



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA  
REGULADOS POR *QUORUM SENSING* EN**

***Gallibacterium anatis*”**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**MARTÍNEZ GONZÁLEZ KARLA KARINA**

**DIRECTOR:**

**DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. SERGIO VACA PACHECO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**DR. SEBASTIÁN POGGIO GHILARDUCCI  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**CUAUTILÁN, EDO. MÉX.**

**ENERO DEL 2013**



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 en la Unidad de Morfofisiología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Erasmo Negrete Abascal

Este trabajo forma parte del proyecto

de investigación:

“Identificación de los factores de virulencia en  
*Gallibacterium anatis* expresados por efecto del  
Quórum sensing”

Financiado por PAPIIT Proyecto IN216010, PAPIIT Proyecto

IG200613 Y PAPCA FESI-UNAM

(núm. 2) 2011-2012.

## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Erasmo Negrete Abascal por recibirme en su laboratorio, por su apoyo, confianza, guía, consejos e infinita paciencia.

Al Doctor Sergio Vaca por su apoyo, enseñanzas y consejos a lo largo de la carrera y la maestría.

Al Doctor Sebastián Poggio Ghilarducci por su acertada y valiosa dirección en cada uno de mis tutorales y asesorías

A los integrantes de mi comité revisor:

Dr. Víctor Rubén Tenorio

Dr. Efrén Díaz Aparicio

Dr. Francisco Aguilar Romero

Dr. Edgardo Soriano

por la disposición, amabilidad y apoyo brindado durante mi proceso de titulación, así como también por cada una de sus valiosas correcciones.

A mis excelentes profesores de la maestría por compartir un poco de su vasto conocimiento conmigo y por motivarme con su gran ejemplo: Dr. Antonio Verdugo, Dra. Inda Marcela, Dr. Francisco Javier Basurto y Dr. Antonio Morilla.

Al Biólogo Rogelio Frank Jiménez por su invaluable apoyo, guía y orientación en la parte que a Genética corresponde en esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio por los agradables momentos y todos los conocimientos que de ustedes recibí.

## DEDICATORIAS

A Dios... sin tí... esto nunca habría sido posible... te amo y todo cuanto a mi concierne desde hace mucho esta en sus manos.

A mis padres, por haber creído y confiado en mí en todo momento, por su interminable apoyo y cariño, y sus grandes ejemplos de honestidad, perseverancia, fortaleza y esfuerzo, no tengo manera de agradecerles todo cuanto han hecho por mí.

A Santa María... por que incluso hoy que no estas... tus enseñanzas, amor, paciencia y cariño permanecen.

A mi hermana... por que el solo conocerte y quererte como lo hago, hacen que la vida valga la pena.

A mis tíos y tías... por sus consejos, cariño y apoyo incondicional a lo largo de mi vida. Ser parte de esta familia y tenerlos junto a mí, es una de mis más grandes bendiciones. Les amo mucho y les amo para siempre.

A mis primos y primas por su cariño y amor... son los mejores hermanos que Dios me pudo escoger.

A Mar... por ser mi confidente, amiga, hermana y cómplice... compartir el camino contigo ha sido un privilegio y una bendición.

A mis amigos por su cariño, amistad, por permitirme ser parte de sus vidas y por hacer mi vida más linda sólo con tenerlos en ella. Tiene una plaza vitalicia en mi corazón.

A Carlos el mejor compañero, amigo y apoyo que he podido encontrar en esta jornada, por enseñarme con paciencia, bondad y amor lecciones de vida que atesoraré por siempre.

