* no solo son importantes para evitar la respuesta inmunitaria del hospedador mediante la resistencia al complemento, también juegan un papel crucial en la especificidad de la infección según el serovar.

Proteínas de membrana externa (OMP)

Las proteínas de membrana externa (OMP), son esenciales para las bacterias, representando entre el 20 y 30 % de todos los genes bacterianos y aproximadamente el 50 % de la masa total de la membrana externa. Sin embargo, de las OMP conocidas para las bacterias, sólo se han resuelto proteínas pertenecientes a unos 25 grupos estructurales distintivos (Hatfaludi *et al*, 2010).

En *P. multocida*, las OMP juegan roles cruciales en la adquisición de nutrientes, el transporte de moléculas y iones y las interacciones bacteria-huésped. Estas OMP se clasifican en varias categorías funcionales, incluyendo proteínas estructurales, de transporte, de unión, adhesinas, maquinaria de ensamblaje de proteínas y enzimas asociadas a la membrana (Zhongpeng *et al*, 2019).

Adquisición de hierro

La adquisición de hierro es crucial para la supervivencia y patogenicidad de *P. multocida*. Esta bacteria ha desarrollado múltiples mecanismos para captar hierro del huésped debido a la limitada disponibilidad de hierro libre in vivo. El análisis del genoma de *P. multocida* PM70 mostró que más del 2,5 % de sus genes codifican proteínas relacionadas con la captación de hierro (Harper et al, 2006).

P. multocida produce proteínas de membrana externa reguladas por los niveles de hierro, conocidas como IROMPs, que son importantes para la inmunidad de protección cruzada en el huésped (Zhongpeng et al, 2019).

Un componente clave en la adquisición de hierro es el receptor de transferrina TbpA, presente en algunos aislamientos bovinos y ovinos de *P. multocida*. La capacidad de *P. multocida* para adquirir hierro a través de estos sistemas es fundamental para su patogenicidad y especificidad de huésped, permitiendo infectar a múltiples especies (Wilson & Ho, 2013).

Fimbrias y adhesinas

Las fimbrias y adhesinas son componentes clave en el proceso de adhesión de las bacterias a las células del huésped y a las superficies, siendo un proceso fundamental para la infección bacteriana. En el caso de *P. multocida*, se han identificado muchos genes, incluidos *ptfA*, *fimA*, *flp1*, *flp2*, *hsf_1* y *hsf_2*, que codifican proteínas similares a las fimbrias o fibrillas de otras bacterias. Las fimbrias, también conocidas como pili de tipo IV, se han reportado en varias cepas de *P. multocida* del serotipo A que pueden adherirse al epitelio de la mucosa. Estas estructuras fimbriales, aisladas y caracterizadas en los serotipos A, B y D de *P. multocida*, están asociadas con la virulencia en otras bacterias debido a su papel en la adhesión a las superficies celulares del hospedador (Harper et al, 2006).

La adhesión a las células del huésped y a las proteínas de la matriz extracelular es un requisito fundamental para las infecciones bacterianas, y las adhesinas que

median dicha adhesión son factores potenciales de virulencia. Muchas bacterias producen múltiples adhesinas para asegurar su adherencia y posterior infección. Por ejemplo, *Haemophilus influenzae* expresa adhesinas como Hap y Hia/Hsf, que facilitan la unión a las células del huésped. Estas adhesinas permiten a las bacterias colonizar y establecer infecciones en los tejidos del huésped, lo que resalta su importancia como factores de virulencia esenciales (Hatfaludi et al, 2010).

Biopelículas

Las biopelículas son comunidades complejas de microorganismos que se adhieren mayoritariamente a superficies y están encapsuladas en una matriz extracelular autogenerada. Estas estructuras pueden formarse en una variedad de ambientes. Una característica clave de las biopelículas es su capacidad para proteger a los microorganismos que forman parte de ellas, de condiciones adversas, como la desecación, la acción de agentes antimicrobianos y la respuesta del sistema inmune del huésped. Esta protección se debe en gran medida a la matriz extracelular, que está compuesta por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. La matriz no solo protege a las células bacterianas, sino que también facilita la comunicación entre ellas a través de un proceso conocido como "quórum sensing", el cual permite a las bacterias coordinar sus actividades en función de la densidad celular (García et al, 2020)

Un aspecto importante de las biopelículas es su formación en etapas. Inicialmente, las bacterias planctónicas se adhieren a una superficie mediante fuerzas físicas y adhesinas específicas. Una vez adheridas, comienzan a proliferar y producir la matriz extracelular, formando micro colonias. A medida que la biopelícula madura, se desarrolla una estructura tridimensional compleja con canales que permiten la circulación de nutrientes y desechos. Finalmente, en una fase de dispersión, algunas células bacterianas pueden abandonar la biopelícula para colonizar nuevas superficies (Flemming & Wingender, 2010)

Comunicación intercelular Quórum sensing

El funcionamiento eficiente para la supervivencia de las especies microbianas depende en gran medida de la comunicación intercelular conocida como quórum sensing (QS), que es uno de los sistemas reguladores más importante para las bacterias. Este sistema permite la transferencia de información entre células individuales mediante vías de señalización químicas, conocidas como autoinductores (AI) o feromonas de detección de quorum. Estas moléculas de señalización son esenciales para la coordinación de diferentes eventos que resultan vitales como: la patogenicidad, la formación de biopelículas, la biosíntesis de pigmentos y antibióticos, y la adquisición de competencia entre bacterias Gram negativas y Gram positivas (Yajima, 2016)

El QS facilita la comunicación entre microorganismos dentro de las biopelículas sean o no de la misma especie bacteriana, permitiéndoles una interacción química para una respuesta a cambios ambientales de manera coordinada, similar a los organismos multicelulares. Las bacterias sintetizan y exportan autoinductores, y una vez que estas moléculas han alcanzado una determinada concentración, las bacterias perciben su presencia y se activa una cascada de señalización activando cambios en la expresión genética y el comportamiento dentro de las biopelículas. Esta cascada de señalización promueve simultáneamente la expresión masiva de factores de virulencia y patogenicidad, beneficiando a la población bacteriana en conjunto (Prazdnova et al, 2024)

Las bacterias monitorean su propia densidad de población detectando la densidad vecina de estos compuestos de señal difusibles. La concentración de la feromona QS se mantiene en un nivel bajo cuando la densidad celular es baja. Por otro lado, cuando la concentración de la feromona QS alcanza niveles umbral con una alta densidad celular, los organismos exhiben un comportamiento cooperativo al coordinar su expresión genética y activar una respuesta (Yajima, 2016).

Es importante mencionar que el QS varía entre bacterias Gram negativas y Gram positivas. Las Gram negativas utilizan moléculas de acilhomoserin lactonas para la

comunicación intraespecífica, mientras que las Gram positivas utilizan péptidos para la transducción de señales intercelulares. Existe también un tercer sistema de transducción de señales, común en ambos tipos de bacterias, basado en un derivado de la 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), conocido como autoinductor-2 (AI-2) (Prazdnova et al, 2024).

Además, la comunicación intercelular no se limita a bacterias de la misma especie, puede existir comunicación entre diversas especies a través de AI-2 y esta comunicación también puede involucrar a otros reinos, facilitando la interacción y coordinación entre diferentes especies microbianas y sus huéspedes. Por ejemplo, algunas bacterias pueden comunicarse con otros microorganismos como hongos y arqueas mediante señales químicas, y ciertos patógenos pueden interferir con las señales hormonales del hospedador para manipular el sistema inmune y promover su propia supervivencia o desencadenar procesos como la esporulación o la formación de cuerpos fructíferos (Yajima, 2016), por ejemplo algas verdes del género *Enteromorpha* interactúan con cepas de *Vibrio anguillarum* productoras de son moléculas AI como AHL (N-acil-homoserin lactonas), durante la formación de biopelículas (García et al, 2020).

Catecolaminas; Epinefrina y norepinefrina

El término «catecolamina» (CA) designa a todos los compuestos que contienen el grupo catecol (ortodihidroxibenceno) y una cadena lateral con un grupo amino: el núcleo catecol. Las catecolaminas de importancia fisiológica son la dopamina (DA), noradrenalina o norepinefrina (NE) y adrenalina o también epinefrina (E). Las catecolaminas son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina. La epinefrina es sintetizada y almacenada en la médula adrenal y liberada hacia la circulación sistémica. La noradrenalina es sintetizada y almacenada no solamente en la médula adrenal, también en los nervios simpáticos periféricos (Gutiérrez-García & Sánchez-Ocampo, 2016).

Las catecolaminas son conocidas como mediadores de la respuesta al estrés por su relación con el sistema inmune. La respuesta al estrés está controlada por el

sistema nervioso central (SNC) y la coordinación que éste ejerce sobre los tres sistemas encargados de mantener la homeostasis; autónomo, endocrino e inmune.

La exposición de un organismo a situaciones desafiantes activa ciertas células nerviosas en la médula espinal, conocidas como neuronas preganglionares simpáticas. Estas neuronas liberan noradrenalina. Además, la estimulación del sistema nervioso simpático también motiva a las células cromafines a liberar adrenalina en la sangre. La adrenalina, por su parte, provoca cambios en el cuerpo, incrementa la velocidad del corazón y de la respiración, y dirige más sangre hacia los músculos, preparando a los organismos para dos posibles respuestas: luchar o huir ante una situación desafiante. En momentos de estrés, tanto las hormonas glucocorticoides como las catecolaminas son liberadas en el cuerpo. Estas hormonas tienen un papel en la regulación del sistema inmunológico, ayudando a mantenerlo en equilibrio y también para influir en el sistema inmunológico (Gómez & Escobar, 2006).

