



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**“Clonación y caracterización del gen *tbpA*, que codifica para un receptor  
de membrana externa de *Avibacterium paragallinarum* “**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A:**

**LORENZO CARLOS ESTRADA GUADARRAMA**

**ASESOR DE TESIS: Dr. ERASMO NEGRETE ABASCAL**



**DICIEMBRE 2009**



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 siguiente trabajo se realizo en el laboratorio de Genética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México. Contando con el apoyo del PAPIIT Proyecto IN203707 y PAPCA-FESI-UNAM 2009.

## Agradecimientos

Ante todo quisiera expresar en estas líneas mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que han hecho realidad este sueño, y muy especialmente:

A mis directores de Tesis, el Dr. Erasmo Negrete Abascal y el Dr Sergio Vaca Pacheco; por haber confiado en mí desde el principio, haberme apoyado siempre, pero sobre todo, gracias por brindarme sus conocimientos.

Al Dr. Diego Arenas y al Maestro Octavio García, por sus sabios consejos y enseñanzas que fueron de mucha ayuda en la elaboración de esta tesis.

A la Maestra, Gloria Paniagua y el Maestro Erick Monroy, por su paciencia y sabios consejos, que sirvieron para forjar este trabajo.

Y especialmente quisiera agradecer al Dr. Candelario Vázquez por haber estado ahí siempre, ya que sin su apoyo, lograr este trabajo hubiera sido imposible.

A toda mi familia:

A mi novia Susana, por ser una compañera que me ha apoyado en todo momento y de forma incondicional.

A mis hermanos, por ser quienes son y por apoyarme en todo momento.

En último lugar pero no por eso menos importante, agradezco a mis padres por el esfuerzo que han hecho, para que yo pueda realizar mi sueño. Por haber hecho de mí lo que soy, por ayudarme, por entenderme, y por todo.

# Índice

## Resumen

### 1.-Avibacterium paragallinarum

#### 1.1.1.-Generalidades

#### 1.1.2.-Patología

#### 1.1.3.-Características morfológicas y bioquímicas de la bacteria

#### 1.1.4.-Requerimientos de crecimiento de Av. paragallinarum

#### 1.1.5 Propiedades bioquímicas

#### 1.1.6. Factores de virulencia

### 1.2. Importancia y disponibilidad del hierro

#### 1.2.1.- Mecanismos utilizados para la captación de hierro

## 2.-Antecedentes

## 3.-Justificación

## 4.- Hipótesis

## 5.- Objetivos

### 5.1.- Objetivo general

#### 5.1.1 Objetivos Particulares

## 6.- Material y métodos

### 6.1.- Cepas bacterianas y crecimiento bacteriano

#### 6.1.1.- Diseño de oligonucleótidos

#### 6.1.2.-Aislamiento del DNA cromosómico de Av. paragallinarum y amplificación del gen *tbpA*

#### 6.1.4.- Clonación del producto de PCR y selección de las clonas transformantes

#### 6.1.5 Secuenciación y análisis in silico

## 7. Resultados

### 7.1.- Diseño de oligonucleótidos *tbpAa* y *tppAb*.

#### 7.1.1.- Aislamiento del DNA cromosómico de Av. paragallinarum

#### 7.1.2.- Amplificación del gen, inserción y clonación.

#### 7.1.3.- Secuenciación del gen clonado

## 8. Discusión

## 10.-Conclusiones

## 11.- Perspectivas

## 12. Anexos

### 12.1.-. Aislamiento del DNA cromosómico de Av. paragallinarum (Sanbrook et al., 1989)

### 12.2.-.- Purificación de productos de PCR y gel Wizard(r) SV de Promega

#### 12.2.1.-. Extracción de banda

##### 1.- Disolución del gel

##### 2.- Unión de DNA

##### 3.- Lavado de DNA

##### 4.- Elusión de DNA

### 12.3.-. Transformación bacteriana

## 13.- Sistema de transporte citoplasmático

## 14.- Bibliografía

## Resumen

*Avibacterium paragallinarum* es un microorganismo miembro de la familia *Pasteurellaceae*. Este patógeno ha sido identificado como el causante de la coriza infecciosa (CI), un padecimiento del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas (*Gallus gallus*). El impacto de esta enfermedad de distribución mundial, se debe a las pérdidas económicas que ocasiona a la industria avícola.

Durante el proceso de infección, es crucial para las bacterias la adquisición de los nutrientes que necesitan del huésped al que infectan. El único mecanismo de adquisición de hierro (micronutriente esencial para cualquier microorganismo) descrito en *Av. paragallinarum* es a través de las ovotransferrinas, mediante dos proteínas de unión a la transferrina (TbpA y TbpB).

Se ha descrito en bacterias patógenas la expresión de genes cuyos productos determinan factores de virulencia o participan en la captación de hierro, sin embargo a pesar de los daños patológicos causados por *Av. paragallinarum* en la CI, no se han estudiado los genes que participan la captación de la transferrina, limitando el desarrollo de nuevas estrategias para combatir esta enfermedad.

En el presente trabajo, partiendo del diseño de oligonucleótidos que amplificaron el gen *tbpA*, se obtuvo un amplicón de 3000pb, y siguiendo técnicas preestablecidas, el gen amplificado se inserto en el vector pBluescriptII Ks (+), el cual se utilizo para

trasformar *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competentes y clonar el gen. El plásmido recombinante obtenido fue purificado y el fragmento clonado sometido a un proceso de secuenciación y análisis *in silico*. La secuencia obtenida mostró una identidad del 97 % con secuencias de genes *tbpA* reportados para otras especies. Como parte del análisis *in silico*, la secuencia nucleotídica se tradujo *in silico* obteniéndose una proteína TbpA hipotética que presenta sitios conservados característicos de las proteínas TbpA, confirmando su identidad como una proteína TbpA. En base a los resultados obtenidos y a los análisis realizados en el presente trabajo, podemos concluir que *Av. paragallinarum* posee en su genoma un gen *tbpA*, el cual, podría participar en la adquisición de hierro a partir de la transferrina, de una manera similar a como lo realizan otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*

## 1.-*Avibacterium paragallinarum*

### 1.1.1.-Generalidades

Una de las enfermedades que más afecta a la industria avícola es la coriza infecciosa (CI); un padecimiento del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas (*Gallus gallus*). Este padecimiento no afecta al humano. El impacto de esta enfermedad radica en las pérdidas económicas que ocasiona a la industria avícola, pues se caracteriza principalmente por producir una baja conversión alimenticia, retraso del crecimiento de las aves y en algunos casos la producción de huevo puede reducirse hasta un 40% (Blackall, et al., 2003), el agente etiológico causante de esta enfermedad es *Avibacterium paragallinarum* (*Av. paragallinarum*) (Blackall. et al., 2005).

Cuando la CI cursa sin otras enfermedades asociadas, se caracteriza por ser una enfermedad aguda, de curso corto (dos semanas) y curación espontánea. Sin embargo, es común la asociación con otros agentes bacterianos o virales, en cuyos casos la duración del curso de la enfermedad se prolonga varias semanas, por lo que se le denomina coriza infecciosa complicada (Terzolo., 2000).

### 1.1.2.-Patología

Los signos característicos de la CI incluyen; exudado nasal (seroso o mucoso), estornudo, inflamación de senos infraorbitarios, edema facial y conjuntivitis. En casos severos la inflamación de barbillas puede ser particularmente evidente en machos (Figura 1) (Blackall., et al, 2003).

Los cambios microscópicos ocasionados por esta bacteria se limitan principalmente a la mucosa de los pasajes nasales y senos infraorbitales (Blackall et al., 1997). Así mismo es posible observar una infiltración marcada de mastocitos en la lámina propia de las membranas mucosas de la cavidad nasal (Sawata., et al 1985).





Figura 1.- Pollo infectado experimentalmente con *Av. paragallinarum*. Se observa inflamación de seno infraorbitario y edema de barbilla, típicos de la CI (Soriano, et al., 2004).

El periodo de incubación de la bacteria causante de la CI es de 24 a 48 h, después del contacto con cultivos o exudados infecciosos (Soriano., et al 2004). De manera experimental, el periodo de incubación puede ser variable de acuerdo con ciertas condiciones de exposición; 24 h por inoculación intrasínusal; 48 en casos de instalación nasal; 72 h, en aves enjauladas; 4 días a través del contacto con agua infectada y 6 a 14 días por transmisión aérea (Yamamoto., 1966). La mayor frecuencia de brotes de CI ocurre en otoño e invierno (Blackall, et al., 1997).

### 1.1.3.-Características morfológicas y bioquímicas de la bacteria

*Av. paragallinarum* es una bacteria Gram negativa no esporulada, pleomórfica, presenta morfología cocobacilar, con tendencia a la formación de cadenas cortas y algunos filamentos, además, en cultivos en caldo, es frecuente observar formas muy pleomórficas e inclusive bacterias degradadas que aparecen, como si fueran manchas de colorantes empleados (Soriano, et al., 2004).

*Av. paragallinarum* se consideraba una bacteria inmóvil (Blackall et al., 1997), sin embargo, en un estudio reciente basado en pruebas bioquímicas e inmunológicas, se observó motilidad bajo ciertas condiciones de cultivo (Negrete-Abascal et al., 2002; Serrano, 2007).

#### 1.1.4.-Requerimientos de crecimiento de *Av. paragallinarum*

Para el cultivo in vitro se requiere de NAD<sup>+</sup> en su forma reducida (NADH): 1.56 a 20 µg / ml de medio, o la forma oxidada 20 a 80 µg / ml (Rimler, et al., 1997). El NAD<sup>+</sup> puede ser adicionado al medio de cultivo o aportado por una bacteria nodriza (*Staphylococcus spp*) cultivada como una estría alimentadora transversal al cultivo de *Av. paragallinarum*. Sin embargo se han aislado cepas independientes de NADH en Sudáfrica (Miflin et al., 1995) y México (García et al., 2004). El periodo de incubación a 37°C es de 16 a 24 h (Rimler, et al., 1997). Algunos de los medios de cultivo utilizados con diversos suplementos incluyen los siguientes medios; Infusión cerebro corazón, infusión de carne de pollo, medio de mantenimiento (Swayne, et al., 1998), o agar Columbia (Terzolo, et al., 1993).

La mayoría de las cepas de *Av. paragallinarum* crecen en condiciones de micro aerobiosis, y su crecimiento se ve favorecido por la presencia de CO<sub>2</sub> (5%-10%) en la atmósfera (Terzolo et al., 1997; Rimler, et al., 1976).

#### 1.1.5 Propiedades bioquímicas

Bioquímicamente *Av. paragallinarum* puede ser diferenciado de otros bacilos Gram negativos, potencialmente patógenos para las aves. Las características bioquímicas más importantes incluyen; la capacidad de reducir nitratos a nitritos, la fermentación de glucosa sin la producción de gas, la actividad negativa de la oxidasa, la presencia de la enzima fosfatasa alcalina y la falta de producción de indol (Blackall et al., 1997;).

En la tabla 1 se hace mención de algunas pruebas bioquímicas más frecuentemente utilizadas para diferenciar *Av. paragallinarum* de otros microorganismos (Soriano, et al., 2004).