## ÍNDICE

	PÁGINA
<b>I. LABREVIATURAS</b>	<b>viii</b>
<b>II. ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>ix</b>
<b>III. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>IV. RESUMEN</b>	<b>xi</b>
<b>V. ABSTRACT</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Descripción del microorganismo	1
1.1.1 Descripción del género <i>Gallibacterium</i>	1
1.1.2 <i>Gallibacterium anatis</i>	3
1.2 Características bioquímicas de <i>G. anatis</i>	4
1.3 Distribución y hospederos	5
1.4 Patogénesis	5
1.5 Factores de virulencia	6
1.5.1 Metaloproteasas	6
1.5.2 Hemaglutinación	7
1.5.3 GtxA de <i>G. anatis</i>	7
1.5.4 Formación de Biofilm	9
1.6 <i>Quorum sensing</i>	10
1.6.1 Autoinductores	14
1.6.2 Sistema AI-1/LuxIR-	15
1.6.3 AI-2/LuxS-	17
1.6.4 AI-3/QseC	20
1.6.5 AIP/Agr-	20
1.6.6 Factores de virulencia regulados por <i>Quorum sensing</i> en <i>Pasteurellaceae</i>	22

<b>2. ANTECEDENTES</b>	23
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	25
<b>4. OBJETIVOS</b>	26
4.1. Objetivo General	26
4.2. Objetivos Particulares	26
<b>5. DIAGRAMA DE TRABAJO</b>	27
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
6.1 Cepas bacterianas	28
6.2 Medios de cultivo	
6.3 Evaluación de la formación de biofilm en presencia de sobrenadantes, catecolaminas o medio condicionado.	29
6.4 Obtención de SNs de <i>A. pleuropneumoniae</i> , <i>M. haemolytica</i> , <i>G. anatis</i> F149 <sup>T</sup> , 12656/12 y <i>Av. paragallinarum</i> .	29
6.5 Evaluación del efecto de catecolaminas (NE o E) sobre el crecimiento <i>G. anatis</i> F149 <sup>T</sup> y 12656-12.	30
6.6 Obtención de OMPs de las cepas F149 <sup>T</sup> y 12656-12 de <i>G. anatis</i> en presencia de catecolaminas	30
6.7 Electroforesis de OMPs	31
6.8 Extracción de ADN cromosómico	31
6.9 Condiciones para la amplificación del gen <i>luxS</i> de las cepas F149 <sup>T</sup> y 12656/12 de <i>G. anatis</i>	32
6.10 Secuenciación y análisis <i>in silico</i>	33

<b>7. RESULTADOS</b>	
7.1 Evaluación de la formación de biofilm por <i>G. anatis</i>	34
7.2 Evaluación del crecimiento de <i>G. anatis</i> F149 <sup>T</sup> en presencia de SNs	36
7.3 Evaluación de la formación de biofilm por <i>G. anatis</i> F149 <sup>T</sup> y 12656/12 en presencia de catecolaminas	37
7.4 Cinética de crecimiento de <i>G. anatis</i> F149 <sup>T</sup> y 12656/12 en presencia de NE o E.	39
7.5 Evaluación de la formación de biofilm por <i>G. anatis</i> en presencia de DMEM.	41
7.6 Evaluación de la formación de biofilm por <i>G. anatis</i> F149 <sup>T</sup> a diferentes tiempos (12, 24, 36 y 48 h)	43
7.7 Patrón de OMPs de <i>G. Anatis</i> F149 <sup>T</sup> Y 12656/12 en presencia de E y NE	45
7.8 Extracción de ADN genómico de las cepas F149 <sup>T</sup> y 12656/12 de <i>G. anatis</i> .	48
7.9 Amplificación del gen <i>luxS</i> de las cepas F149 <sup>T</sup> y 12656/12 de <i>G. anatis</i> .	49
7.10 Secuenciación y análisis <i>in silico</i>	50
<b>8. DISCUSIÓN</b>	54
<b>9. CONCLUSIONES</b>	62
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	63
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	64



---

## ABREVIATURAS

---

Agr	Gen regulador accesorio
AHL	Acyl homoserín lactona
AIP	Péptidos auto inductores
DMEM	Medio de Dulbecco Modificado de Eagle (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
E	Epinefrina
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
MC	Medio condicionado
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7; línea celular aislada a partir de un caso de Cáncer de Mama.
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NE	Norepinefrina
ONPG	Orto-nitrofenilgalactopiranosido
PNPG	P-nitrofenil alfa-D-glucopiranosida
QS	Quorum Sensing
VT	Volumen Total