En la comunicación Inter reino, comunicación hospedero-parasito, participan moléculas liberadas por el hospedador o por el patógeno. Estas moléculas son de una amplia gama, incluidas están las hormonas, tanto sexuales como del estrés (Yajima, 2016).

ANTECEDENTES

Rea Hernández en 2022, realizó un estudio acerca del efecto de la epinefrina y norepinefrina sobre la expresión de factores de virulencia en *Gallibacterium anatis*, biovar hemolytico y no hemolítico; obteniendo que la presencia de epinefrina o norepinefrina en concentraciones de 10 a 50 uM en el medio de cultivo, favorecen el crecimiento de ambos biovares, aunque no significativamente el de la no-hemolítica. La presencia de hormonas provocó una disminución en la formación de biopelícula en ambas cepas y la expresión de probables factores de virulencia de *G. anatis*, indicando que esta bacteria responde al estrés de su hospedador.

Yang, y colaboradores en 2022, realizaron un estudio de patogenicidad, colonización y respuesta inmune innata a *Pasteurella multocida* en conejos, observaron que los síntomas clínicos evidentes de los conejos fueron disnea severa y líquido nasal seroso. Durante el curso de la enfermedad, las muertes alcanzaron su punto máximo dos días después de la infección y la tasa de mortalidad fue del 60%. Concluyendo que *P. multocida* puede replicarse rápidamente en diversos tejidos del conejo y causar bacteriemia después de la infección. Sugieren que las vías de señalización de los TLR (toll-like receptors) se activaron después de la infección por *P. multocida*, induciendo significativamente la expresión de citocinas proinflamatorias, que podrían ser la principal causa de inflamación respiratoria y septicemia.

Yang y colaboradores en el 2021 determinaron que eliminando *qseC* de *Pasteurella multocida* se produce una baja de la virulencia y se promueve la protección cruzada al usar esta cepa mutante en ensayos de inmunización cruzada. Ellos trabajaron con nueve cepas diferentes, además de construir una cepa complementaria y mutante, obteniendo que la mutante había reducido significativamente su producción de cápsula, pero había aumentado la resistencia al estrés oxidativo y la presión osmótica. La eliminación de *qseC* también condujo a un aumento significativo en la expresión de *qseB*. El análisis de secuenciación del transcriptoma mostró que 1245 genes estaban regulados por *qseC*. Finalmente, indicaron que QseC regula la producción capsular y la virulencia en *P. multocida*.

Bautista Betancourt en 2020 estudió el impacto NE y E en la expresión de proteínas en *Actinobacillus seminis*. Ella trabajó con tres cepas (una de referencia y dos aislados de campo (A4 y A8)) y observó que el crecimiento no es afectado por la presencia de las hormonas, pero los patrones de proteínas mostraron diferencias generadas por las hormonas, estas diferencias también fueron evidentes en el reconocimiento inmune usando un suero de borrego con epididimitis. La presencia de hormonas afectó la formación de biopelículas e indujo la dispersión de las biopelículas previamente 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.

Wilkie y colaboradores en 2012, realizaron un estudio sobre la patogénesis y enfermedades de *P. multocida*, concluyendo que, gracias a las propiedades bioquímicas y serológicas de dicha bacteria, es que pueden ser responsables de los síndromes causados. Además, gracias a los nuevos sistemas de manipulación genética se puede tener un mayor entendimiento en los factores de virulencia que son empleados en esta bacteria.

Belay y Sonnenfeld 2002, analizaron el efecto de las catecolaminas en cuatro bacterias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*, encontrando que la dopamina o el isoproterenol inducen un marcado aumento en su crecimiento, en comparación con los controles, mientras que la dopamina solo favorece el crecimiento de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, mientras que la epinefrina y el isoproterenol mejoran el crecimiento, aunque en menor medida, de *E. coli*.

Belay y colaboradores, 2003 examinaron los efectos de las catecolaminas en el crecimiento *in vitro* de seis especies bacterianas: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteriodes fragilis*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnie*, *Enterobacter Sp* y *Salmonella choleraesuis*. El estudio indicó que la suplementación de cultivos bacterianos en medio mínimo con norepinefrina o epinefrina no resultó en un mayor crecimiento de bacterias. Controles positivos de *E. coli* con catecolaminas resultaron en un mayor crecimiento de esa especie bacteriana. Por lo que, aunque la respuesta al estrés parasimpático del huésped puede contribuir a la patogénesis de algunas bacterias, como *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, se muestra una capacidad diferencial de las catecolaminas para mejorar el crecimiento bacteriano *in vitro*.

JUSTIFICACIÓN

P. multocida es un patógeno oportunista capaz de infectar una amplia variedad de organismos, causando diversas afecciones en el sistema respiratorio, además de presentar importancia económica y afectar al sector salud por ser una enfermedad de transmisión zoonótica. Este microorganismo podría presentar diferentes

respuestas ante el estrés de su hospedero, produciendo modificaciones en su potencial patogénico.

HIPÓTESIS

El cultivo de *P. multocida* en medios con diferentes concentraciones de catecolaminas; epinefrina y norepinefrina, favorecerá su crecimiento e inducirá un cambio de la expresión de factores de virulencia de dicha bacteria.

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto de la Norepinefrina (NE) y la Epinefrina (E) en el crecimiento y la expresión de factores de virulencia en *P. multocida*

Particulares

- Evaluar el efecto de NE y E sobre el crecimiento de *P. multocida*.
- Evaluar los cambios en los patrones de proteínas y la actividad proteolítica de proteínas totales y secretadas de *P. multocida* en presencia de NE y E.
- Determinar el efecto de NE y E en la formación y dispersión de biopelícula de *P. multocida*.
- Evaluar la capacidad de unión del colorante rojo Congo por *P. multocida* en presencia de NE y E, como indicativo de posible presencia de proteínas amiloides.

METODOLOGÍA

Crecimiento bacteriano

Se trabajó con una cepa de *P. multocida* aislada de conejo con problemas respiratorios, que fue sembrada en agar Brain-Heart infusión (BHI) para su crecimiento. Las catecolaminas se emplearon en concentraciones de 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M y 50 μ M.

Para evaluar el efecto de E o NE en el crecimiento de *P. multocida*, se inocularon tubos con medio BHI con un inóculo al 1%. Se añadieron las hormonas y se realizaron lecturas espectrofotométricas a 600 nm cada hora durante 24 horas hasta alcanzar una fase estacionaria. Los ensayos se replicaron por triplicado (Ramírez, 2022).

Obtención de proteínas totales

Se llevó a cabo una centrifugación de los cultivos de 24 horas durante 25 minutos a 10,500 rpm. Las pastillas celulares se suspendieron con 500µl de HEPES 20mM pH 7.4 y lisozima 10 mM y se dejó incubar durante 1 hora a 37°C con agitación. Posteriormente, las muestras se sonicaron durante siete minutos, con ciclos de 15 segundos de pulso por 10 segundos de reposo. Posterior a esto, se realizó una segunda centrifugación a 13,400 rpm durante dos minutos para recuperar el sobrenadante que contenían las proteínas totales (Bautista-Betancourt, 2020).

Obtención de proteínas secretadas

Estas se recuperaron a partir del sobrenadante de cultivo libre de células, utilizando como agente precipitante sulfato de amonio con una saturación al 60% colocándolas en refrigeración por 12 horas. Posteriormente fueron centrifugadas 25 minutos a 10,500 rpm, desechando el sobrenadante y suspendiendo la pastilla en un volumen proporcional de Buffer PBS 1x (Bautista-Betancourt, 2020).

Cuantificación de proteínas

Con el fin de determinar la concentración de proteína de las muestras, la cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Bautista-Betancourt, 2020).

Electroforesis

Con el fin de determinar los posibles cambios en los patrones de proteína de *P. multocida* crecida en presencia de diferentes concentraciones de hormonas, se realizó la separación electroforética de las muestras en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% cargando 10 µg/ml. (Rea Hernández, 2022)

Zimograma

Para determinar la expresión de actividades proteolíticas se realizaron zimogramas en gel de poliacrilamida al 10% copolimerizado con gelatina porcina al 0.1%, posteriormente a la separación electroforética, los geles serán incubados en agitación durante 1 hora con una solución de Tritón X-100 al 1.5%, seguidamente los geles fueron incubados en Tris-HCl 20 mM pH 7.4, CaCl₂, 10 mM durante una noche a 37°C (Rea Hernández, 2022). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie, el exceso de colorante fue eliminado con una solución de ácido acético al 10% (Negrete et al. 1999).

Formación de biopelículas

Para evaluar los efectos de la N y E sobre la formación de biopelícula, se realizaron precultivos de la cepa en medio BHI y se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 600 nm. La formación de biopelículas fue inducida en placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos, llenados con medio BHI e inoculados con la cepa. La placa se incubó a 39°C durante 48 horas. Se utilizó medio sin células como blanco y cultivos sin hormonas como control negativo (García *et al*, 2020).

Tras la incubación, se retiró el medio de los pozos y se fijó la biopelícula con metanol. Se adicionó a cada pozo cristal violeta al 1% durante 15 minutos. El exceso de colorante se eliminó con agua corriente. Luego se añadió ácido acético glacial al 30% y se incubó durante 30 minutos para recuperar el colorante absorbido por las células. Las muestras se diluyeron 1:5 con ácido acético glacial al 30%, y la densidad óptica se determinó en un lector de placas a 630 nm (Fredheim et al., 2009).

Dispersión de biopelículas

La placa se incubó por 24 horas a 37°C. Una vez formada la biopelícula, se retiró el medio y se sustituyó por una solución de agua estéril con las concentraciones de catecolaminas utilizadas previamente. La placa se incubó por 30 minutos a 37°C. El procesamiento de la placa y las lecturas se realizaron de la misma manera como se describió previamente (Bautista-Betancourt, 2020).