Tabla 1.- Características bioquímicas que diferencian a <i>Av. paragallinarum</i> de otras bacterias.					
Reacción	Microorganismo				
	<i>Avibacterium paragallinarum</i>	<i>Pasterella multocida</i>	<i>Riemerella anatipestifer</i>	<i>Paterella gallinarum</i>	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>
Reducción de nitratos	+	+	-	+	-
Catalasa	-	+	+	+	-
Oxidasa	-	+	+	+	+
Ureasa	-	-	+	-	-
Indol	-	+	-	--	-
B-galactosidasa	+	+/-	-	+/-	+
Lisina descarboxilasa	-	-		-	-
Ornitina desacarboxilasa	-	-		-	-

#### 1.1.6. Factores de virulencia

Con cierta frecuencia, en la naturaleza, se forman especies nuevas por medio de un proceso que conocemos como evolución. Este proceso responsable de muchos fenómenos biológicos como la adaptación de los organismos, ha promovido a lo largo del tiempo, características que les permiten, a los individuos que las poseen, sobrevivir frente a presiones o cambios de su hábitat. En el caso particular de los microorganismos patógenos, muchas de estas características les han permitido subsistir, por ejemplo, los mecanismos que le confieren a una bacteria la posibilidad de evadir los ataques del sistema inmune del hospedero, o captar los nutrientes del

huésped. Finalmente, en conjunto, aquellas propiedades que contribuyen a la capacidad del patógeno, para inducir un proceso infeccioso, son consideradas factores de virulencia. En el caso particular de *Av. paragallinarum*, se han descrito los siguientes factores:

FACTOR	PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS
Cápsula	Constituida fundamentalmente de polisacáridos, le confiere protección ante la fagocitosis y/ o desecación, además de participar activamente en la adherencia (Boyce y Adler, 2000;).
Vesículas de membrana Metaloproteasas	Estas proteínas y estructuras membranales podrían estar implicadas en la virulencia; se considera contienen entre otras cosas, proteasas (Rivero-García et al., 2005) y las probables proteínas RTX (Ramon-Rocha et al., 2006).
Hemaglutinina	Es un antígeno específico de cada serovar; se relaciona con la inhibición de la aglutinación y se considera un inmunógeno capaz de inducir una protección inmune (Hobb et al., 2002).
Lipopolisacáridos	Un lipopolisacárido es un componente estructural y funcional de la superficie celular, importante en las bacterias Gram –negativas al ser capaz de producir un shock endotóxico en el hospedero (Coyle y Pharm, 2003).
Proteínas de membrana externa (OMPs)	Son proteínas receptoras de la membrana. Algunas pueden unir proteínas provenientes del huésped. Y tratándose de proteínas de unión, las proteínas TbpA y TbpB, o proteínas de unión al hierro, facilitan la adquisición del hierro por microorganismos patógenos, siendo esto crucial para su habilidad de causar enfermedades (Litwin y Calderwood, 1993).

Entre las proteínas que *Av. paragallinarum* secreta al medio exterior Rivero-García et al., (2005) demostraron que existen proteasas (metaloproteasas). Las metaloproteasas secretadas por esta bacteria, son activas en intervalos amplios de pH (3-10, aunque el óptimo es 7.5) y temperatura (37-60 °C), disminuyendo su actividad a 70 °C. Estas proteasas podrían jugar un papel importante en la invasión y el establecimiento del proceso infeccioso, ya que podrían permitirle a la bacteria obtener nutrimentos por la degradación de sustratos de diferentes fuentes, así como modificar o evadir los sistemas defensivos de su hospedero, al degradar parcial o totalmente a las inmunoglobulinas. También se ha observado que *Av. paragallinarum* produce vesículas de membrana (VM), cargadas con ácidos nucleicos, proteasas inactivas (Ramon-Rocha et al., 2006), proteínas inmunogénicas y lípidos, los que se ha demostrado que en conjunto, participan en diferentes procesos relacionados con la virulencia en ciertas bacterias; como la adhesión a tejidos, la comunicación bacteria-bacteria o bacteria hospedero y la transmisión de información genética (Beveridge, 1999).

## 1.2. Importancia y disponibilidad del hierro

Cuando las bacterias patógenas llegan a los tejidos deben multiplicarse para poder colonizar tejidos específicos. Generalmente el inoculo bacteriano inicial puede ser suficiente para producir daño, sin embargo, estos microorganismos deben obtener del hospedador los nutrientes y adaptarse a las condiciones ambientales como temperatura y pH para poder replicarse. En el caso del hierro, uno de los nutrientes esenciales que necesitan obtener estos microorganismos para su crecimiento, su disponibilidad en las mucosas y tejidos del huésped presenta una concentración libre, insuficiente para su óptimo desarrollo (concentración de hierro disponible;  $10^{-18}\text{M}$ ). Sin mencionar que durante el proceso de infección por algún patógeno bacteriano, los organismos superiores aumentan la limitación de la disponibilidad del hierro, en defensa ante la infección.

En conjunto, la limitación del hierro ante un ataque microbiano y la baja disponibilidad del hierro, distan mucho de ser condiciones ideales para suplir los requerimientos de las bacterias (Garrido., 2005).

Dentro de los mecanismos que limitan la disponibilidad del hierro libre en el huésped se encuentran las proteínas transportadoras del hierro, es decir; los organismos superiores incorporan el hierro a través de la dieta, este elemento se absorbe a su paso por el intestino delgado, donde es transportado y almacenado por proteínas especializadas. Básicamente, el hígado secreta, en la bilis, cantidades moderadas de una globulina beta denominada “apotransferrina” que presenta una elevada afinidad por el ion hierro. La combinación de ambos da lugar a una “transferrina”, que es reconocida por los receptores específicos de las células de la mucosa intestinal, siendo trasvasada al torrente sanguíneo.

En los organismos superiores pueden existir alguno(s) de los siguientes tipos de transferrinas (Terricabras, 2007):

I. Transferrinas sericas o serotransferrinas (Tf): se encuentran en el plasma y líquido linfático

II. Lactoferrinas o lactotransferrinas (Lf): Se localizan en diversos fluidos extracelulares (saliva, lágrimas, secreciones nasales, fluidos intestinales, etc.).

III. Ovotransferrinas: Se localizan en la clara de huevos.

Estas proteínas no unen exclusivamente el hierro proveniente de la dieta, también lo pueden adquirir a partir del grupo hemo que se genera, por la degradación, a través de la fagocitosis de eritrocitos viejos (Wessling -Resnick, 2000) o desde la ferritina, de tal manera que se reduce al mínimo la concentración de hierro libre (Otto et al., 1992; Ratledge y Dover, 2000), brindándole al hospedero resguardo ante un ataque microbiano, y evitando la formación de radicales libres (EROs), debido a que en condiciones de riqueza de oxígeno, el hierro es fuente de radicales peligrosos para la célula (como radicales hidroxilos, aniones superóxidos, peróxidos etc), que pueden dañar lípidos, proteínas y DNA (Garrido., 2005).

Claramente; limitar la disponibilidad del hierro, forma parte de una defensa contra el ataque microbiano y el captar el suficiente hierro es una necesidad primordial en las bacterias.

Frente al problema de la disponibilidad del hierro algunos patógenos presentan mecanismos capaces de contrarrestar algunas de las restricciones del hierro de su huésped, ya sea mediante la síntesis de quelantes de iones férricos, llamados sideróforos, que son sintetizados y exportados al exterior celular (Braun y Hantke, 2002) o bien, captando el hierro de las proteínas transportadoras de hierro de la célula hospedera, mediante receptores específicos (OMPs) (Andrews, et al., 2003).

### 1.2.1.- Mecanismos utilizados para la captación de hierro

En condiciones de limitación de hierro, se han descrito muchas especies de las familias *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae*, capaces de sintetizar proteínas de membrana, encargadas de unir proteínas transportadoras del hierro de su hospedador, dado que las moléculas que deben atravesar la pared bacteriana son demasiado grandes para poder atravesar mediante difusión. (Figura 2) (Fuller et al., 1998; Morton y Williams, 1989). Un ejemplo de receptores específicos de la membrana externa, descritos en algunas bacterias, son los receptores de las transferrinas. Los receptores de ovotransferrina (un tipo de transferrina) que se han descrito en *Av paragallinarum*, están formados por dos subunidades (Ogunnariwo y Schryvers., 1992). Estos receptores identificados por Negrete Abascal et al, 2009 han sido determinadas como TbpA y TbpB, llamadas así por sus siglas en inglés (Transferrin Binding Protein) ( Bonnah, R. y Shryvers, 1998; Cornelissen, et al., 1992).

Los mecanismos de adquisición de hierro, dependientes de proteínas receptoras de membrana externa, requieren de pasos adicionales para obtener el hierro; 1.- En la membrana citoplasmática, un complejo transportador que proporcione ATP llamado sistema ABC (Anexos), 2.- Una proteína de unión periplasmática, y 3.- El receptor de la membrana externa aunada a una fuente de energía llamada complejo TonB (Kregulac y Vogel, 2008).

Por tanto la extracción de átomos de hierro inicia con dos proteínas receptoras de la membrana TbpA y TbpB, para el caso de la transferrina. La proteína TbpB de aproximadamente 53kDa, esta anclada con el extremo lipídico N-terminal (Schryvers, et al., 1999). Se piensa que TbpB puede actuar como un sitio inicial de unión para el hierro que se encuentra en la transferrina saturada, facilitando la subsiguiente unión de TbpA (Boulton. et al., 1999). TbpA es una proteína integral de la membrana de aproximadamente 94 kDa, que se cree presenta una gran superficie de estructuras helicoidales que se unen a la transferrina, y fuerzan la separación de los dominios que cubren el hierro, propiciando su liberación (Gray Owen et al., 1996; Boulton et al.,



1999). La energía necesaria para llevar a cabo este proceso es aportada por el complejo TonB. Una vez que el hierro ha sido transferido al periplasma, éste es unido por una proteína periplásmica y ambos son captados en la membrana citoplasmática donde el hierro es transportado al citoplasma vía transportadores de la membrana citoplasmática (Anexos) (Figura 2) (Kregulac y Voguel, 2008).