---

## II. ÍNDICE DE TABLAS

---

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
1	Especies bacterianas del género <i>Gallibacterium</i>	2
2	Características bioquímicas que diferencian a los miembros del género <i>Gallibacterium</i>	4
3	Ejemplos de especialización celular y comportamiento cooperativo en bacterias.	11
4	Factores de virulencia regulados por QS en Gram-negativas	13
5	Cepas empleadas	28
6	Iniciadores empleados en este estudio	32
7	Secuencias de genes <i>luxS</i> que producen alineamientos significativos con la secuencia del gen <i>luxS</i> de la cepa F149 <sup>T</sup> de <i>G. anatis</i>	51
8	Secuencias de genes <i>luxS</i> que producen alineamientos significativos con la secuencia del gen <i>luxS</i> de la cepa 12656/12 de <i>G. anatis</i>	52

---

### III. ÍNDICE DE FIGURAS

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
1	<i>G. anatis</i>	3
2	Organización y ubicación en el genoma de la <i>gtxA</i> de <i>G. anatis</i>	4
3	Organización y ubicación en el genoma de la <i>gtxA</i>	8
4	Etapas de la formación del biofilm bacteriano	9
5	Modelos de QS bacteriano	12
6	Sistema de AI-1/LuxIR- de QS en Gram-negativas	15
7	Características generales de la estructura biosintética de las AHLs	16
8	Interconversiones químicas de moléculas en relación al ciclo del metilo activado y la generación del AI-2.	18
9	Moléculas señalizadoras del AI-2 y sus receptores	19
10	Modelo de QS mediado por AIPs en bacterias Gram-positivas	21
11	Evaluación de la formación de biofilm por <i>G. anatis</i> F149T en presencia de 10% de SN de diferentes miembros de la familia <i>Pasteurellaceae</i>	34
12	Evaluación de la formación de biofilm por <i>G. anatis</i> F149 <sup>T</sup> en presencia de 50% de SNs de diferentes miembros de la familia <i>Pasteurellaceae</i>	35
13	Efecto de la adición de SN de diferentes miembros de la familia <i>Pasteurellaceae</i> en el crecimiento de <i>G. anatis</i> F149 <sup>T</sup>	36
14	Evaluación de la formación de biofilm por <i>G. anatis</i> 12656/12 en presencia de NE o E (50 µM)	37
15	Efecto de las catecolaminas en el crecimiento de 12656/12	38

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
16	Efecto de las catecolaminas en el crecimiento de <i>G. anatis</i> F149 <sup>T</sup>	39
17	Evaluación de la Formación de Biofilm por <i>G. anatis</i> 12656/12 en presencia de MC	40
18	Evaluación de la Formación de Biofilm por <i>G. anatis</i> 12656/12 en presencia de MC	41
19	Evaluación de la Formación de Biofilm por <i>G. anatis</i> F149 <sup>T</sup> en presencia de MC	42
20	Evaluación de la formación de biofilm por <i>G. anatis</i> F149 <sup>T</sup> a diferentes tiempos en presencia y ausencia de SNs (50%), 50 μM de NE, E o MC DMEM (50%)	43
21	Evaluación de la formación de biofilm por <i>G. anatis</i> 12656/12 a diferentes tiempos en presencia y ausencia de SNs (50%), 50 μM de NE, E o MC DMEM (50%)	44
22	Perfil de OMPs de <i>G. anatis</i> en presencia o ausencia de E	45
23	Perfil de OMPs de <i>G. anatis</i> en presencia o ausencia de NE	46
24	DNA genómico de <i>G. anatis</i>	48
25	Probables genes <i>luxS</i> amplificados a partir de DNA genómico de <i>G. anatis</i>	
26	Secuencias nucleotídicas del gen <i>luxS</i>	49
27	Secuencias obtenidas de la traducción <i>in silico</i> de las secuencias nucleotídicas de <i>G. anatis</i>	50
28	Alineamiento de la secuencia de aa. del gen <i>luxS</i> de <i>G. anatis</i> F149 <sup>T</sup> con <i>G. anatis</i> UMN179	52
29	Alineamiento de la secuencia de aa. del gen <i>luxS</i> de <i>G. anatis</i> 12656/12 con <i>G. anatis</i> UMN179	53