Unión Rojo Congo

A partir de un cultivo de 24 horas a 37 °C, se realizó una suspensión bacteriana ajustando la densidad óptica a 1.0 (\pm 0.2) a 600 nm. Se tomaron alícuotas de 1 ml de esta suspensión, las cuales se centrifugaron a 13,300 rpm durante 2 minutos. La pastilla resultante se homogenizó con PBS / RC (50 μ g /ml) manteniéndola en agitación constante durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 13,300 rpm durante 5 minutos para recuperar los sobrenadantes. La absorbancia se midió a 480 nm interpolando los datos en una gráfica para su análisis (Montes-García, 2015).

RESULTADOS

Cinética de crecimiento

El crecimiento de la cepa de *P. multocida* aislada de conejo incrementó de manera exponencial con todas las concentraciones de NE (10-50 μ M) respecto al control, siendo más evidente este crecimiento con las concentraciones de 30, 40 y 50 μ M (Figura 1). E también indujo un crecimiento exponencial, siendo las concentraciones de 40 y 50 μ M las que provocaron un mayor incremento en el crecimiento (Figura 2).

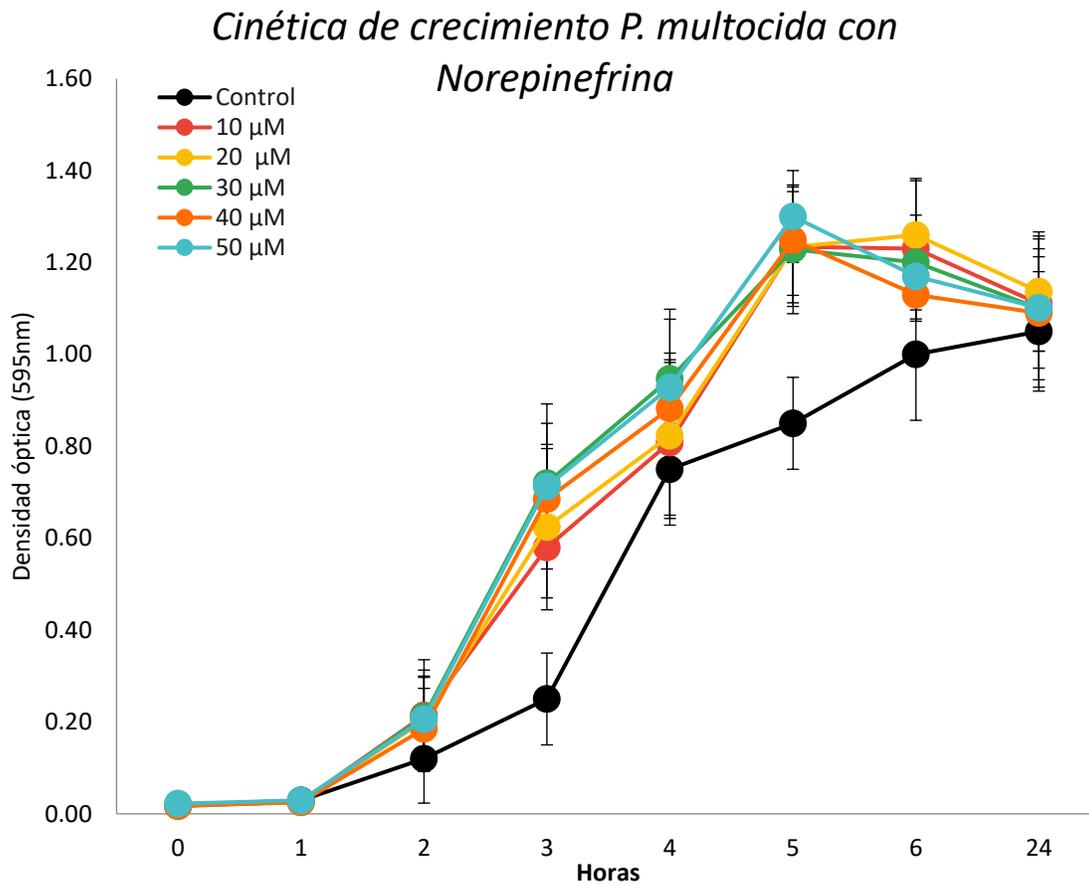


FIGURA 1. Cinética de crecimiento de la cepa de *P. multocida* sin adiciones (Control) o con norepinefrina (NE).

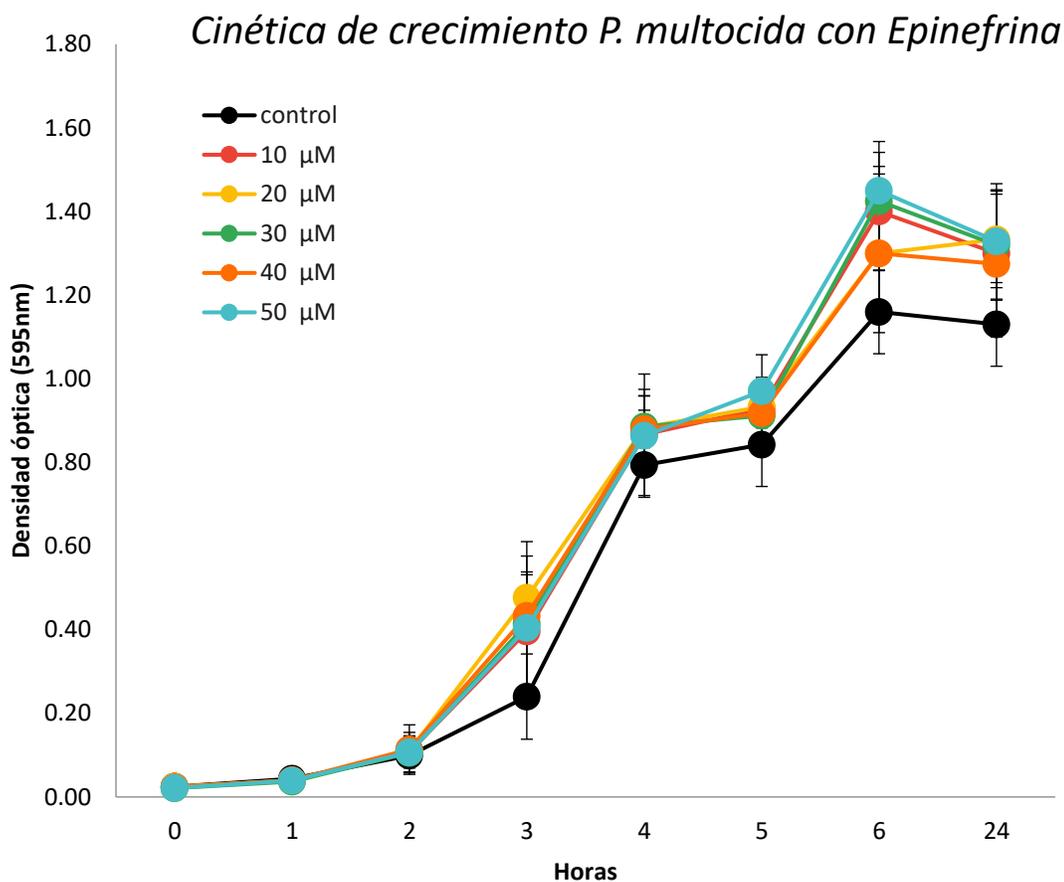


FIGURA 2. Cinética de crecimiento de la cepa de *P. multocida* sin adiciones (Control) o con epinefrina (E).

Patrones de proteínas totales y proteínas secretadas

En el patrón de proteínas de extractos totales de cultivos en presencia de NE (Figura 3), se observa una disminución de bandas de 260 y 170 kDa en concentraciones de 40 y 50μM, también de bandas de 100 kDa con concentraciones de 30 a 50μM, y de bandas 25 y 30 kDa con concentraciones de 30 y 40μM.

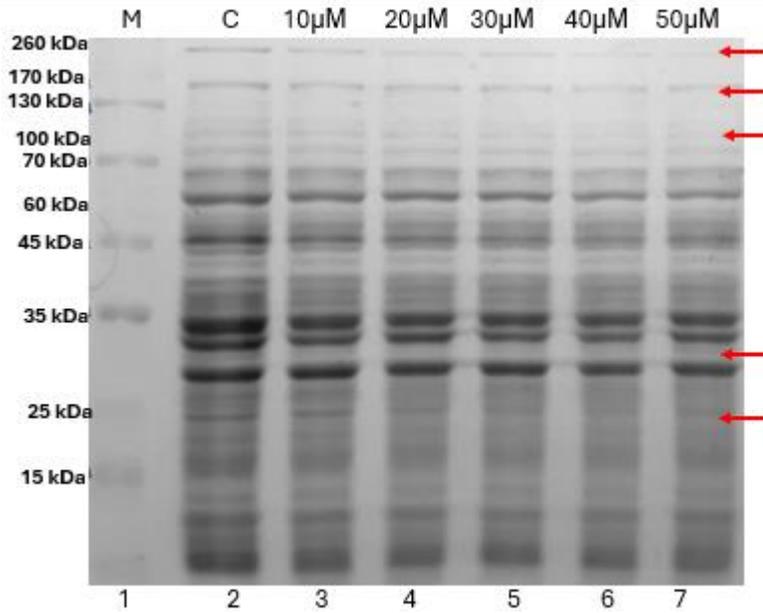


FIGURA 3. Patrón de proteínas totales de *P. multocida* en gel SDS-PAGE al 10% en presencia de NE (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10µM, (4) 20µM, (5) 30µM, (6) 40µM y con (7) 50µM. Las flechas señalan los cambios observados.