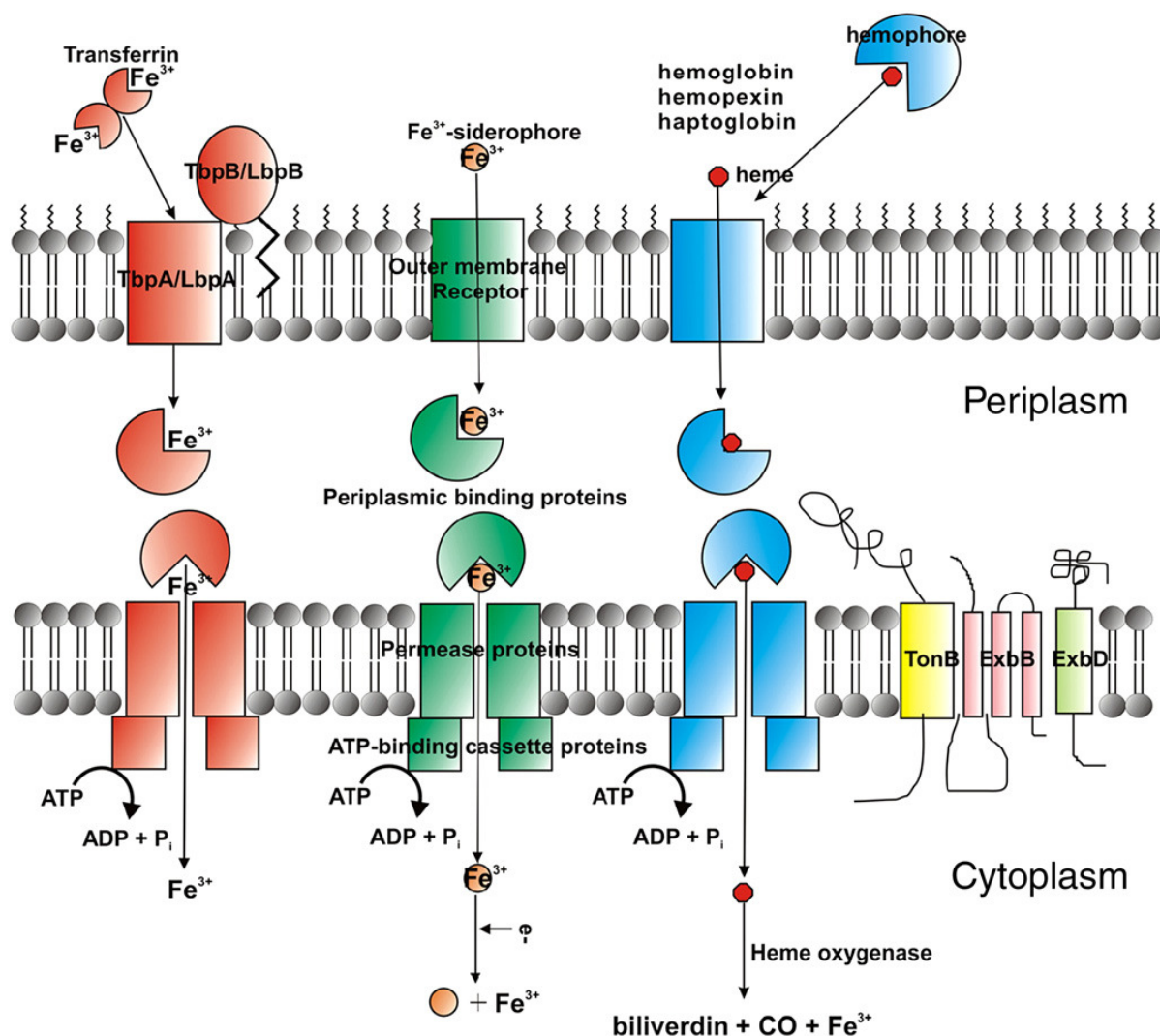


Figura 2.- Representación esquemática de los distintos mecanismos de captación de hierro.

Existen numerosas vías de adquisición del hierro en las bacterias Gram-negativas, entre las cuales se incluyen la adquisición proveniente de las transferrinas, sideroforos o grupo hemo. No en todas las bacterias se han reportado los tres tipos de adquisición de hierro presentes en esta imagen, sin embargo, algunas presentan más de un tipo de mecanismo (Kregulac y Voguel, 2008).

Hoy en día la posibilidad de caracterizar los genes que codifican para las proteínas de la membrana, en este caso de proteínas receptoras de la membrana externa, nos ha acercado un poco más entender mejor estos mecanismos.

Las investigaciones previas en relación a los mecanismos de captación de hierro descritos en *Av. paragalinarum*, son los siguientes.

## 2.-Antecedentes

La familia *Pasteurellacea* incluye bacterias patógenas de animales y humanos, que adquieren el hierro que necesitan directamente de la transferrina del hospedero, por medio de receptores de unión a transferrinas (TbpA y TbpB) (Gray-Owen y Schryvers, 1996). Aunque en la mayoría de los microorganismos se ha descrito la necesidad de ambas proteínas (TbpA y TbpB), en el 2001 Ogunnariwo y Schryvers caracterizaron a nivel de receptores de transferrina una cepa de *Pasteurella multocida* aislada del aparato respiratorio de bovinos, encontrando que TbpA es capaz de realizar eficientemente la adquisición de hierro, en ausencia de un segundo receptor de proteína (TbpB).

El único mecanismo de adquisición de hierro descrito en *Av. paragallinarum* es a través de las ovotransferrinas, mediante dos proteínas de unión a la transferrina (TbpA y TbpB) similares a las de otras especies bacterianas: Ogunnariwo y Schryvers, en 1992 identificaron dos regiones en la ovotransferrina (lóbulo N y lóbulo C) involucradas en la unión a receptores de transferrina de *Av. paragallinarum* y *Avibacterium Avium*. Aunque estos autores aislaron dos OMPs que se unían específicamente a transferrina de pollo o de pavo, ellos no identificaron a estas OMPs de 94 y 53 kDa respectivamente.

Larios et al., 2006 describieron la expresión diferencial de proteínas de membrana externa, así como secretadas, al crecer la bacteria (*Av. paragallinarum*) en medios con baja concentración de hierro, sugiriendo una regulación en la expresión de sus genes como respuesta a cambios en la concentración de hierro en el medio (Larios, 2006).

Chantes Guerra (2007), amplificó por PCR, clonó y secuenció el gen *fur* de *Av. paragallinarum* corroborando la existencia de un regulador en la expresión de los genes que participan en la expresión de proteínas involucradas con la captación del hierro, encontrando también, que esta secuencia conserva los dominios de unión al DNA y al hierro, típicos de este regulador,

No fue hasta el 2009 que Negrete Abascal et al., determinaron la identidad de dos proteínas inducidas al crecer a *Av. paragallinarum in vitro*, bajo una limitación de hierro. Las proteínas obtenidas de la membrana externa de esta bacteria una de 90 kDa, y la otra de 60 kDa corresponden a los receptores de transferrina (TbpA y TbpB).

### 3.-Justificación

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de los microorganismos y su adquisición por algunas bacterias patógenas contribuye a su virulencia. En diferentes bacterias patógenas se ha descrito que la expresión de algunos genes cuyos productos determinan factores de virulencia, también participan en la captación de hierro. Sin embargo, a pesar de los daños patológicos causados por *Av. paragallinarum* en la CI, no se han estudiado los genes que participan la captación de transferrina, limitando el entendimiento de estos mecanismos, y el desarrollo de nuevas estrategias para combatir esta enfermedad.

### 4.- Hipótesis

- ✚ *Av. paragallinarum* posee el gen *tbpA* que codifica para la proteína TbpA, y su secuencia es similar a la de genes *tbpA* de la familia *Pasteurellaceae*.

### 5.- Objetivos

#### 5.1.- Objetivo general

- ✚ Clonar y caracterizar molecularmente el gen *tbpA* de *Av. paragallinarum*

#### 5.1.1 Objetivos Particulares

- ✚ Diseñar oligonucleótidos para amplificar el gen *tbpA* de *Av. paragallinarum*
- ✚ Clonar y secuenciar el gen *tbpA* de *Av. paragallinarum*
- ✚ Realizar el análisis *in silico* de la secuencia obtenida del gen *tbpA* de *Av. paragallinarum*.

## 6.- Material y métodos

### 6.1.- Cepas bacterianas y crecimiento bacteriano

En el presente trabajo se empleo la cepa de referencia ATCC 0083 *Avibacterium paragallinarum* y la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , ambas del cepario del laboratorio.

El crecimiento de la bacteria (*Av. paragallinarum*) se realizó en el medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI), suplementado con NADH (10-20  $\mu\text{g/ml}$ ), y se incubó a 37°C. Para el cultivo en agar, la bacteria se propagó incubando las placas en un recipiente cerrado en atmósfera húmeda y con un ambiente rico en CO<sub>2</sub> (Terzolo et al., 2000). *Escherichia coli* se propagó en placas de agar Luria-Bertani y cuando se requirió, fueron suplementadas con, bromo -chloro -indolyl  $\beta$ -D-galactosido (XGAL; 40 $\mu\text{g/ml}$ ), isopropil  $\beta$ -D-thiogalactosido (IPTG; 40 $\mu\text{g/ml}$ ), ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y kanamicina (50  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 6.1.1.- Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos para amplificar el gen *tbpA* de *Av. paragallinarum* se realizó a partir de secuencias descritas para el gen *tbpA*, reportadas de diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*, así como, a partir de la secuencia de la proteína TbpA de *Av. paragallinarum* descrita por Negrete Abascal et al., (2009), utilizando para su diseño el programa Oligo ®.

### 6.1.2.-Aislamiento del DNA cromosómico de *Av. paragallinarum* y amplificación del gen *tbpA*

El DNA genómico de *Av. paragallinarum* se obtuvo usando el método de extracción descrito por Sambrook *et al.*, 1989 (Anexos). Las condiciones de PCR para amplificar el posible gen *tbpA* de *Av. paragallinarum* fueron estandarizadas usando DNA cromosómico y los oligonucleótidos previamente diseñados (*tbpA<sup>a</sup>* y *tppA<sup>b</sup>*). El producto de PCR fue observado en un gel de agarosa al 1%, después de someterlo a una separación electroforética. Este producto amplificado fue extraído del gel de agarosa siguiendo las instrucciones del sistema de purificación de productos de PCR (Wizard plus SV, Promega) (Anexos), para su posterior inserción en el vector plásmidico pBluescriptII Ks (+).

### 6.1.4.- Clonación del producto de PCR y selección de las clonas transformantes

Para la inserción del fragmento amplificado, el plásmido fue digerido con la enzima EcoR-V (20ng/μl del plásmido fueron digeridos durante 3 horas a 37<sup>o</sup>, utilizando 1.5 unidades de la enzima EcoRV invitrogen®). La inserción del producto de PCR en el plásmido se realizó bajo las siguientes condiciones: se colocó una muestra del producto de PCR y del plásmido digerido, conservando una relación 4 :1, esto fue mezclado cuidadosamente y se incubó por 12 horas a temperatura ambiente. Después se realizó la transformación y consecuentemente la clonación de células competentes de *E. coli* DH5α nuevamente siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 1989 (Anexos). La selección de las células transformantes se realizó en placas de medio LB que contenían ampicilina (100 μg/ml), Kanamicina (50 μg/ml), XGAL (40μg/ml) e IPTG ( 40μg/ml), obteniendo colonias blancas y azules, de las cuales, se seleccionaron las colonias blancas, debido a que el fragmento del gen *tbpA* de *Av. paragallinarum* interrumpió el gen *lacZα* del plásmido pBluescriptII Ks (+) por lo

que las colonias *lacZ* $\alpha$  negativas son las que tienen el inserto; generando las clonas que contenían el pBluescriptII Ks (+)-*tbpA*.

Para corroborar que las clonas seleccionadas tuvieran el inserto se realizó una reacción de PCR utilizando como DNA molde el plásmido recombinante.

Algunas de estas clonas se purificaron y se les extrajo el DNA plasmídico siguiendo el protocolo descrito por Sanbroock et al., 1989 (Anexos) para la posterior secuenciación del producto amplificado.

#### 6.1.5 Secuenciación y análisis *in silico*

La secuenciación se realizó mediante el protocolo de secuenciación de primer dye y Ta Sv1 deoxy-terminador, en un analizador Perkin-Elmer (Secuenciador ABI prisma 3100), utilizando los primer diseñados en el presente trabajo.

El análisis *in silico* de la secuencia obtenida del probable gen *tbpA* de *Av. paragallinarum*, se realizó comparando la secuencia obtenida, con secuencias previamente reportadas en el banco de genes, utilizando los programas [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) y [www.expasy.org/tool](http://www.expasy.org/tool).



## 7. Resultados

### 7.1.- Diseño de oligonucleótidos $tbpA^a$ y $tppA^b$ .

A partir de las secuencias nucleotídicas de genes  $tbpA$ , reportadas de diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*, incluida la secuencia reportada por Negrete Abascal et al. (2009), se diseñaron los oligonucleótidos  $tbpA^a$  y  $tppA^b$  para amplificar el probable gen  $tbpA$  de *Av. paragallinarum* (Figura 3).

$tbpA^a$ : 5'- tatgtcacaggtaccaaaaagaaa-3  
 $tppA^b$ : 5'- attgcattaagcgaagattgac-3

Figura 3.-Oligonucleótidos upper y lower, diseñados para amplificar la secuencia del gen  $tbpA$ .

#### 7.1.1.- Aislamiento del DNA cromosómico de *Av. paragallinarum*

El DNA genómico de *Av. paragallinarum* se obtuvo usando el método de extracción descrito por Sanbrook et al., 1989. La extracción no mostró contaminación de RNA como se muestra en la figura 4.