## RESUMEN

*Gallibacterium anatis* es un microorganismo asociado a enfermedades de vías respiratorias y del aparato reproductor de diversas aves, incluidas las gallinas. Este microorganismo puede ser hemolítico o nó y recientemente fue descrita su capacidad para formar biofilm. La formación de biofilms es una estrategia que diversos microorganismos emplean como una forma de supervivencia, éstos les confieren resistencia a efectos ambientales adversos y se encuentran mediados por quórum sensing, proceso en el que un microorganismo responde a moléculas propias de respuesta llamadas autoinductoras (AI). En este trabajo se evaluó el efecto de sobrenadantes (SNs), medio condicionado (MC) Epinefrina (E) y Norepinefrina (NE) (estas últimas dos moléculas producidas por mamíferos y que pueden funcionar como AI); sobre la formación de biofilm, crecimiento y expresión de proteínas de membrana externa en dos cepas de *G. anatis*; 12656/12 (variedad hemolítica) y F149<sup>T</sup> (variedad no hemolítica). La adición de SNs y MC generó una disminución en la formación de biofilm así como en el crecimiento, posiblemente debida a la presencia de sustancias tóxicas o metabolitos secundarios en dicho medios. La adición de E y NE incrementó el crecimiento de *G. anatis* variedad hemolítica; pero no en la variedad no hemolítica, con respecto a cultivos a los que no se les agregó ninguna de estas moléculas. En ambas variedades de *G. anatis* se incrementó la formación de biofilm, la adición de NE o de E indujo la expresión de 3 proteínas de aproximadamente 49, 55 y 70 kDa y la sobre expresión de una proteína de 51 kDa, en la variedad hemolítica; mientras que en la cepa no hemolítica, se sobre expresaron proteínas de 55, 67, 70 y 150 kDa. La expresión de dos proteínas de 200 y 250 kDa fue reprimida en presencia de NE, pero no de E en la variedad no hemolítica. La presencia de un gen *luxS* fue determinada en el genoma de ambas cepas de *G.anatis*. Dicho gen es el responsable de la síntesis de un AI. La amplificación por PCR de *luxS*, a partir del DNA genómico de *G. anatis*, originó un producto de 863 pb para la cepa F149<sup>T</sup> y de 758pb para la cepa 12656/12, los cuales al ser secuenciados y analizados por Blast presentaron una similitud del 96% con el gen que codifica para la proteína S-ribosylhomocisteínasa localizada en el genoma de *G. anatis* UMN179 (Acceso CP002667.1), indicando con esto que *G. anatis* es capaz de producir un AI y que probablemente éste probablemente participa en la regulación de la formación de biofilm, crecimiento y la expresión de factores de virulencia.

## ABSTRACT

*Gallibacterium anatis* is a microorganism associated with respiratory and reproductive diseases in birds, including chickens. This microorganism has the ability to form biofilm, a common survival strategy used by various microorganisms to obtain resistance to adverse environmental effects. Its formation is mediated by quorum sensing (process in which a microorganism respond to self-produced molecules called auto-inducers (AI)). The present investigation was done to assess the effect of supernatants (SNs), conditioned media (CM) Epinephrine (E) and norepinephrine (NE) on the capability of biofilm formation, to growth and differential expression of outer membrane proteins of *G. anatis*. Strains 12656/12 (hemolytic) and F149T (non-hemolytic). The addition of SNs and MC to *G. anatis* cultures, reduced the biofilm formation and the bacterial growing of both *G. anatis* strains. However, the addition of E and NE increased the biofilm formation by both *G. anatis* strains, but favored the growing of just the *G. anatis* hemolytic strain, in comparison with cultures where E or NE were not added. The expression of three outer membrane proteins of 49, 55 and 70 kDa and the over-expression of a 51 kDa protein were observed by the addition of E into cultures of the hemolytic strain, whereas the addition of E induced the expression of proteins of 55, 67, 70 and 150 kDa in the non-hemolytic strain. The expression of 200 and 250 kDa proteins was repressed by the presence of NE but not by E in the non-hemolytic strain. The presence of a *luxS* gene was detected in the genome of both *G. anatis* strains. PCR amplification products of putative *luxS* genes was obtained from genomic DNA of both *G. anatis* strains, a product of 863 bp for the F149T strain and of 758pb for 12656/12 strain, respectively. Blast analysis of the sequences indicated a 96% of identity with the gene encoding the protein S-ribosylhomocisteínasa from the genome of *G. anatis* UMN179 (CP002667.1 Access), indicating that 12656/12 and F149T *G. anatis* strains possess the genomic tools for produce an AI which could probably participates in the regulation of the biofilm formation, growing and the regulation of virulence factors expression.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 DESCRIPCIÓN DEL MICROORGANISMO