El patrón de proteínas de extractos totales donde se añadió E induce la expresión de bandas de 125, 115 y 105 kDa a las concentraciones de 20 a 40µM, además de la expresión de bandas de 40 y 25 kDa con 10 µM (Figura 4).

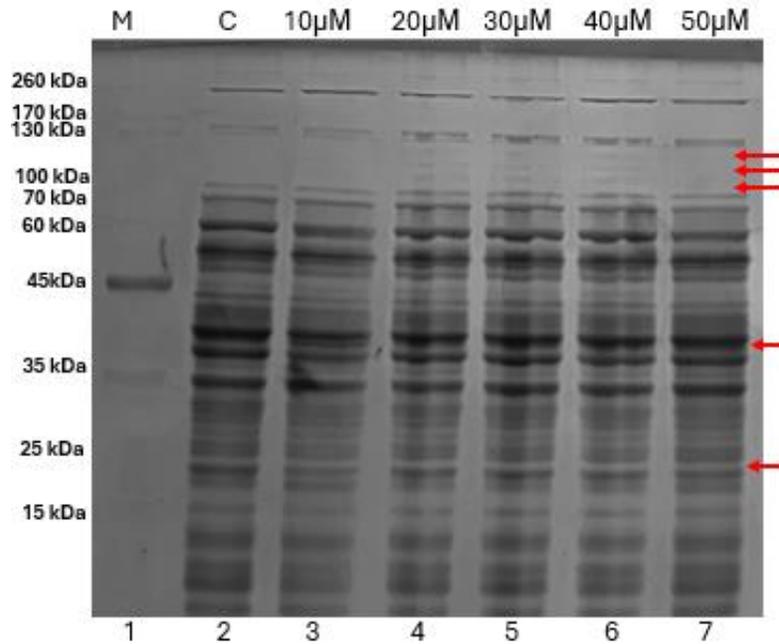


FIGURA 4. Patrón de proteínas totales de *P. multocida* en gel SDS-PAGE al 10% en presencia de E . (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10µM, (4) 20µM, (5) 30µM, (6) 40µM y con (7) 50µM. Las flechas señalan los cambios observados.

En el patrón de proteínas secretadas de cultivos en presencia de NE (Figura 5), se observa una ausencia de bandas de 260 y 170 kDa con 10 y 30 µM. Mientras que en los patrones de proteínas secretadas en presencia de E se observaron cambios en bandas de 260, 37 y 30 kDa con 20 y 50µM (figura 6).

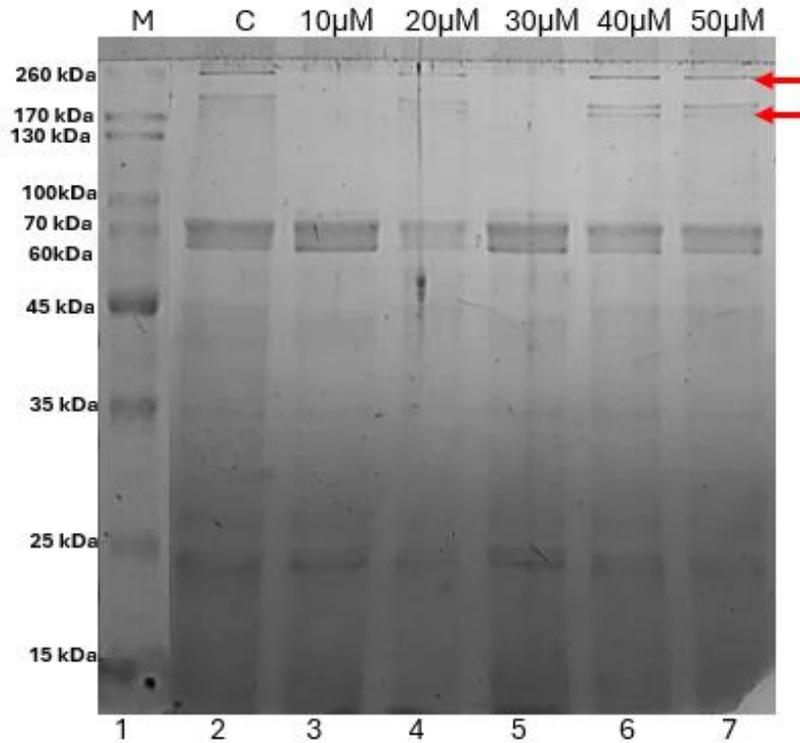


FIGURA 5. Patrón de proteínas secretadas de *P. multocida* en gel SDS-PAGE al 10% en presencia de NE. (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10μM, (4) 20μM, (5) 30μM, (6) 40μM y con (7) 50μM. Las flechas indican los cambios observados.

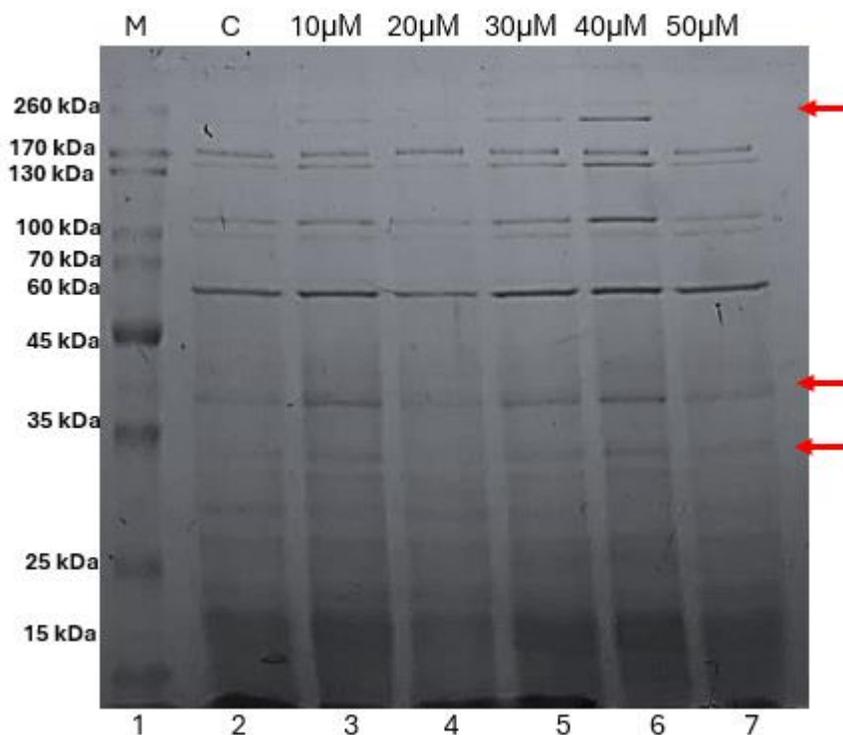


FIGURA 6. Patrón de proteínas secretadas de *P. multocida* en gel SDS-PAGE al 10% en presencia de E. (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10µM, (4) 20µM, (5) 30µM, (6) 40µM y con (7) 50µM. Las flechas indican los cambios observados.

Zimogramas

En los zimogramas, se observó actividad proteolítica en presencia de ambas hormonas con muestras de proteínas totales. La adición de NE en concentraciones de 20-30 µM disminuye la banda de actividad proteolítica de 45 kDa, siendo más evidente con 20 µM (Fig. 7)

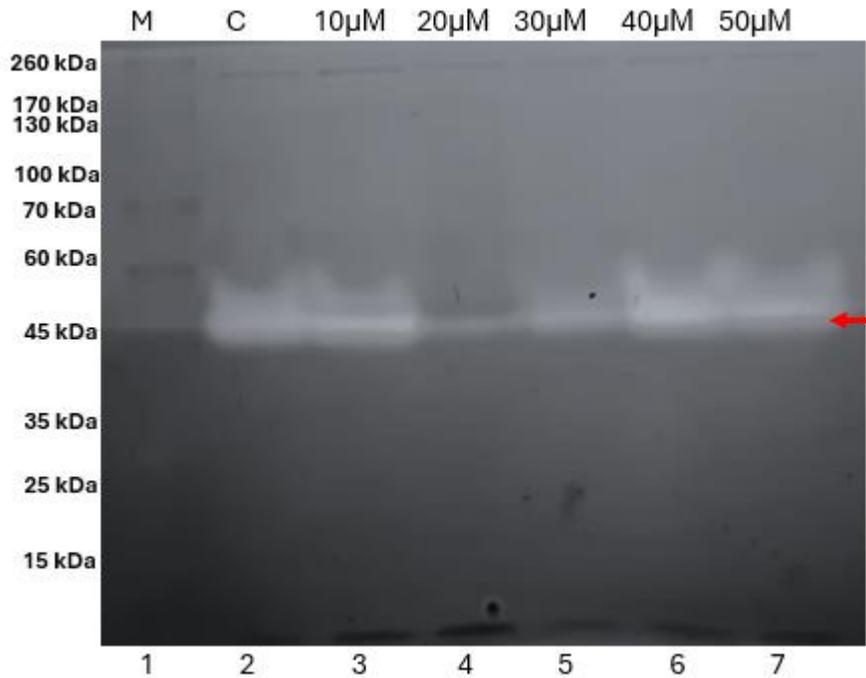


FIGURA 7. Zimograma 10% con gelatina porcina 1% de proteínas totales de *P. multocida* en presencia de NE. (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10µM, (4) 20µM, (5) 30µM, (6) 40µM y con (7) 50µM. Las flechas indican los cambios observados.

Por el contrario, en presencia de E todas las muestras presentaron un aumento en la actividad proteolítica respecto al control en la banda de actividad de 45 kDa. Con 30 µM se aprecia actividad proteolítica a 170 kDa (Figura 8).