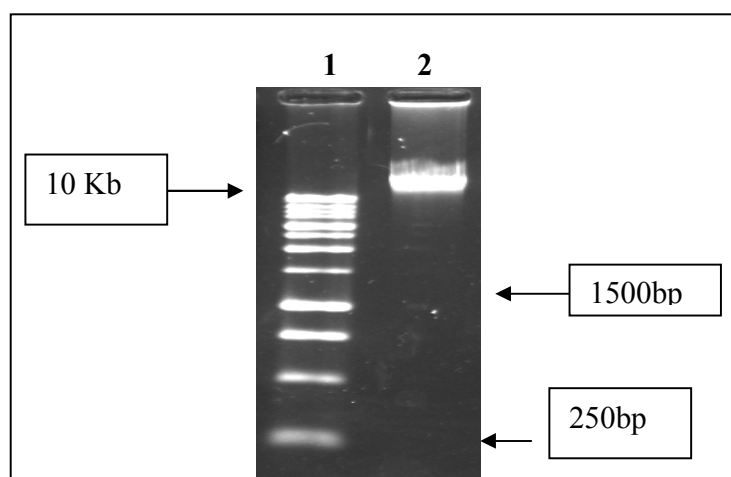


Figura 4.- Gel de agarosa (1 %). Se muestra el DNA genómico de *Av. paragallinarum* en el carril 2 y en el carril 1 se observa el marcador de peso molecular (10 kb).

### 7.1.2.- Amplificación del gen, inserción y clonación.

Las condiciones de la PCR ideales para amplificar el gen *tbpA* de *Av. paragallinarum* utilizando el par de oligonucleótidos diseñados (*tbpA<sup>a</sup>* y *tpaA<sup>b</sup>*) fueron: desnaturalización a 95 °C por 3 minutos; 95 C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos; 72 °C durante 1.30 minutos; estos últimos tres pasos durante 30 ciclos, con una extensión final de 3 minutos a 72 °C. En la figura 5 se observa el producto del PCR de aproximadamente 3000 pb.

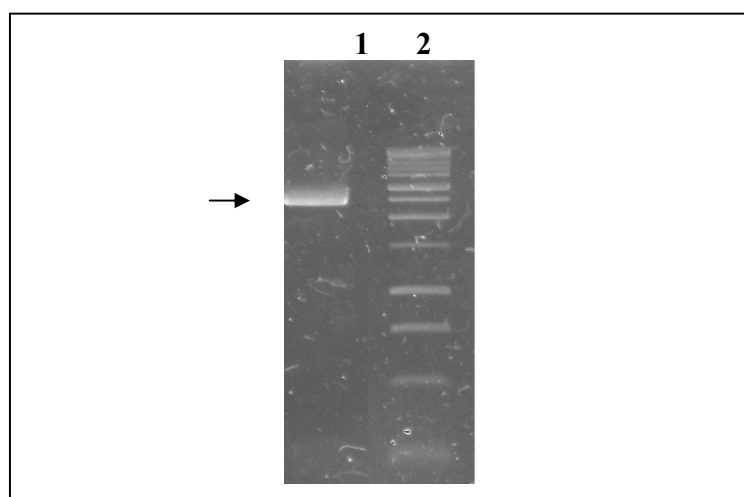


Figura. 5.-. Gel de agarosa (1%) donde se muestra el producto de amplificación por PCR del gen *tbpA* de *Av. paragallinarum* (carril 1); Carril 2 marcador de peso molecular (1 kb).

Con estas condiciones y con los oligos diseñados se pudo obtener un amplicón de aproximadamente 3000pb; sin observarse una amplificación inespecífica.

El amplicón se extrajo del gel de agarosa, siguiendo las instrucciones del sistema de purificación de productos de PCR y gel Wizard® SV de Promega, y se inserto en el vector plásmidico pBluescriptII Ks (+), generando el plásmido pBluescriptII Ks (+)-*tbpA*.

Con este plásmido se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . La selección de las células transformantes se realizó en placas de medio LB suplementadas con penicilina (50  $\mu$ g/ml), IPTG (40  $\mu$ g/ml) y X-gal (40  $\mu$ g/ml); se seleccionaron las colonias blancas debido a que el fragmento del gen *tbpA* de *Av. paragallinarum* interrumpió el gen *lacZ $\alpha$*  del plásmido *pBluescriptII Ks (+)*.

Las clonas obtenidas (células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  que contienen el plásmido *pBluescriptII Ks (+)-tbpA*) fueron resembradas, y posteriormente se les extrajo el DNA plasmídico (Figura 6).

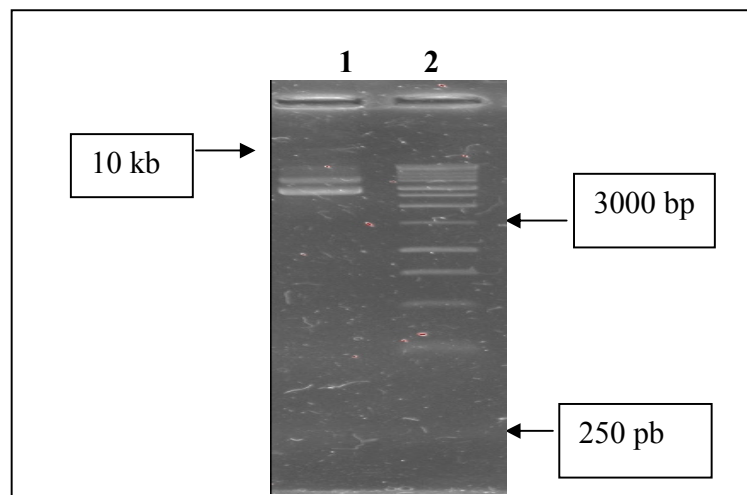


Figura 6.- Gel de agarosa (0.8%) donde se muestra el DNA plasmídico *pBluescriptII Ks (+) – tbpA* obtenido de las clonas seleccionadas. Carril 1 DNA plasmídico. Carril 2 marcador de peso molecular de 10 Kb.

Para comprobar que las clonas tuvieran el inserto se purificó el plásmido de una de estas clonas y se realizó una reamplificación usando como molde al plásmido recombinante a las mismas condiciones de PCR previamente descritas (Figura 7).

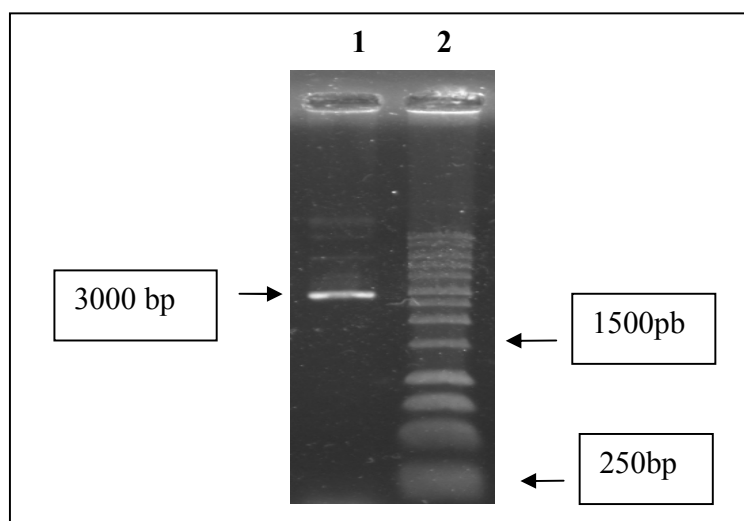


Fig. 7.- Gel de agarosa (1%) donde se muestra: Carril 1 producto de PCR en el cual se utilizo como DNA molde el plásmido pBluescriptII Ks (+)- *tbpA* ( con inserto); carril 2 marcador de peso molecular 10 kb.

### 7.1.3.- Secuenciación del gen clonado

La secuencia nucleotídica obtenida del plásmido purificado (la clona pBluescriptII Ks (+)-*tbpA*, Figura 8), correspondió a un fragmento de 1800 pares de bases. Este fragmento fue analizado utilizando los programas de [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) y [www.expasy.org/tool](http://www.expasy.org/tool): se encontró una identidad de 97 % con genes *tbpA* de miembros de la familia *Pasteurellaceae*: *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7; *Haemophilus parasuis* strain Nagasaki TbpA (*tbpA*); *A. pleuropneumoniae* transferrin binding protein 2 (*tbpB*) and transferrin binding protein 1 (*tbpA*); *A. pleuropneumoniae* *tbpB* gene encoding transferrin receptor .



secuencia obtenida, fue parcial al fragmento clonado. Con los nuevos oligonucleótidos  $tbpA^c$  y  $tbpA^d$  (Figura 10) se establecieron nuevamente condiciones ideales para la PCR: desnaturalización a 95 °C por 3 minutos; 95 C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos; 72 °C durante 1.30 minutos; estos últimos tres pasos durante 30 ciclos, con una extensión final de 3 minutos a 72 °C. En la figura 11 se observa el producto del PCR de aproximadamente 1500 pb.

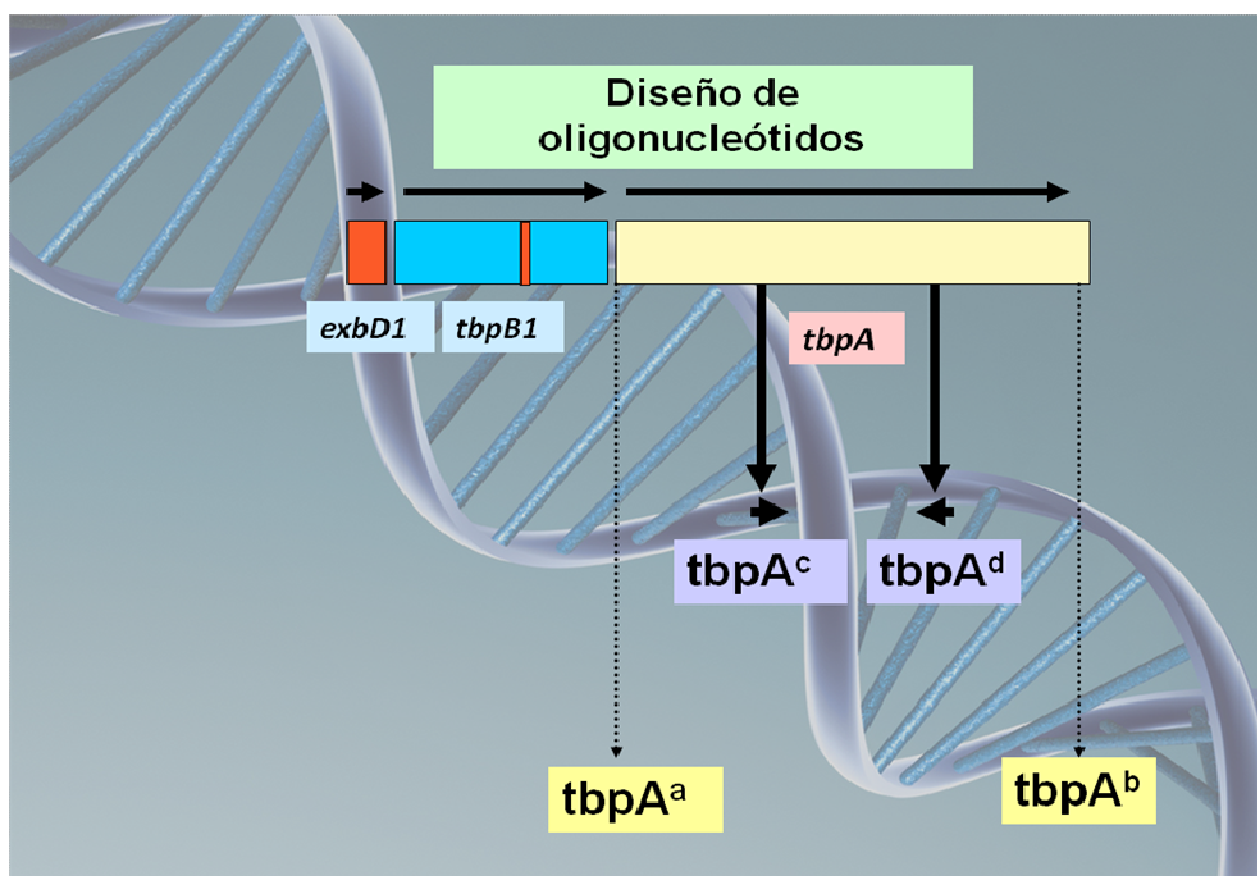


Figura 9.- Representación esquemática del diseño de oligonucleótidos: a partir de la secuencia obtenida, en la cual se utilizaron los oligonucleótidos  $tbpA^a$  y  $tbpA^b$ , se diseñaron nuevos oligonucleótidos complementarios ( $tbpA^c$  y  $tbpA^d$ ) a los extremos de esta secuencia, con la finalidad de obtener la secuencia completa del gen  $tbpA$ .