#### 1.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Dominio: *Procaryotae*

Reino: *Eubacteria*

División: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Pasteurellales*

Familia: *Pasteurellaceae*

Género: *Gallibacterium*

Especie: *Gallibacterium anatis*

#### 1.1.2 DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *Gallibacterium*

El género *Gallibacterium*, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*, surge a partir de la reclasificación taxonómica de un complejo de organismos aislados a partir de aves enfermas, dentro de los cuales se encontraban *Actinobacillus salpingitidis*, *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella anatis*, quienes tras múltiples estudios, fueron agrupados dentro del nuevo género *Gallibacterium* (Christensen *et. al.*, 2003).

El género reúne a 7 especies bacterianas (Tabla 1) que tienen como características generales ser Gram-negativas, presentar morfología bacilar o pleomórfica, y formar colonias circulares de color grisáceo, semitransparentes en la periferia, pueden presentar o no  $\beta$ -hemólisis al ser cultivadas en agar suplementado con sangre de bovino, dependiendo de la cepa.

Las colonias miden de 1.0-2.0 mm de diámetro luego de 24-48 h de crecimiento a 37° C. No forman endoesporas, su crecimiento es mesofílico, microaerófilico o anaeróbico facultativo.

Tabla 1. Especies bacterianas del género *Gallibacterium*

Género <i>Gallibacterium</i>
------------------------------

*Gallibacterium anatis*

*Gallibacterium genomospecies 1*

*Gallibacterium genomospecies 2*

*Gallibacterium genomospecies 3*

*Gallibacterium melopsittaci*

*Gallibacterium salpingitidis*

*Gallibacterium trehalosifermentans*

Adecuada a partir de los reportes de (Kristensen *et al.*, 2011; Bisgaard *et al.*, 2009; Christensen *et al.*, 2003).

En cuanto a sus características bioquímicas son catalasa-, oxidasa- y fosfatasa- positivas. Reductoras de nitratos. Forman ácido sin la presencia de gas a partir de glicerol, (-)D-ribosa, (+)D-xilosa, (-)D-manitol, (-)D-fructuosa, (+)D-galactosa, (+)D-glucosa, (+)D-manosa, sacarosa y rafinosa. Son positivas para las pruebas de ONPG y PNPG; y negativas para arginina deshidrolasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, fenilalanina deaminasa, indol y gelatinasa.

No forman pigmentos ni tampoco ácido a partir de *m*-erytritol, adonitol, (+)D-arabitol, xilitol, (-)L-xilosa, dulcitol, (+)D-fucosa, (+)L-ramnosa, (-)L-sorbosa, celobiosa, (+)D-melibiosa, (+)D-melecitosa, (+)D-gliconeno, inulina, esculina, amigdalina, arbutina, gentiobiosa, salicina, (+)D-turanosa o  $\beta$ -*N*-CH<sub>3</sub>-glucosamida (Christensen *et al.*, 2003).