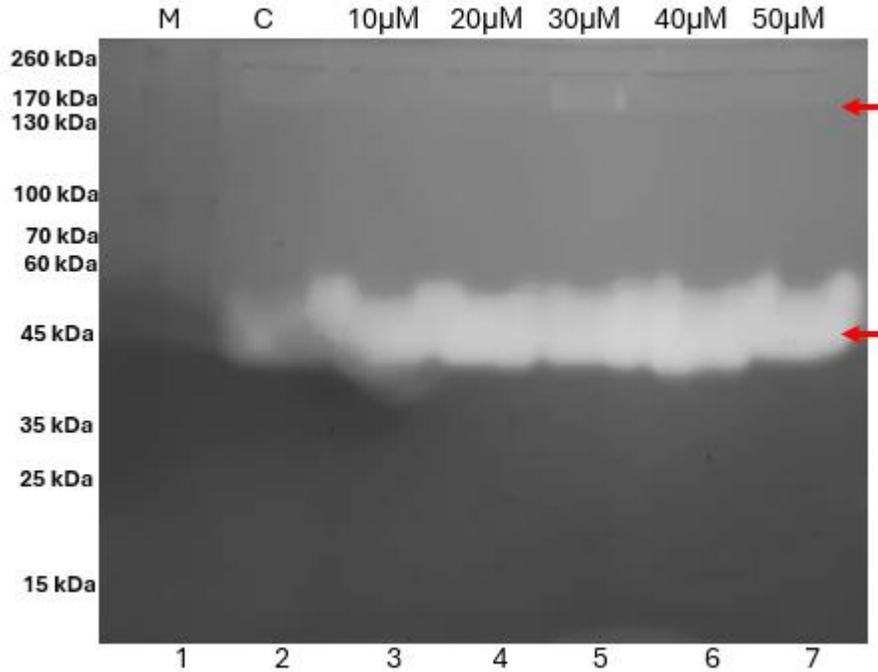


FIGURA 8. Zimograma 10% con gelatina porcina 1% de proteínas totales de *P. multocida* en presencia de E. (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10µM, (4) 20µM, (5) 30µM, (6) 40µM y con (7) 50µM. La flecha indica los cambios observados.

La presencia de las catecolaminas tuvo efectos adversos en los zimogramas de proteínas secretadas. En presencia de NE, aunque se observa actividad proteolítica a 40 kDa, no se observaron cambios (Figura 9).

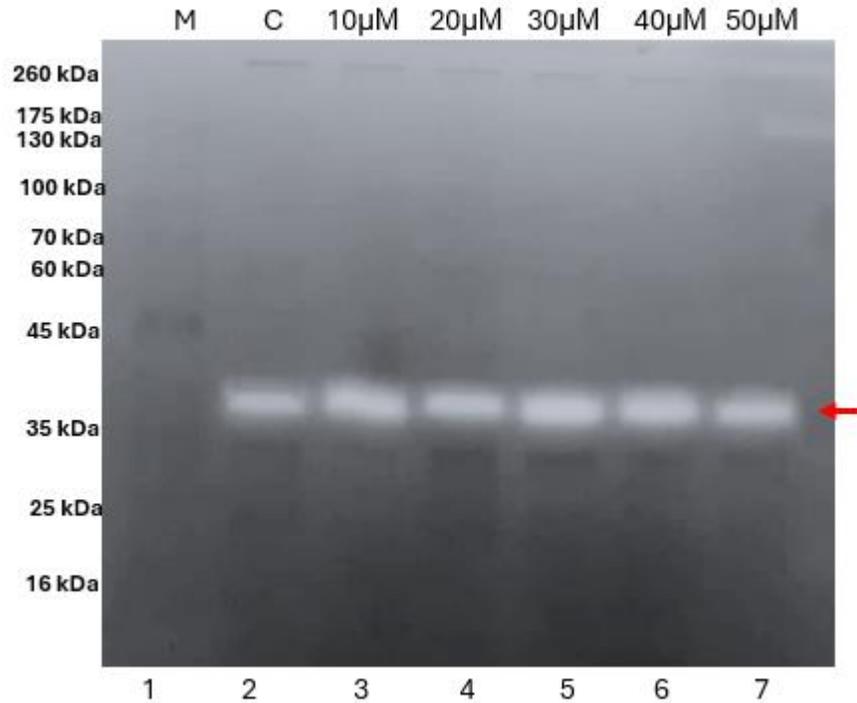


FIGURA 9. Zimograma con gelatina porcina 1% de proteínas secretadas de *P. multocida* en presencia de NE. (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10µM, (4) 20µM, (5) 30µM, (6) 40µM y con (7) 50µM.

Sin embargo, la actividad proteolítica a 50 kDa se ve inhibida en todas las concentraciones por la presencia de E. Bandas de actividad proteolítica de 40 kDa disminuyen en presencia de 50 µM (Fig. 10)

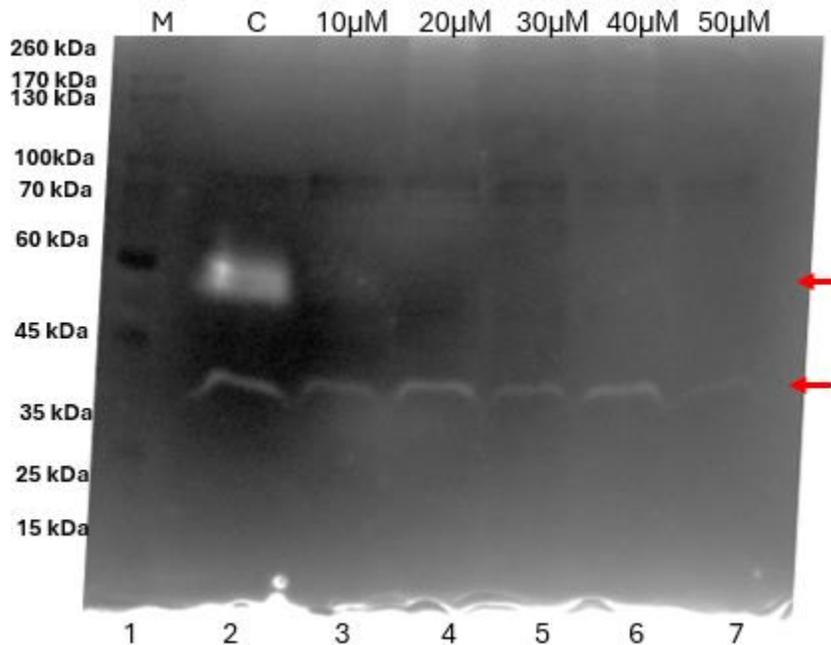


FIGURA 10. Zimograma con gelatina porcina 1% de proteínas secretadas de *P. multocida* en presencia de *E. coli*. (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10µM, (4) 20µM, (5) 30µM, (6) 40µM y con (7) 50µM. Las flechas indican los cambios observados.

Formación de biopelículas

La adición de NE indujo un aumento de la formación de biopelícula de una manera dosis dependiente siendo más evidente a 50µM (Figura 11).

Un efecto similar fue observado con la adición de E con 40 y 50µM presentando un aumento más significativo respecto al control (Figura 12).

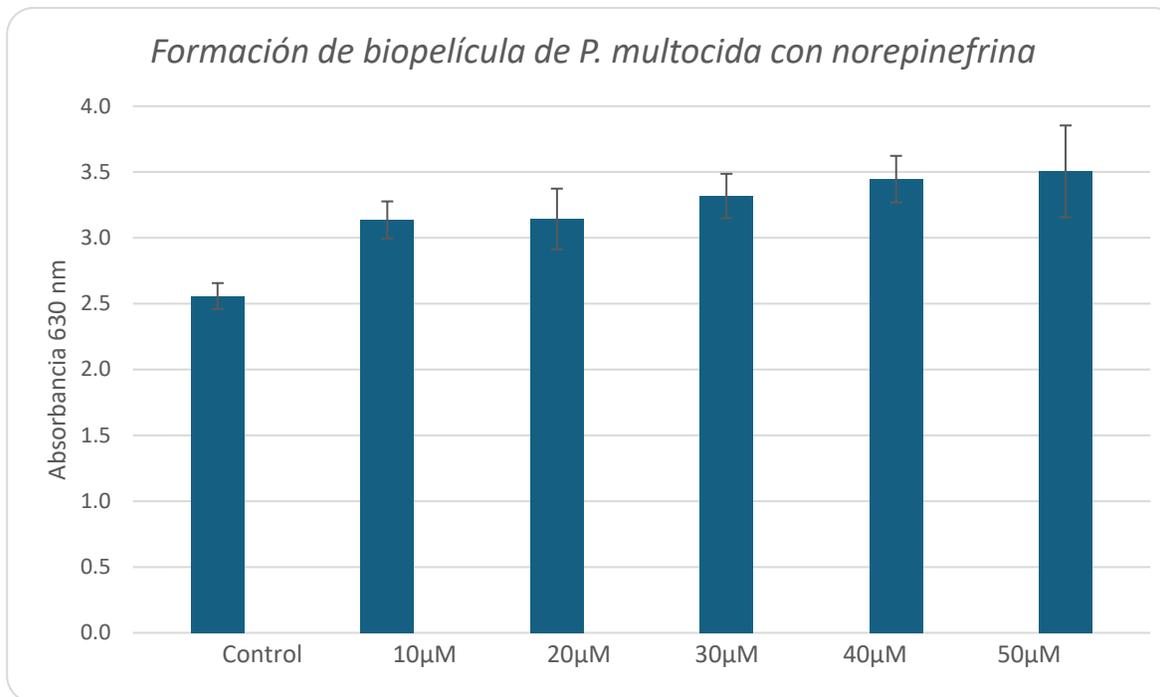


FIGURA 11. Formación de biopelícula de *P. multocida* en presencia de norepinefrina. Sin adiciones (Control) o con 10, 20, 30, 40, 50 µM NE.