tbpA<sup>c</sup>: 5"-aggttgagtgtcttatgatggtc 3"  
tbpA<sup>d</sup> 5"- catcgctggagccttcggt 3"

Figura 10.- Oligonucleotidos diseñados complementarios a la secuencia obtenida del gen *tbpA*

Este producto de PCR fue secuenciado a las condiciones descritas anteriormente. La secuencia obtenida, fue analizada utilizando los programas [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) y [www.expasy.org/tool](http://www.expasy.org/tool). A partir de esta secuencia, se obtuvo la secuencia nucleotidica completa del gen *tbpA* de *Av. paragallinarum* (Figura 12).

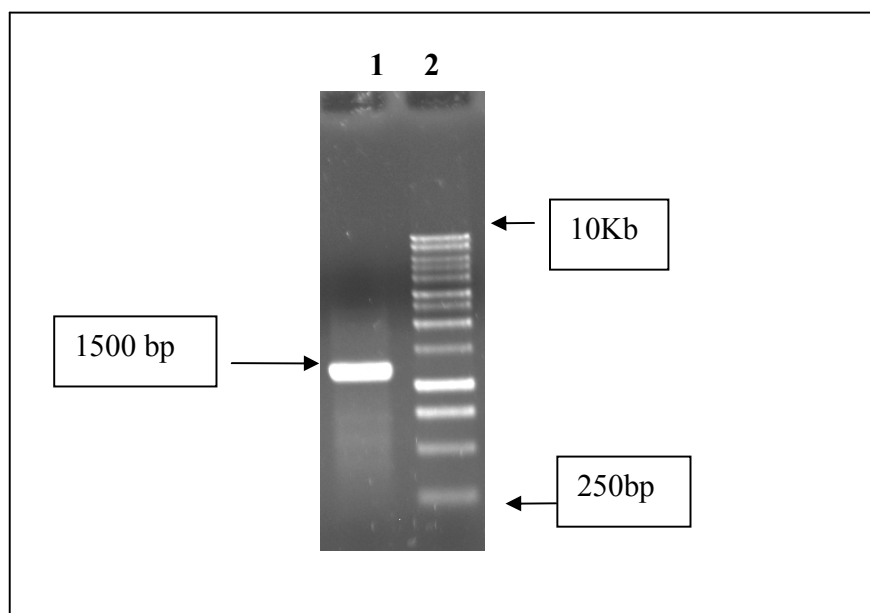


Figura 11.-Gel de agarosa (1%) donde se muestra: (carril uno) producto de PCR, en el cual se utilizo como DNA molde el plásmido pBluescriptII Ks (+) con inserto, y los oligos *tbpA<sup>c</sup>* y *tbpA<sup>d</sup>* complementarios a los extremos de la secuencia, (carril dos) marcador de peso molecular 10 kb

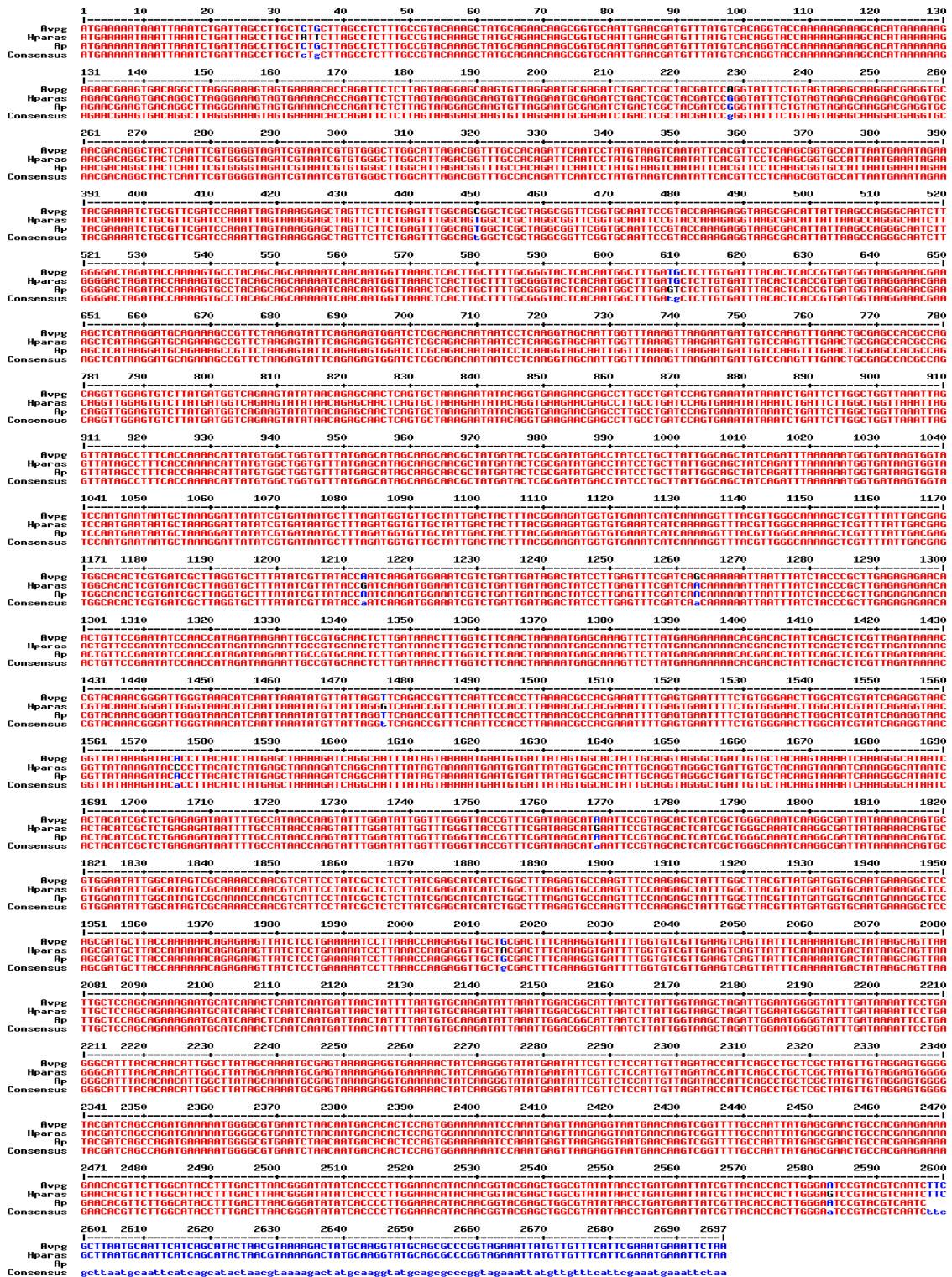


Figura 12. Alineamiento de la secuencia completa, obtenida del gen *tbpA* de *Av. paragallianrum* (avpg), con las secuencias de los genes *tbpA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 (Ap) y *Haemophilus parascapularis* cepa Nagasaki (Hpar). En azul se señala la identidad, y en negro las divergencias pbluescript-*tbpA*.



Como parte del análisis *in silico* se realizó la traducción de la secuencia nucleotídica a proteína. Una búsqueda BLAST en la base de datos de GenBank data base, revelo un 97 % de identidad con la proteína TbpA reportada para *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 (Figura 13).

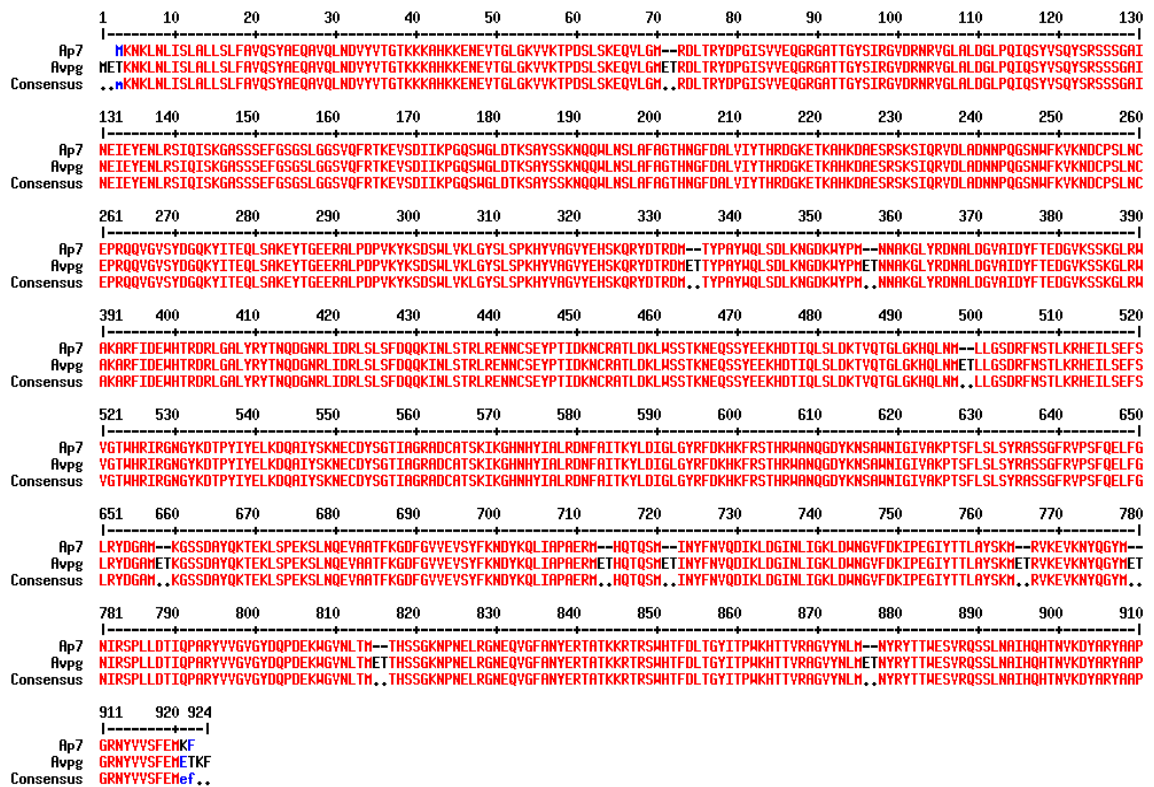


Figura 13. Alineamiento de la secuencia obtenida de la proteína hipotética (TbpA) de *Av. paragallinarum* con la secuencia de la proteína de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7.