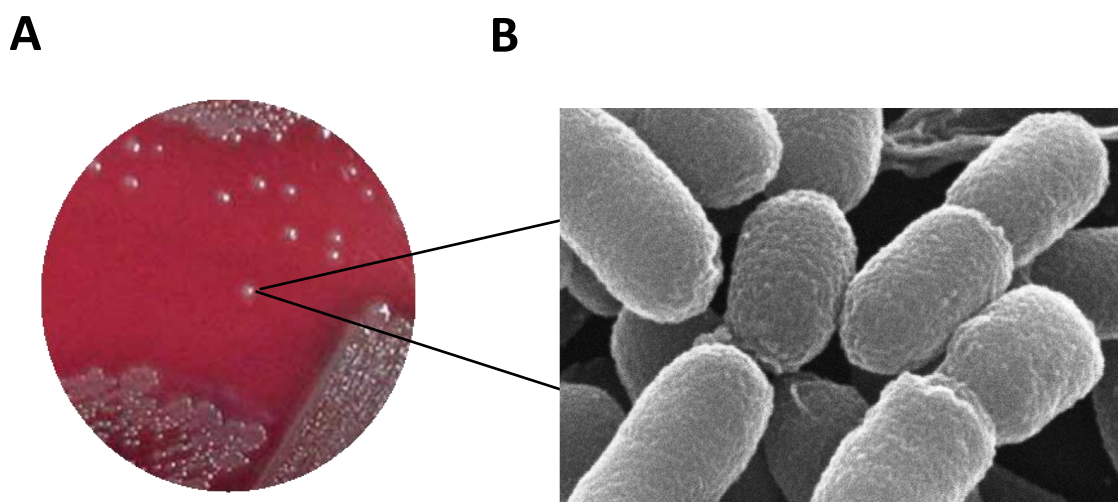


### 1.1.3 *Gallibacterium anatis*

*G. anatis* cuyo nombre proviene del latín (*gallus*: gallo y *bacterium*: barra o vara) *anatis* (pato) es una bacteria Gram negativa, pleomórfica o de morfología bacilar, no esporulada, encapsulada, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*. Su crecimiento es mesofílico y anaeróbico facultativo o microaerofílico.

A diferencia de otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*, *G. anatis* no requiere del factor V (NAD); ni del factor X (Hemina) para su crecimiento (Christensen *et al.*, 2003).

En agar sangre forma colonias circulares de color grisáceo y semitransparentes en la periferia, que miden de 1 a 2 mm de diámetro después de 24 a 48 horas de incubación a 37°C (Fig. 1) y puede causar o no hemólisis dependiendo de la cepa.



**Fig. 1. *G. anatis*** A) Crecimiento en placas de agar sangre tras 12 horas de incubación a 37° C en condiciones de microaerobiosis. B) Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cepa F149<sup>T</sup> de *G. anatis* (Sánchez-Espinosa, 2010).

## 1.2 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE *G. anatis*

Algunas de las diferencias bioquímicas que distinguen a *G. anatis* de otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* son: Catalasa, oxidasa y fosfatasa positivo, reducción de nitrato entre otras (Tabla 2).

Tabla 2. Características bioquímicas que diferencian a los miembros del género *Gallibacterium*

Característica	<i>G. anatis</i> <i>bv. Haemolytica</i>	<i>G. anatis</i> <i>bv. Anatis</i>	<i>Gallibacterium</i> <i>genomoespecies 1</i>	<i>Gallibacterium</i> <i>Genomoespecies 2</i>
Hemólisis	+	-	+	+
Producción de ácido a partir de :				
(-) D-Arabinosa	++	-	++	D
(+) L-Arabinosa	-	-	D	D
m-Inositol	D	D	-	D
(-) D-Sorbitol	D	D	-	-
(-) L-Fucosa	++	-	+ / ++	D
Maltosa	D	-	+	+
Trehalosa	D	+	+	D
Dextrina	D	-	+ / ++	+

Características fenotípicas diacríticas del género *Gallibacterium*. Biovar (bv) haemolytica representa los biovares 1, 4, 11, 12, 15, 17-20, 22 y 24 del complejo (*P. haemolytica*)-*A. salpingitidis*. Genomoespecies 1 representa los biovares 5 y Genomoespecies 2 representa los biovares 8 y 9. Las características fueron evaluadas con: **(+)** ≥ 90% de las cepas son positivas en 1-2 días; **(++)** ≥ 90% de las cepas son positivas en 3-14 días; **(-)** <10% de las cepas son positivas en 14 días; **(D)** 11-89% de las cepas dio positivo (Christensen *et al.*, 2003).