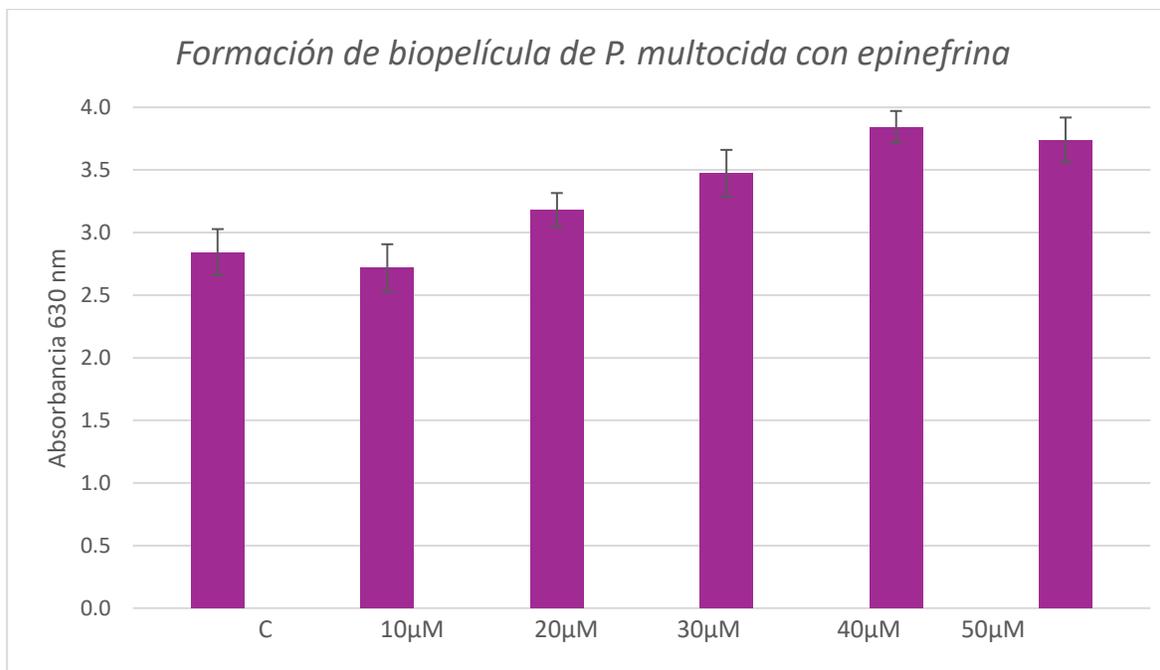


FIGURA 12. Formación de biopelícula de *P. multocida* en presencia de epinefrina. Sin adiciones (Control) o con 10, 20, 30, 40, 50 µM de E.

Dispersión de biopelículas

La dispersión de biopelícula en presencia de NE disminuye conforme se incrementa la concentración de la hormona (Figura 13). En presencia de E la dispersión de la biopelícula es dependiente de la concentración, aunque entre 30-50 μM , el porcentaje de dispersión se mantiene (figura 14).

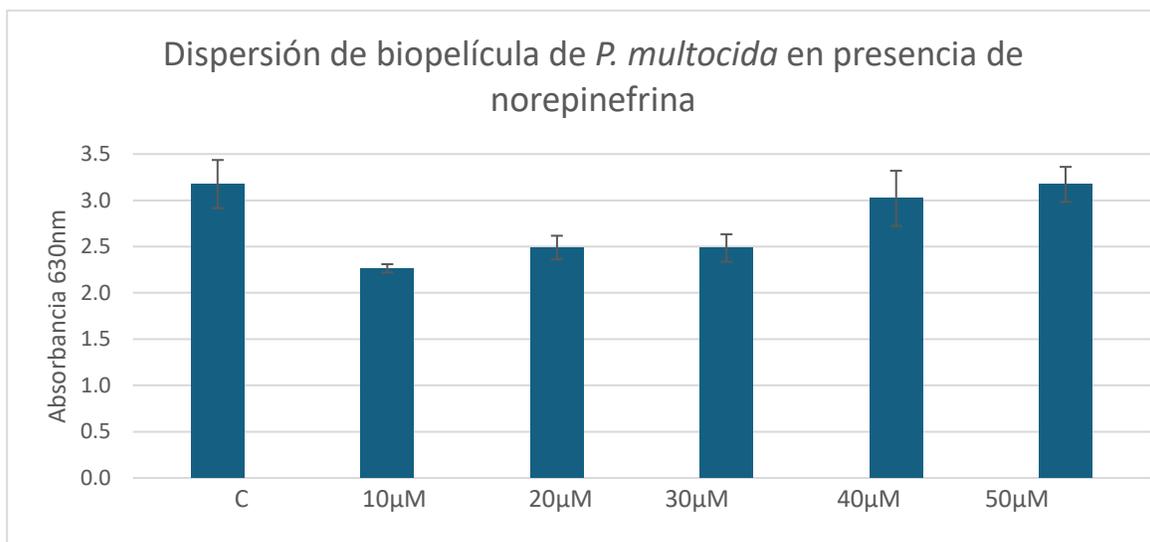


FIGURA 13. Dispersión de biopelícula de *P. multocida* en presencia de norepinefrina. Sin adiciones (Control) o con 10, 20, 30, 40, 50 μM de NE.

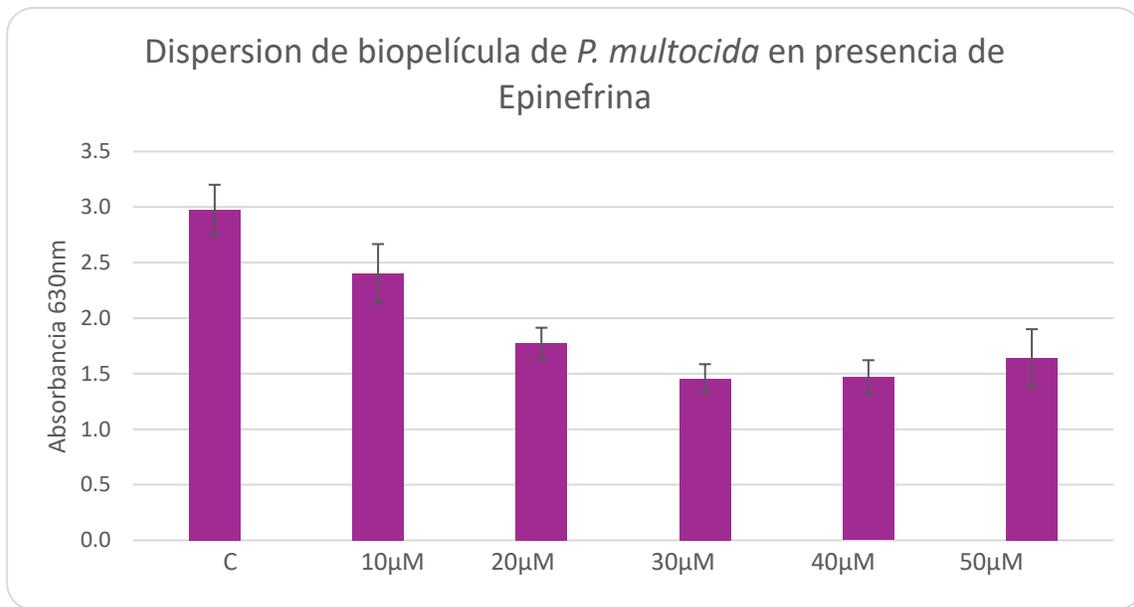


FIGURA 14. Dispersión de biopelícula de *P. multocida* en presencia de epinefrina. Sin adiciones (Control) o con 10, 20, 30, 40, 50 µM de E.

Unión a Rojo Congo

Tanto la presencia de norepinefrina, como de epinefrina, favorecen la unión del colorante rojo Congo, siendo más absorbido a 20 y 30µM de NE (figura 15), mientras que una cantidad similar de colorante RC fue unida en presencia de 10-40µM epinefrina (figura 16).

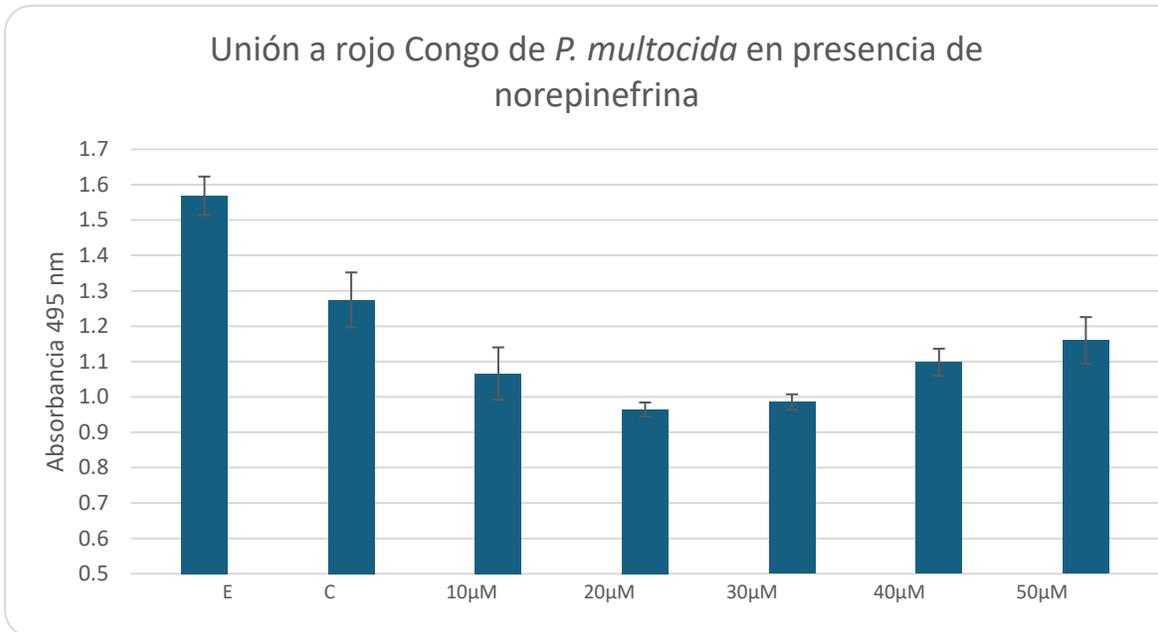


FIGURA 15. Capacidad de unión al colorante rojo Congo en presencia de norepinefrina. Sin adiciones (Control) o con 10, 20, 30, 40, 50 µM de NE