La proteína hipotética obtenida presentó sitios de unión característicos de las proteínas TbpA (Figura 14). En las bacterias Gram negativas, una vez que la proteína que transporta el hierro se encuentra asociada a la membrana externa, el ion que es liberado, debe atravesar la membrana para alcanzar el periplasma, la permeabilidad de la membrana externa viene determinada por las proteínas formadoras de poros o

canales (en este caso TbpA) a través de los cuales puede difundir distintas moléculas. Mientras tanto la energía necesaria para llevar a cabo este proceso es aportada por el complejo proteico TonB.

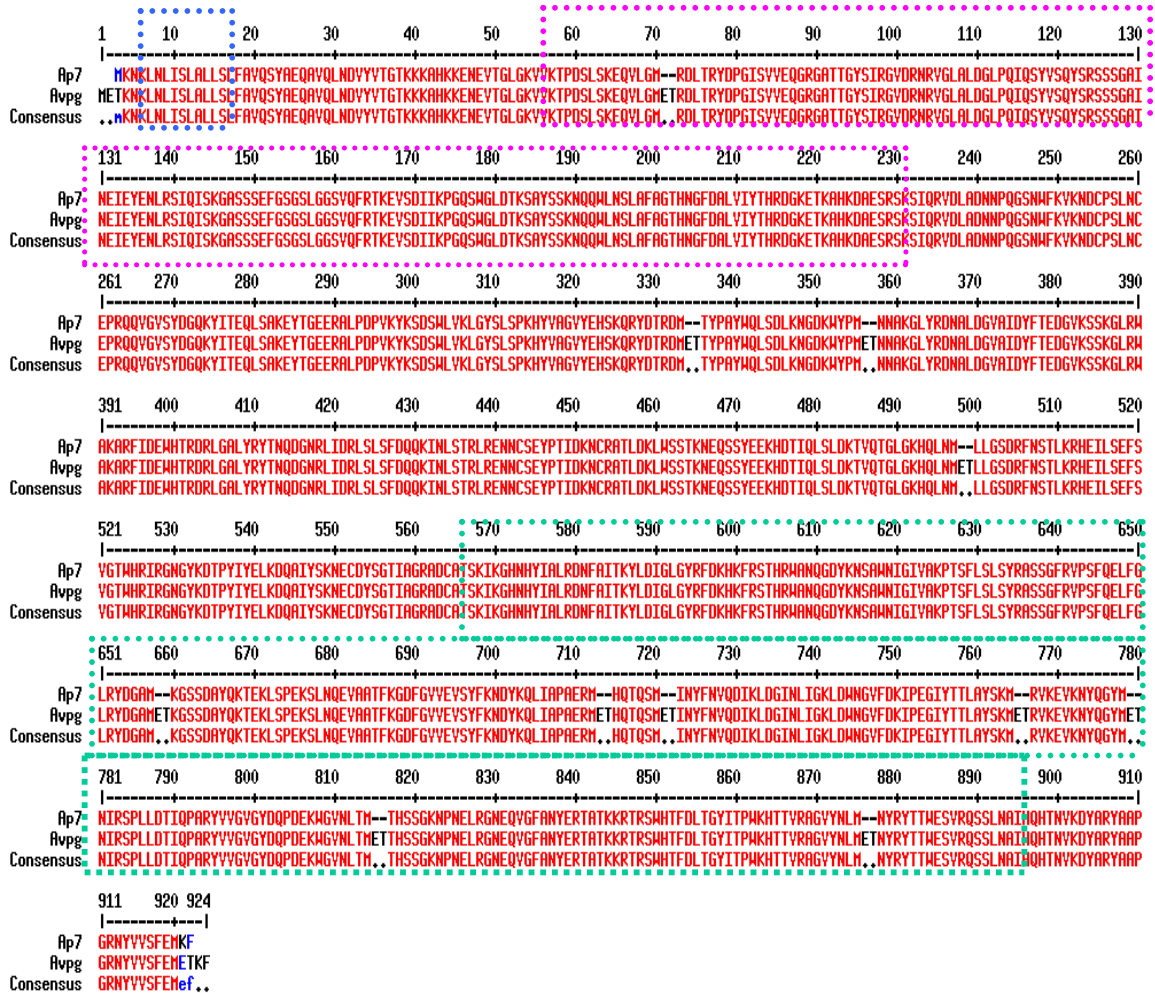


Figura 14 Representación de los sitios conservados encontrados en la secuencia nucleotídica del gen *tbpA* de *Av. paragallinarum* traducida a proteína: Se muestra el alineamiento de la secuencia obtenida de la proteína hipotética (TbpA) de *Av. paragallinarum* con la secuencia de la proteína de *Actinobacillus pleuroneumoniae* serovar 7, y se representan mediante colores los distintos sitios conservados de estas proteínas: en color Azul se representan los sitios de unión al complejo TonB (Ubicación 6-17), en color rosa canales de paso (porinas) (Ubicación 56-231), y en color verde los sitios de unión al ligando (Ubicación 556-898).

## 8. Discusión

La CI es una enfermedad que tiene una importancia económica, debido a que causa pérdidas económicas a la industria avícola causando principalmente retraso en el crecimiento del ave infectada, pérdida de peso, y sobre todo disminución en la producción de huevos (Blackall et al., 2003). Debido a que los mecanismos y elementos que le permiten a *Av. paragallinarum* (agente causal de la CI) colonizar y producir la enfermedad, han sido poco estudiados, éstos, han limitado el entendimiento de este proceso, y el desarrollo de nuevas estrategias para combatir esta enfermedad, por ello, con el propósito de contribuir con el entendimiento de uno de estos mecanismos, en el presente trabajo se amplificó por PCR, se clonó y caracterizó el gen *tbpA* de este microorganismo, siendo el producto de este gen, una proteína que se encuentra involucrada en la adquisición de hierro, y podría ser considerado como uno de los factores de virulencia de *Av. paragallinarum*.

La proteína TbpA se encarga de la extracción del hierro proveniente de las transferrinas. Estas últimas, son consideradas como el sistema más importante de regulación de hierro en los vertebrados y de algunos invertebrados, además en el caso particular de las aves las transferinas cumplen una doble función: captación y liberación del hierro (Abadía y Chahine, 1999).

Los oligonucleótidos empleados para amplificar el gen *tbpA* de *Av. paragallinarum*, (*tbpA<sup>a</sup>* y *tbpA<sup>b</sup>*) fueron diseñados en base a secuencias de genes *tbpA* previamente reportadas para miembros de la familia *Pasteurellaceae*, así como también, a partir de la secuencia de la proteína TbpA reportada para *Av. paragallinarum* (Negrete et al., 2009). Utilizando estos oligonucleótidos se obtuvo un gen de aproximadamente 3000 pb. El tamaño de este gen amplificado es semejante al de genes *tbpA* previamente reportados para otras especies de la familia *Pasteurellaceae* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)): Gen *tbpA* de *A. pleuropneumoniae* serovar 7 (3100 pb) y Gen *tbpA* de *Haemophilus parasuis* strain Nagasaki (2700 pb).

Al realizar el proceso de secuenciación y posterior análisis de la secuencia del gen amplificado, se encontró que el gen *tbpA* de *Av. paragallinarum* presenta una identidad del 97% con el gen *tbpA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7. La identidad encontrada entre estos dos genes *tbpA*, permiten sugerir que podría ser causa, de que ambos microorganismos comparten algún mecanismo de acción.

Como parte del análisis *in silico*, se tradujo la secuencia nucleotídica en una secuencia de aminoácidos, en esta secuencia se encontraron sitios conservados característicos los canales de paso, sitios de unión al complejo TonB y ligandos. Estas características, en conjunto forman parte de sitios conservados, presentes en todas las proteínas TbpA (Cornelissen et al., 2000).

Investigaciones previas han reportado en muchas bacterias, incluidas Gram positivas, que la mayoría de los cationes difunden libremente por la membrana externa hacia el espacio periplásmico, mediante las porinas. No obstante dado que el hierro se encuentra en el hospedero en muy bajas concentraciones, y además el tamaño de las proteínas transportadoras del hierro es superior al tamaño que podría pasar a través de las porinas, es más factible que las bacterias adquieran el hierro que necesitan a través de receptores específicos de moléculas transportadoras del hierro provenientes del huésped como por ejemplo a través del complejo TbpA y TbpB (Gallego 2003). En el caso particular de los receptores de las transferrinas (TbpA y TbpB), han sido ampliamente encontrados en miembros de la familia *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae*, y se ha descrito una interacción directa con el complejo proteico TonB: dado que estos receptores necesitan energía para liberar el sustrato en el periplasma (Moeck y Coulton 1998 y Braun 1995), es decir la energía que necesitan es proporcionada por el complejo TonB, a través de una unidad anclada en la membrana interna integrada por tres proteínas (TonB, ExbB y ExbD) Estas proteínas suministran un potencial electroquímico a los receptores de la membrana externa desde la membrana citoplasmática (Braun et al., 1998, Kadner 1990, Moeck y Coulton 1998 y Postle 1999). La proteína Ton B se encuentra anclada a la membrana citoplasmática por su región N- Terminal (Postle y Skare, 1988) y presenta una región

rica en prolinas de manera que se forma una región rígida y extensa que se expande por el espacio periplasmático y permite que su dominio C Terminal interactúe con los receptores de la membrana externa (Reynolds et al., 1980). Así la proteína TonB interactúa con el complejo ExbB- ExbD por su extremo N-terminal y con los receptores de la membrana externa por su extremo C-terminal. En cuanto al funcionamiento de este sistema se cree que la proteína transportadora se unirá a su receptor, localizado en la membrana externa, lo que provocaría su cambio conformacional de manera que permitirá que este interactúe con TonB, proporcionando la energía necesaria para que el receptor forme un poro en la membrana externa, mediante una serie de cambios conformacionales. Todo este proceso haría que el receptor perdiera afinidad por su ligando, permitiendo así el paso de este a través del poro hacia el periplasma (Moeck y Coulton 1998). Las proteínas ExbB- ExbD estabilizarían a TonB y contribuirían también a su reciclaje, necesario después de sufrir el ciclo de cambios conformacionales (Pradel et al., 2000). Una vez dentro el hierro del espacio periplasmático intervienen unas proteínas periplasmáticas de unión al ligando. Estas proteínas, denominadas SBPs (Substrate- Binding Proteins) actúan como lanzadera, en las bacterias Gram negativas, recogiendo el sustrato liberado (por ejemplo hierro) del receptor de la membrana externa y lo transfieren al componente transmembranal correspondiente de la membrana interna (Ames., 1986). Así tras la unión del sustrato a la proteína correspondiente, el complejo interactúa con el componente transmembranal respectivo teniendo lugar el transporte hacia el citoplasma, gracias a la energía liberada por la hidrólisis del ATP.

Otro hecho importante de analizar, es la existencia, en una misma bacteria, de más de una proteína implicada en un mismo objetivo, por ejemplo; Bosch en el 2003 trabajo con *P. multocida*, reportó que esta bacteria tiene al menos 7 proteínas que tienen al menos una función homóloga y según su análisis, probablemente se trate de un sistema de seguridad que garantiza la unión de hemina en el caso que se produzca una mutación en cualquiera de estos genes. En *Av paragallinarum* se han descrito la liberación de citotoxinas, metaloproteasas; y microvesículas que son estructuras membranales que podrían estar implicadas en la virulencia; las que se considera contienen entre otras cosas, proteasas, probables proteínas rtx, y DNA (Ramón Rocha

et al., 2005). Se considera que algunas proteasas son capaces de degradar las células rojas del huésped, liberando el grupo Hemo que transporta el hierro, por lo que de existir un receptor del grupo hemo en la membrana externa podría ser posible que *Av. paragallinarum*, tuviera dos diferentes receptores con una función homóloga (obtener hierro). Larios et al., 2006 encontraron proteínas secretadas diferencialmente al crecer la bacteria en condiciones de limitación del hierro y según su análisis, la expresión de estas proteínas podrían ser importantes para la patogenicidad de este microorganismo.