### 1.3 DISTRIBUCIÓN Y HOSPEDEROS

*G. anatis* puede ser considerado como un agente patógeno cosmopolita ya que aislados de este microorganismo en casos clínicos de aves infectadas han sido reportados en numerosos países alrededor del mundo abarcando los continentes europeo (Bisgaard, 1977; Mráz *et al.*, 1976, Mirle *et al.*, 1991), africano (Addo & Mohan, 1984), asiático (Suzuki *et al.*, 1996) y americano (Shaw *et al.*, 1990), siendo en países como Noruega, Estados Unidos, Suiza, Dinamarca, Canadá y México en donde se han realizado más estudios. En México la mayor parte de los reportes clínicos han sido realizados en los estados de Puebla, Nuevo León, Yucatán y Jalisco, aunque también se han reportado casos en otros estados de la República (<http://www.gallibacterium-anatis.com.mx>).

A pesar de que se ha sugerido que las gallinas son el principal hospedero de *G. anatis*, este microorganismo parece encontrarse en un amplio espectro de hospederos, siendo aislado de aves domésticas y no domésticas como pavos, patos, gansos, faisanes, perdices, garcetas, entre otros (Bisgaard, 1993; Mushin *et al.*, 1980).

### 1.4 PATOGÉNESIS

Este microorganismo forma parte de la flora normal del tracto respiratorio superior y del tracto reproductor inferior de los pollos, aunque también ha sido considerado como patógeno oportunista. *G. anatis* ha sido asociado a varias lesiones que incluyen salpingitis con o sin peritonitis, ooforitis, enteritis, septicemia, pericarditis, hepatitis y lesiones en el tracto respiratorio de gallinas de postura (Christensen *et al.*, 2003).

Además de esto, es responsable de originar una disminución en la producción de huevo debido a las afecciones que produce tanto en las gallinas de postura comercial como en las reproductoras; ocasionando considerables lesiones en el aparato reproductor tales como; atrofia de ovario con hemorragias y regresión del mismo, ruptura y deformación de folículos ováricos, oviducto no funcional con hemorragias y postura abdominal, peritonitis y nefromegalia entre otros (Christensen *et al.*, 2003).

## 1.5 FACTORES DE VIRULENCIA

Entre los factores de virulencia descritos para *G. anatis* se encuentran: la secreción de metaloproteasas degradadoras de inmunoglobulinas isotipo G (IgG) (García-Gómez *et al.*, 2005), la capacidad de hemaglutinar glóbulos rojos de conejo (Zepeda *et al.*, 2009), la secreción de la proteína GtxA (*Gallibacterium toxin*), una toxina de tipo RTX (*Repeats in toxin*) (Kristensen *et al.*, 2009) presente en este microorganismo, la formación de biofilm (Vaca *et al.*, 2011), así como también la expresión de fimbrias (Salgado Lucio *et al.*, 2012) y flagelo (Montes-García, 2012).

### 1.5.1 METALOPROTEASAS

Las proteasas son enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis de los enlaces peptídicos de péptidos y proteínas; comprenden una extensa clasificación que abarca las serin proteasas, cisteín proteasas, aspartato proteasas y metaloproteasas. Muchas metaloproteasas identificadas en microorganismos patógenos son extracelulares, requieren zinc y se ha demostrado que juegan un papel importante en la virulencia (Häse & Finkelstein, 1993; Miyoshi & Shinoda, 2000).

En *G. anatis* ha sido descrita la secreción de metaloproteasas, proteínas de una masa molecular superior a los 100 kDa, que presentan actividad proteolítica en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con caseína bovina (García-Gómez *et al.*, 2005).