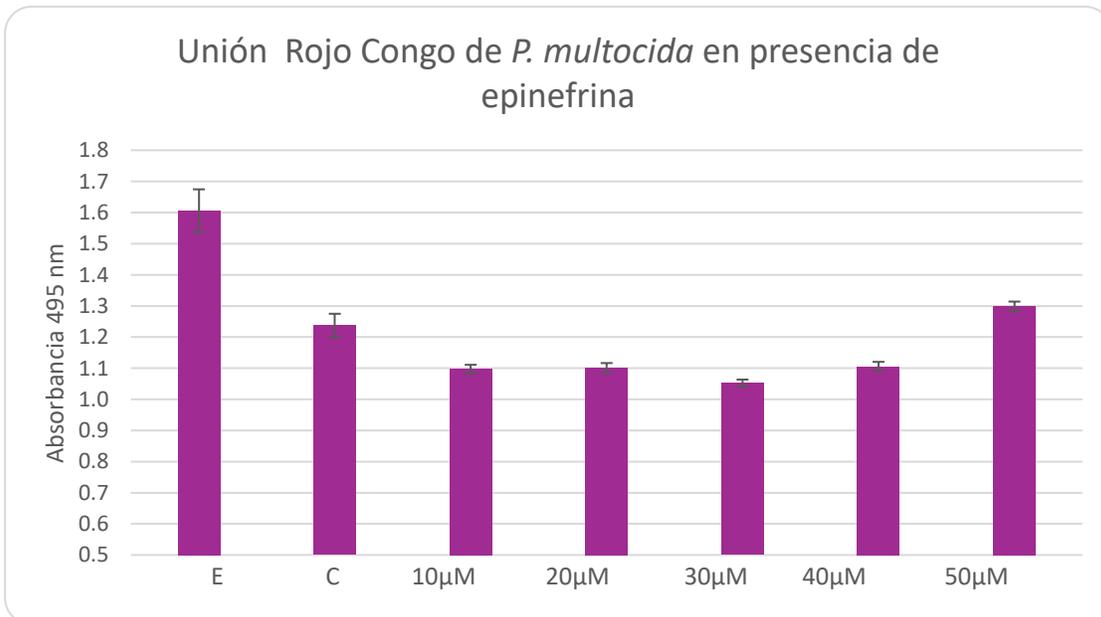


FIGURA 16. Capacidad de unión al colorante rojo Congo en presencia de epinefrina. Sin adiciones (Control) o con 10, 20, 30, 40, 50 µM de E.

DISCUSIÓN

P. multocida es un importante patógeno oportunista tanto humano como veterinario, siendo uno de los patógenos con mayor relevancia que infectan a conejos en México, llegando a provocar importantes pérdidas en la cría comercial (Cervantes et al, 2019). Las infecciones por este patógeno presentan diversas formas clínicas incluyendo rinitis, otitis y neumonía siendo las formas más comunes de observar además de metritis mastitis y abscesos.

Las patologías respiratorias en las granjas cunícolas ocupan el segundo lugar en importancia tanto por su alcance en pérdidas económicas, en granjas afectadas, como en el número de animales infectados. Se considera que la pasteurelosis está relacionada con factores ambientales, como la temperatura, humedad, ventilación, mismos que suelen ser factores estresantes para los animales (Van et al, 2020). Los conejos de granja son animales muy sensibles al estrés, agentes patógenos y a cualquier factor que altere su entorno, ya que afecta negativamente su sistema inmunológico, haciéndolos más susceptibles a infecciones (Selva et al, 2007).

Los efectos del estrés sobre el funcionamiento normal del sistema inmunológico y la patogénesis de las enfermedades infecciosas han recibido considerable atención en los últimos tiempos ya que se ha observado que las interacciones entre los sistemas neuroendocrino e inmunológico desempeñan un papel importante en la determinación de la supervivencia de los microorganismos (Belay et al, 2003). Se ha descrito que las hormonas del estrés participan en la promoción de la infección ya que los agentes microbianos pueden aprovechar las catecolaminas como epinefrina y norepinefrina, producidas por el huésped, para mejorar su crecimiento y virulencia bacteriana (Belay & Sonnenfel, 2002)

La exposición al estrés provoca una elevación de la actividad del sistema nervioso simpático y excita las células cromafines de la médula suprarrenal, lo que conduce a una mayor liberación de catecolaminas, como la epinefrina, la dopamina y la norepinefrina (Boyánova, 2017). Este incremento de hormonas no solo contribuye a la respuesta adaptativa del organismo, sino que también puede incrementar la

virulencia de patógenos al proporcionar un ambiente más favorable para su crecimiento y supervivencia.

Por ende, las catecolaminas liberadas en respuesta al estrés pueden afectar el crecimiento de las bacterias anaeróbicas de manera diferente, ya que pueden inducir un aumento en el número de bacterias, inhibir su crecimiento o no producir cambios detectables en algunas cepas. Además, el efecto de las catecolaminas pueden ser dosis-dependiente, ejerciendo efectos directos sobre algunas bacterias anaeróbicas (Boyánova, 2017). De manera similar, las bacterias aeróbicas también pueden responder a las catecolaminas con variaciones en su crecimiento y virulencia, dependiendo de la especie y las condiciones del entorno. Algunos estudios han demostrado que las catecolaminas pueden estimular el crecimiento de bacterias aeróbicas como *Pseudomonas aeruginosa*, aumentando su capacidad de formar biopelículas y su resistencia a antibióticos (Belay & Sonnenfeld, 2002).

Para evaluar si las catecolaminas promueven la expresión de factores de virulencia, se han realizado diferentes experimentos tanto para *P. multocida* como para otras bacterias. En el presente trabajo se indica que la NE y la E tienen un efecto significativo en el crecimiento de la cepa de *P. multocida* aislada de conejo, lo que coincide con estudios anteriores que demuestran que las catecolaminas, como la norepinefrina y la epinefrina, pueden estimular el crecimiento de bacterias Gram negativas. Investigaciones anteriores como la de Belay y Shenenfeld, (2003) correlacionan las altas concentraciones de norepinefrina con un crecimiento excesivo de *Escherichia coli* en animales bajo estrés, sugiriendo que las hormonas del estrés pueden afectar las defensas inmunológicas del huésped. También, se ha demostrado que las catecolaminas pueden inducir la producción de factores de virulencia. Ya que norepinefrina puede inducir un aumento de crecimiento de *E. coli* que puede ser clave en una infección. Es importante mencionar que la respuesta bacteriana ante las catecolaminas es específica de cada especie, ya que comparando los resultados del presente trabajo con el trabajo realizado por Belay y colaboradores, (2002) el crecimiento de *Enterobacter sp.*, *Salmonella choleraesuis*, y *Shigella boydii* no se vio significativamente afectado por estas hormonas.

Los resultados obtenidos, concuerdan con estudios previos que muestran que las catecolaminas pueden influir en los patrones de proteínas de las bacterias. Comparando con un estudio similar realizado por Rea Hernández, (2022) en *G. anatis*, se observan similitudes y diferencias en los efectos de las catecolaminas en las proteínas. Aunque las bacterias estudiadas son diferentes, ambas pertenecen a la familia de las *Pasteurellaceae*, lo que indica que las catecolaminas parecen afectar de manera específica los patrones proteicos. Por otro lado, tanto Wilson y Ho, (2013) como Choi-Kim y colaboradores, (1991) resaltan que la expresión de proteínas inducida por las catecolaminas podría estar relacionada con la regulación de proteínas implicadas en la captación de hierro. La adquisición de hierro es un factor clave en la supervivencia y patogenicidad de *P. multocida*.

Respecto a la actividad proteolítica, estudios previos, como los realizados por Rea Hernández, (2022) en *G. anatis*, y Bautista (2019), en *Actinobacillus seminis*, observaron un incremento en la actividad proteolítica en presencia de NE y una disminución e inhibición en presencia de E. Estos hallazgos sugieren una respuesta similar en diferentes cepas bacterianas ante la presencia de catecolaminas. Además, cabe destacar que la capacidad de que las bacterias puedan modular la actividad proteolítica en respuesta a las catecolaminas puede ser una respuesta adaptativa, lo que favorece su capacidad de virulencia y supervivencia, ya que, de acuerdo con Gong y colaboradores, (2011) al aumentar la actividad proteolítica, las bacterias podrían degradar proteínas del huésped, causando ineficiencias en la respuesta inmune del hospedero, favoreciendo la colonización e infección del huésped.