De acuerdo con lo indicado en párrafos anteriores, la mayoría de las proteínas reportadas, que se encuentran implicadas en la captación de hierro tienen regiones comunes, características de cada familia de proteínas y estas regiones se encuentran muy conservadas (Braun, 1998). Sin embargo, es importante caracterizar empíricamente todos los productos de los genes implicados en la captación de hierro de este y otros microorganismos, evitando una generalización, y de esta manera entender adecuadamente, el proceso de captación de hierro utilizado por cada bacteria, y de esta manera lograr comprender el proceso infeccioso, ya que es muy probable que existan variantes en las proteínas de membrana de las diferentes especies aun provenientes de la misma Familia. (Kennett et al., 1993; Ruffolo et al., 1998; Srivastava, 1998; Adler et al., 1999), por ejemplo: en la investigación realizada en *Pasteurella multocida*, una bacteria que al igual que *Av. paragallinarum*, afectan a los animales domésticos y en particular a las aves (Hunt et al., 2000), encontraron que el uso de vacunas cuyo blanco eran los antígenos de la membrana, incluyendo las proteínas involucradas en la adquisición del hierro, no siempre ofrece una protección cruzada eficiente, (Rossi-Campos et al., 1992; Potter et al., 1997), siendo este un ejemplo de que existen variantes en las proteínas de la membrana externa.

En la superficie bacteriana puede haber estructuras que tienen una función biológica importante, una de estas estructuras son las proteínas sensoras, las cuales detectan los cambios de temperatura, osmolaridad, salinidad, oxígeno, nutrientes, etc. Al sentir estos cambios en el medio, estas proteínas envían una señal molecular para que haya

una respuesta a estos cambios, la cual puede ser la expresión de determinantes de virulencia por ejemplo las exotoxinas (Todar, 2002), por lo que el haber identificado el gen *tbpA* de *Av. paragallinarum*, nos lleva a pensar que existe un regulador de este gen, pues además la expresión de esta proteína de membrana externa (TbpA), fue encontrada al crecer *Av. paragallinarum* en condiciones limitantes del hierro (Larios, 2006), sin mencionar que la presencia de la proteína Fur en *Av. paragallinarum*; La proteína Fur, ha sido reportada para *Av. paragallinarum* en el 2007 por Chantes Guerra, quien realizó un estudio donde identificó y secuenció el gen (*fur*) de *Av. paragallinarum*. Se ha encontrado en otras especies, que la expresión de genes cuya mayoría están implicados en la captación de hierro, en la biosíntesis de sideróforos, o en la codificación de proteínas de membrana externa, receptoras de moléculas transportadoras de hierro del huésped, están regulados por una proteína Fur (Hantke., 2001).

Ante estas observaciones, es posible poner en manifiesto la necesidad de trabajos más ambiciosos que continúen con la construcción, del análisis de estos genes en diferentes especies, ayudando así al entendimiento de estos mecanismos.





## 10.-Conclusiones

- 1 *Av. paragallinarum* posee un gen *tbpA*.
- 2 La secuencia de este gen presenta una alta identidad con las secuencias de otros genes ya descritos.
- 3 La secuencia de la proteína hipotética obtenida, presenta sitios conservados característicos de las proteínas TbpA

## 11.- Perspectivas

- >Obtener mutantes de *tbpA*.
- >Determinar si la proteína TbpA esta regulada por la proteína Fur.
- >Identificar el (los) mecanismo que aporta la energía a las proteínas de membrana de *Av. paragallinarum* .
- > Determinar si TbpA es esencial para el desarrollo de la bacteria.

## 12. Anexos

### 12.1.-. Aislamiento del DNA cromosómico de *Av. paragallinarum* (Sanbrook et al., 1989)

- 1.- Se incubó una colonia de *Av. paragallinarum* en 5 ml de medio a 37 °C toda la noche.
- 2.- Se centrifugó a 14000 rpm/ 5 minutos, se obtuvo la pastilla celular y se desechó el sobrenadante.
- 3.- A la pastilla celular se le adicionó 150 µl de búfer de lisis y se agitó. Posteriormente se le agregó 10mg de lisozima, se agitó y se incubó 20 minutos a 37°C.
- 4.- Se le adicionaron 20 µl de NaCl .5 M y se agitó por inversión muy suavemente
- 5.- Se agregó 1 volumen de fenol –cloroformo- isoamílico (con una concentración de 25-24-1, volúmenes respectivamente), se agitó y se centrifugó 6 minutos a 14000 rpm.
- 5.- Se agregó un volumen de cloroformo, se agitó y se centrifugó 5 minutos a 14000 rpm.
- 6.- Se obtuvo la fase acuosa y se adicionaron .1 volumen de acetato de sodio (3M a pH 7) y dos volúmenes de etanol absoluto frío; se colocó en frío por 60 minutos.
- 9.- Se centrifugó 5 minutos a 1300 rpm y se lavó la pastilla con etanol al 70 %.
- 10.- El DNA se resuspendió en 20 µl de agua desionizada estéril. Se guardó a -20°C.

### 12.2.-. Purificación de productos de PCR y gel Wizard® SV de Promega

#### 12.2.1.-. Extracción de banda

##### 1.- Disolución del gel

- a) Se cortó la banda y se colocó en un tubo de 1.5 ml.

b) Se adiciono 10µl de solución de unión a membrana por cada 10 mg de gel, se agitó e incubo a 65 °C hasta que se disolvió el gel.

## 2.- Unión de DNA

a) Se insertó una mini columna SV dentro del tubo de colección.

b) Se transfirió la mezcla disuelta del gel a la mini columna, se incubó a temperatura ambiente por un minuto.

c) Se centrifugo a 1600 rpm por 1minuto, se descartó y reinsertó la minicolumna al tubo de colección.

## 3.- Lavado de DNA

a) Se adicionaron 700 µl de solución de lavado de membrana, se centrifugo a 1600 rpm por 1 minuto, se descartó y se reinserto la minicolumna.

b) Se repitió el paso con 500µl de solución de lavado de membrana, se centrifugo a 12000 rpm por 5 minutos.

## 4.- Elusión de DNA

a) Se transfirió la minicolumana a un tubo de 1.5 ml nuevo.

b) Se adicionaron 50µl de agua libre de nucleasas, se incubó a temperatura ambiente 1 minuto y se centrifugo a 1600 rpm por 1 minuto.

c) Se desecho la minicolumna y se almacenó el DNA a -20 °C.

### 12.3.- Transformación bacteriana

a) Se descongeló en hielo 120  $\mu$ l de células competentes y se agregaron 100-200  $\mu$ l del volumen de ligación, en el caso del plásmido se agregaron 50 ng de DNA y se dejó en reposo durante 30 minutos en hielo.

b) Incubar a 37 °C por 10 minutos o 3 minutos a 45°C.

c) En condiciones de esterilidad se agregó 1ml de LB sin antibiótico y se incubó a 37 °C sin agitación por 1 hora.

c) Se espatularon 50  $\mu$ l de la transformación en placas de LB con 50  $\mu$ g/ml de ampicilina XGAL(40 $\mu$ g/ml) e IPTG( 40 $\mu$ g/ml) y se incubo toda la noche a 37 °C.

### 13.- Sistema de transporte citoplasmático

Los sistemas de transporte del tipo ABC (ATP Binding Cassette). Utilizan la energía proporcionada por la hidrólisis de 1 ATP para transportar el sustrato a través de las membranas celulares. Típicamente estos sistemas son específicos para un determinado ligando como los iones inorgánicos, aminoácidos, glucidos o polipéptidos entre otros (Higgins, 1992). Estos transportes están presentes en todos los organismos vivos y comprenden una de las familias más grandes de proteínas. En procariotas se han identificado centenares de sistemas de transporte ABC, y en cada caso, los análisis de la estructura de los componentes relacionados funcionalmente ponen en manifiesto que forman una familia de proteínas homologas. Todas ellos están compuestos por sistemas con una organización estructural similar, incluyendo al menos una proteína periplásmica de unión al ligando y un componente translocador. Este último consta de un elemento asociado a la cara externa de la membrana citoplasmática y de un elemento asociado a la cara interna de la membrana citoplasmática que contiene algún dominio (o cassette) de unión al ATP (Fath y Kolter.,

1993). El componente translocador de los transportes ABC esta formado por dos dominios transmembrana y dos dominios de unión al ATP intracelulares. Cada uno de los dominios transmembrana consta múltiples hélices  $\alpha$  que se expanden a través de la membrana constituyendo el canal transmembranal, a través del cual las sustancias transportadoras a traviesan la membrana citoplasmática (Higgins. 1992). Las subunidades individuales pueden expresarse como polipéptidos separados o bien fusionados en cualquier combinación (Rodríguez., 2008). En procariotas, los transportes ABC involucrados en la captación de solutos, emplean una proteína periplamatica de unión al ligando (Higgins., 1992. Estas proteínas, denominadas SBPs (Substrate- Binding Proteins), fueron identificadas en las bacterias Gram negativas donde residen en forma soluble en el espacio periplasmático o ancladas en la membrana citoplasmática; estas proteínas actúan como lanzadera, en las bacterias Gram negativas, recogen el substrato liberado (por ejemplo hierro) del receptor de la membrana externa y lo transfieren al componente transmembranal correspondiente de la membrana interna (Ames., 1986). Así tras la unión del sustrato a la proteína correspondiente, el complejo interacciona con el componente transmembranal respectivo teniendo lugar el transporte hacia el citoplasma, gracias a la energía liberada por la hidrólisis del ATP (Higgins., 1992).

## 14.- Bibliografía

Abdallah, F. y Chaine, J. Transferrins, the mechanism of iron release by ovotransferrin. *European Journal of Biochemistry*. 1999. 263: 912-920.

Adler, B., Bulach, D., Chung, J., Doughty, S., Hunt, M., Serrano, M., Zanden, A., Zhang, Y. y Ruffolo, C. Candidate vaccine antigens in *Pasteurella multocida*. *Journal of Biotechnology*. 1999. 73: 83-90.

Ames. G. Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Annual Reviews of Biochemistry*. 1986. 55: 397-425.

Andrews, S. C., Robinson A. K. y Rodríguez-Quiñones. F. Bacterial iron homeostasis. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. 2003. 27: 215-37.

Beveridge, T. Structure of Gram negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*. 1999. 181: 4725-4733.

Blackall P. J., Matsumoto M. y Yamamoto R. Infectious Coryza. In: Saif, Y, M., Barnes H.J., Fadly, A. M., McDougald L. R., Swayme D. E. Editores *Diseases of Poultry*, Ames: Iowa State Press. 2003. pp. 691-703.

Blackall P. J. Matsumoto M. y Yamamoto R. Infectious Coryza., In: R Calnek B. W, Barnes H. J, Beard C.W., McDougald L. R., Sayf, Y. M. *Diseases of Poultry*. Editores 10<sup>th</sup> edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa. 1997. 179-190.

Blackall, P.J., Christensen H., Beckenham, T., Blackall L., y Bisgaard M. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, (*Haemophilus*) *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. Nov., *Avibacterium paragallinarum* comb.nov., *Avibacterium avium* comb. nov.

and *Avibacterium volantium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005. 55:353-362.

Bonnah, R.H., y Schryvers A. B. Preparation and Characterization of *Neisseria meningitidis* Mutants Deficient in Production of the Human Lactoferrin-Binding Proteins LbpA and LbpB. *American Society for microbiology. Journal of Bacteriology*. 1998. 12: 3080-3090.

Bosch, G. M., Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Caracterización de los mecanismos de captación de hierro de *Pasteurella multocida*. Universidad Autónoma de Barcelona, Madrid España. 2003.