En la formación de biopelícula se obtuvo que las catecolaminas, además de inducir un incremento de la formación de biopelícula en presencia de ambas hormonas, también eran dosis dependientes, de manera similar a lo reportado por Bautista Betancourt, (2019) quien trabajó con *A. seminis*, reportando con NE un impacto más significativo en la cepa de referencia en comparación con las cepas de campo. Por otro lado, Rea Hernández, (2022) reportó una disminución en la producción de biopelículas en *G. anatis* en presencia de NE, pero un incremento con E. Estos

resultados también concuerdan con el trabajo de Cambronel y colaboradores, (2019), quienes analizaron el efecto de la epinefrina en *P. aeruginosa* encontrando un aumento en la adhesión y la formación de biopelículas. El aumento de la formación de biopelículas influye en la virulencia de esta bacteria, produciendo una mayor probabilidad de infección en animales estresados, haciendo a los organismos más vulnerables.

Las catecolaminas influyeron en la dispersión de la biopelícula de *P. multocida*, incrementando la posibilidad de colonizar otros órganos.

La capacidad de unión al colorante rojo Congo que presentó *P. multocida* en presencia de ambas hormonas sugiere la probabilidad de que dicha bacteria pueda expresar proteínas amiloides. Dichas proteínas no han sido reportadas en *P. multocida*, sin embargo, la presencia de este tipo de proteínas ha sido descrita en varios miembros de la familia. Montes-García (2014) identificó una proteína amiloide expresada por *Mannheimia haemolytica*; de manera similar, Lopez-Ochoa, (2017) describió una proteína amiloide en *Gallibacterium anatis*. Estos resultados sugieren la posibilidad de que *P. multocida* también exprese proteínas de tipo amiloide, haciendo aun mayor su potencial patogénico.

CONCLUSIONES

- La presencia de NE y E favorecen el crecimiento de *P. multocida*.
- La presencia de NE y E induce cambios en los patrones de proteínas de *P. multocida*.
- La presencia de NE y E induce actividad proteolítica de *P. multocida*.
- La presencia de NE y E favorece la formación de biopelícula, siendo mayor con norepinefrina.
- La presencia de NE y E induce dispersión de biopelículas.
- La presencia de NE y E favorece la unión del colorante rojo Congo.

Todos estos factores en conjunto influyen en la expresión de factores de virulencia, haciendo a la bacteria *P. multocida* más virulenta en presencia de ambas catecolaminas.

Perspectivas

- Identificación de adhesinas en *P. multocida* en presencia de NE y E.
- Obtención de micro vesículas en *P. multocida* en presencia de NE y E.
- Identificar proteínas inmunogénicas en presencia de suero de animales enfermos en *P. multocida* en presencia de NE y E.
- Identificar y caracterizar proteínas amiloides de *P. multocida* en presencia de NE y E.

REFERENCIAS

- Bautista, B. P. (2020). *Efecto de epinefrina y norepinefrina en la expresión de proteínas de Actinobacillus seminis* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. https://tesiuam.dgb.unam.mx/F/EQUG7VDKGJVJLL5VCXRG5KR5FC9XMTL37T6HFRDF2X9SXUJQI8-32074?func=full-set-set&set_number=374225&set_entry=000009&format=999
- Belay, T., & Sonnenfeld, G. (2002). Differential effects of catecholamines on in vitro growth of pathogenic bacteria. *Life Sciences*, 71(4), 447–456. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)01683-3](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)01683-3)
- Belay, T., Aviles, H., Vance, M., Fountain, K., & Sonnenfeld, G. (2003). Catecholamines and in vitro growth of pathogenic bacteria: Enhancement of growth varies greatly among bacterial species. *Life Sciences*, 73(12), 1527–1535. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00472-2](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00472-2)
- Boyanova, L. (2017). Stress hormone epinephrine (adrenaline) and norepinephrine (noradrenaline) effects on the anaerobic bacteria. *Anaerobe*, 44, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.01.003>
- Cambronel, M., Abdel-Nour, M., Saulnier, P., Vendeville, A., & Zagorec, M. (2019). The impact of catecholamines on the motility, adhesion, and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *PloS One*, 14(4), e0214324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214324>
- Cervantes, G. A. B., Mendoza, E. S. E., Trigo, T. F. J., & Aguilar, R. F. (2019). Tipos capsulares de *Pasteurella multocida* en la pasteurelosis de conejos en México. *Boletín de Cunicultura Lagomorpha*, 191, 32–35. ISSN 1696-6074
- Félix, A., Lanz, S., Rodríguez-Calleja, J. M., Fernández, M., Hernández, P. E., & Castrillón, J. C. (2002). Pasteurella multocida septicemia in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 43(7), 1531–1534. <https://doi.org/10.1080/10428190290027665>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

- Fredheim, E. G., Klingenberg, C., Rohde, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flaegstad, T., & Sollid, J. E. (2009). Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), 1172–1180. <https://doi.org/10.1128/JCM.01891-08>
- García, J. F. M., Rojas, L., Zenteno, E., Cruz, C. V., & Abascal, E. N. (2020). Characterization of *Actinobacillus seminis* biofilm formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(9), 1371–1383. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01447-w>
- Gómez, G. B., & Escobar, A. (2006). Estrés y sistema inmune. *Revista Mexicana de Neurociencias*, 7(1), 30–38.
- Gong, L., Cullinane, M., Treerat, P., Ramm, G., Prescott, M., Adler, B., & Devenish, R. J. (2011). The *Burkholderia pseudomallei* type III secretion system and BopA are required for evasion of LC3-associated phagocytosis. *PLoS One*, 6(3), e17988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017988>
- Gutiérrez-García, A., & Sánchez-Ocampo, E. M. (2016). Uso de las principales drogas inotrópicas, vasoactivas y vasodilatadoras en el perioperatorio. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 39(1), s218–s222. <https://doi.org/10.1016/j.rma.2015.12.008>
- Hatfaludi, T., Al-Hasani, K., Boyce, J. D., & Adler, B. (2010). Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 144(1-2), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.027>
- Harper, M., Boyce, J. D., & Adler, B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters*, 265(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00425.x>
- INSST. (2022). TME: Fichas de Agentes Biológicos. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. https://www.insst.es/documents/94886/94890/TME_Ficha_Pasteurella.pdf
- López-Ochoa, J., Montes-García, J. F., Vázquez-Cruz, C., Sánchez-Alonso, P., Pérez-Márquez, V., Vaca-Pacheco, S., & Negrete-Abascal, E. (2017). *Gallibacterium* elongation factor-Tu possesses amyloid-like protein

- characteristics, participates in cell adhesion, and is present in biofilms. *Journal of Microbiology*, 55(9). <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7596-0>
- Montes-García, J. F. (2015). *Identificación de proteínas amiloides expresadas por Mannheimia haemolytica* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. <https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/KG545TS1LX7X8JBIJ73PRD7I7J6DN57FQ3XB73IX6SDRTNRCDB-08714?func=logout>
 - Negrete-Abascal, E., Tenorio, V. R., & de la Garza, M. (1999). Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Current Microbiology*, 38(1), 64–67. <https://doi.org/10.1007/pl00006775>
 - Prazdnova, E., Bren, A., Golovko, L., Teperin, A., Xu, D., Zhao, X., Chikindas, M., & Rudoy, D. (2024). Quorum sensing and its inhibition mechanisms. *BIO Web of Conferences*, 113, 01005. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202411305025>
 - Ramírez, P. P. (2022). *Efecto de la testosterona sobre los factores de virulencia de Actinobacillus seminis* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/EQUG7VDKGJVJLL5VCXRG5KR5FC9XMTL37T6HFRDF2X9SXUJQI8-32059?func=full-set-set&set_number=374225&set_entry=000004&format=999
 - Rea Hernández, M. P. (2022). *Efecto de la norepinefrina y epinefrina sobre la expresión de factores de virulencia en Gallibacterium anatis* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/EQUG7VDKGJVJLL5VCXRG5KR5FC9XMTL37T6HFRDF2X9SXUJQI8-32062?func=full-set-set&set_number=374225&set_entry=000005&format=999
 - Selva Martínez, L., Viana Martín, D., Ortega García, J., & Corpa Arenas, J. M. (2007). Pasteurellosis: Principal patología respiratoria en cunicultura industrial. *Boletín de Cunicultura Lagomorpha*, 150, 14–24. ISSN 1696-6074
 - Van, D., Van M., Nga N., Vien V., Minh N., & Van H. (2020). Antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains isolated

from swine. *Open Veterinary Journal*, 10(2), 132–139.
<https://doi.org/10.4314/ovj.v10i2.6>

- Wilson, B. A., & Mengfei, H. (2013). *Pasteurella multocida*: From zoonosis to cellular microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 631–655.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00024-13>
- Wilkie, L., Harper, M. J., Boyce, D., & Adler, B. (2012). *Pasteurella multocida*: Diseases and pathogenesis. Department of Microbiology, Australian Research Council Centre of Excellence in Structural and Functional Microbial Genomics, Monash University.
- Yajima, A. (2016). Recent advances in the chemistry and chemical biology of quorum-sensing pheromones and microbial hormones. *Studies in Natural Products Chemistry*, 331–355. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63603-4.00010-3>
- Yang, W., Li, M., Zhang, C., et al. (2022). Pathogenicity, colonization, and innate immune response to *Pasteurella multocida* in rabbits. *BMC Veterinary Research*, 18, 416. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03517-9>
- Yang, Y., Hu, P., Gao, L., et al. (2021). Deleting *qseC* downregulates virulence and promotes cross-protection in *Pasteurella multocida*. *BMC Veterinary Research*, 52(140). <https://doi.org/10.1186/s13567-021-01009-6>
- Zhongpeng, Y. (2019). *Pasteurella multocida*: Genomics, virulence factors, and host adaptation. *Veterinary Sciences*, 6(3), 53.
<https://doi.org/10.3390/vetsci6030053>