Boulton I. C., Gorryng, A. R., Shergill, J. K., Joannou, C. L. y Evans, R. W. A dynamic model of the meningococcal transferring receptor. *Journal of Theoretical Biology*. 1999. 198:497-505.

Boyce, J.D., y Adler, B. The Capsule Is a Virulence Determinant in the Pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B: 2). *Infection and immunity*. 2000. 68: 3463-3468.

Braun, V. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology reviews*. 1995. 16: 295-307.

Braun, V. y Hantke, K., Mechanisms of bacterial iron transport. *Microbial Transport Systems* 2002. 289-311.

Braun, V., Hantke, K. y Koster, W., Bacterial iron transport: mechanisms, genetics and regulation. *Metal ions in biological systems*. 1998. 35: 67-145.

Chantes, G. A, Tesis de Maestría en ciencias Microbiológicas, Clonación de y caracterización molecular del gen fur de *Avibacterium paragallinarum*. Benemérita universidad Autónoma de Puebla. México- Puebla. 2007.



Cornelissen, C., .Anderson, N. E., Boulton, I. C. y Sparling, P. F. Antigenic and sequence diversity in gonococcal transferrin-binding protein A. *Infection and immunity*. 2000. 68: 4725-4735.

Cornelissen, C.N., Biswas, G. D., Tsai J, Paruchuri. D. K., Thompson, S. A. y Sparling P. F. Gonococcal transferrin-binding protein 1 is required for transferrin utilization and is homologous to TonB-dependent outer membrane receptors. *Journal of Bacteriology*. 1992. 174: 5788-5797.

Coyle, E. A. y Pharm, D.. Targeting Bacterial Virulence: The Role of the Protein Synthesis inhibitors in Severe Infections. Insights from the Society of Infectious Disease Pharmacists. *Pharmacotherapy Publications*. 2003. 23: 638-642.

Escolar, L., P., Perez M. y .De Lorenzo V. Opening the iron box: Transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of Bacteriology*. 1999. 181: 6223-6229.  
Fath, M. J., y Kolter R. ABC transporters bacterial exporters. *Microbiological reviews*. 1993. 57: 995-1017.

Fuller, C. A., Yu, R., Irwin, A. W. y Schryvers, A. B., Biochemical evidence for a conserved interaction between bacterial transferrin binding protein A and transferrin binding protein B. *Microbial Pathogenesis*. 1998. 24: 75- 87.

Gallego, B. M., Tesis de Maestría en ciencias. Caracterización de los sistemas de captación de hierro *Pasteurella multocida*. Universidad Autónoma de Barcelona. España-Barcelona 2003.

García, F. A., Angulo E., Ortiz, A. M. y Blackall P. J. The presence of nicotinamide adenine dinucleotide independent *Haemophilus paragallinarum* in Mexico. *Avian Diseases*. 2004. 48: 425-429.

Garrido, O. E., Tesis de Maestría. Caracterización de los sistemas de captación de hierro y zinc del patógeno animal *Pasteurella multocida*. Universidad Autónoma de Barcelona. España-Barcelona 2005.

Garrido, O. E., Tesis de Maestría. Caracterización de los sistemas de captación de hierro y zinc del patógeno animal *Pasteurella multocida*. In: van Villet, A. M., Rock., J. D., Madeleine, L. N y Ketley, J. M. The iron- responsive regulador Fur of *Campylobacter jejuni* is expressed from two separate promoters. Federation of European Microbiol Letters. 2005. 188: 115-118.

Gray-Owen, S.D., y Schryvers, AB., Bacterial transferring and lactoferrin receptors. Microbiology. 1996. 4: 185-191.

Hantke K. Iron and metal regulation in bacteria. Current Opinion in Microbiology. 2001. 4: 172-177.

Higgins C.F.ABC transporters: from microorganismos to man. Annual review of biology. 1992. 8: 67-113.

Hobb,I. R., Tseng, Hsing-Ju, Downes, E. J., Terry, D. T., Blackall, J.P., Takagi, M. y Jennings, P. M. Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus, paragallinarum*, Microbiology. 2002. 148: 2171-2179.

Hunt, M. L., Adler, B, y Twonsend, K. M., The molecular biology of *Pasteurella multocida*. Veterinary Microbiology. 2000. 72: 3-25.

Kadner, R. J. Vitamin B12 transport in *Escherichia coli*: energy coupling between membranes. Molecular Microbiology. 1990. 4: 2027-2033.

Kennett, L., Muniandy, N. y Mukkur, T. Comparative protective potential of nonliving intact cells and purified outer membrane and associated of *Pasteurella multocida* type

6:B grown under iron- regulated conditions. Australian Centre for International Agricultural Research. 1993. 43: 144-148.

Kregulac, D. K., y Voguel, J. H. Structural biology of bacterial iron uptake *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008. 9: 1781-1804.

Larios A., Tesis de Licenciatura, Expresión de proteínas reguladas por hierro en *Avibacterium paragallinarum* UNAM\_FES-I. México. 2006.

Larios A., Vaca S., Vázquez C., y Negrete E. Expresión de proteínas reguladas por hierro en *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum*. XXXV Congreso Nacional de microbiología. Oaxtepec, Morelos. 2006.

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

Mifflin, J.K., Horner, Rf., Blackall, P. J., Chen, X., Bioshop, G. C. y Morrow C. J. Phenotypic and molecular caracterizacion of V-factor (NAD)- independientes *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Diseases*. 1995. 39: 304-308.

Moec, G. S. y Coulton, J. W. TonB- dependiente iron acquisition: mechanisms of siderophore active transport. *Molecular Microbiology*. 1998. 28: 675-681.

Morton, D. J. y Williams, P., Utilization de transferring-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 1989. 2: 123-127.

Negrete – Abascal E, Vaca S, García- Gonzales, O. P, Talvares, F., Andrade, A., y García R. M. Isolations of a putative fli C sequence in *Haemophilus paragallinarum* and *Pasteurella multocida*. *Proceedings of the International Pasteurellacea Society*

Conference; 2002 May 5-10; Banff (Alberta) Canada, Canada (Guelph): International *Pasteurellacea* Society. 2002. 37.

Negrete Abascal E.; Chantes Guerra A.; Serrano Vázquez A.; V. R. Tenorio ; Vázquez Cruz C.; Zenteno E.; Paniagua Contreras G.; Vaca Pacheco S. Identification of iron-acquisition proteins of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Pathology*. 2009. 38: 209-213.

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

Ogunnariwo, J. A. y. Schryvers, A. B. Characterization of a novel transferrin receptor in bovine Strains of *Pasteurella multocida*. *Journal of Bacteriology*. 2001. 183: 890–896.

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

Postle, K. 1999. Active transport by customized beta- barrels. *Nature structural biology*. 1999. 6: 6-3.

Postle, K. y Skare, J. T. *Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998. 263: 11000-11007.

Potter, A. A., Schryvers, A. B. Ogunnariwo, J. A., Lo, R. Y. C. y Schryvers, A. B. Characterization of the *Pasteurella haemolytica* transferrin receptor genes and the recombinant receptor proteins. *Microbial Pathogenesis*. 1997. 23: 273-284.

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

Ramón Rocha, M.O., Garcia-Gonzales, O. Perez- Mendez, A., Ibarra-Caballero, J., Perez Marquez, V.M., Vaca, S., Negrete-Abascal, E. Membrane vesicles released by *Avibacterium paragallinarum* contain putative virulence factors. Federation of European Microbiological Societies. Microbiology letters. 2006. 257: 63-8.

Ratledge, C. y Dover, L. G., Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annual Review of Microbiology. 2000. 54: 881-9741.

Reynolds, P.R., Mottur. G. P. y Bradbeer. C. Transport of the vitamin B12 in *Escherichia coli*. Some observations on the roles of the gene products of BtuC and TonB. The Journal of Biological Chemistry. 1980. 255: 4313-4319.

Rimler, R.,B., Shotts, E., B., Brown, J., Davis. R. The effect of atmospheric conditions on the growth of *Haemophilus gallinarum* in a defined medium. Journal of General Microbiology. 1976. 92: 405-409.

Rimler, R.,B., Shotts, E., B., Brown, J.,Davis.R.,B., The effect of sodium chloride and NADH on the growth of six strains of *Haemophilus* species pathogenic to chickens. Journal of General Microbiology. 1997. 98: 349-354.

Rivero-Garcia, P. C., Alonso. P., Vaca, S., Negrete-Abascal, E. *Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteasas. Canadian Journal of Microbiology. 2005. 51: 893-6.

Rodríguez. A., J. Caracterización de los sistemas de captación de zinc y de hierro en *Streptococcus suis*: potencial antigénico y protector Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Barcelona España. 2007.

Rossi- Campos, A., Anderson, C., Gerlach, G.F., Klashinsky, S., Potter, A. A. y Willson, P J., Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuroneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine*. 1992. 10: 512-518.

Ruffolo, C.G.Jost, B. H. y Adler, B. 1988. Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. *Veterinary Microbiology*. 1998. 59: 123-137.

Sambrook E. F. Fritsch, y T, Maniatis. *Molecular cloning, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor N. Y., Cold spring Laboratory Press 1989.

Sawata, A., Nakai, T., Kume, K., Yoshikawa, H. y Yoshikawa T. Intranasal inoculation of chickens with encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*: electron microscopic evaluation of the nasal mucosa. *American Journal of Veterinary Research* 1985. 46: 2346-2353.

Schryvers, B. y Stojiljkovic, I. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*, *Molecular Microbiology*. 1999. 32: 1117-1123.

Serrano V. A. Clonación y caracterización del gen *fliC* de *Avibacterium paragallinarum*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias de la producción y de la Salud Animal, UNAM. 2007.

Soriano V., y Terzolo H. Epizootiología, prevención y control de la coriza infecciosa. *Veterinaria México*. 2004. 35: 254-259.

Soriano V. y Terzolo R. Epizootiología, prevención y control de la coriza infecciosa In: Swayne. D., Glisson J.R., Jackwood, M.W., Pearson J.E. Reed W.M, editors, *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 4<sup>th</sup> Edition. Kenneth Square: American Association of Avian Pathologists. 1998. 29-34.

Srivastava, S K., Immunogenicity of *Pasteurella multocida* grown in iron restricted medium. Journal of Applied Animal Research. 1998. 136: 137-144.

Terricabras B. Importancia de los genes *fur* y *thyA* en la patogenia de *Haemophilus paraseis*. 2007. In Aisen, P. Transferrin, the transferring receptor and the uptake of iron by cells. In Marcel Dekker. Metal ions Biological Systems.. (Sigel, A. y Sigel H., eds) Marcel Dekker. 1998. 35: 585 -631.

Terzolo H.R. Revisión sobre coriza infecciosa: propuestas de investigación para su diagnóstico y control. Veterinary Medical Review. 2000. 81: 262-269.

Terzolo, H.R., Paolicchi, F.A., Sandoval, V.E., Blackall, P. J., Yamaguchi. T. y Iritani, Y. Characterization of isolates of *Haemophilus paratagallinarum* from Argentina. Avian Diseases. 1993. 37: 310-314.

Terzolo, H. R., Sandoval, V.E. y Gonzales P.F. Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B of *Haemophilus paratagallinarum*. Avian Pathology. 1997. 26: 356-376.

Todar, K. Todar`s Online Textbook of bacteriology. University of Wisconsin- Madison. Department of Bacteriology. 2002.

Wessling - Resnick, M., Iron Transport. Annual Review of Nutrition. 2000. 20: 129-151.

Yamamoto R, y Clark GT. Intra and inter flock transmission of *Haemophilus gallinarum*. American Journal of Veterinary Research. 1966. 27: 1419-1425.