Las metaloproteasas de *G. anatis* son activas en pH alcalino e inhibidas en presencia de 0 EDTA, su actividad es estable a 50° C, muestran una inhibición parcial a 60° C y una inhibición total a temperaturas superiores. Estas son capaces de degradar IgG de pollo luego de 24 h de incubación y muestran reactividad cruzada con anticuerpos policlonales contra la proteasa de *A. pleuropneumoniae* (García Gómez *et al.*, 2005).

### 1.5.2 HEMAGLUTINACIÓN

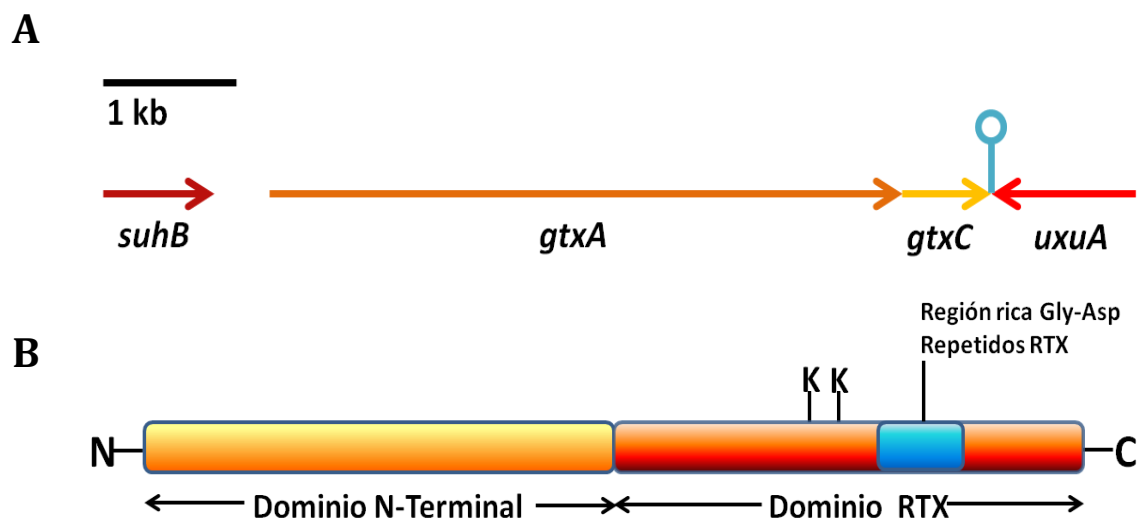
Estudios previos realizados con cepas de referencia y aislados de campo de *G. anatis* provenientes de México y Dinamarca, en presencia de eritrocitos de aves ( gallo, gallina, pavo, codorniz, paloma, halcón y gorrión) y mamíferos (vaca, borrego, caballo, cerdo, perro, conejo y humano), mostraron que un pequeño grupo de cepas de *G. anatis* son capaces de aglutinar eritrocitos de pollo, gallina, codorniz, conejo y cerdo; mientras que la totalidad de las cepas presentan la capacidad de aglutinar eritrocitos de conejo. Sin embargo los mecanismos y estructuras mediadores de la hemaglutinación permanecen desconocidos (Zepeda *et. al.*, 2009).

### 1.5.3 GtxA DE *G. anatis*

La GtxA (*Gallibacterium* toxin A “analogy”) reportada para *G. anatis* pertenece a la familia de toxinas RTX, éstas son producidas por una gran cantidad de bacterias Gram-negativas y han sido consideradas como importantes factores de virulencia ya que la cepas carentes de genes que las codifican han mostrado una virulencia reducida (Tatum *et.al.*, 1998; Jansen *et.al.*, 1995; Tascon *et.al.*, 1994).

Comparten ciertas características comunes; son proteínas secretadas (>100 kDa), presentan secuencias de repetidos ricos en glicina y aspartato (generalmente nonapéptidos) localizados en la región carboxilo terminal formando numerosos sitios de unión a iones de Ca<sup>+</sup> los cuales son el origen del nombre de la familia, su modo único de secreción vía sistema de secreción tipo 1, y el requerimiento de la adición post-traslacional de grupos acilo para su funcionamiento (Frey & Kuhnert, 2002).

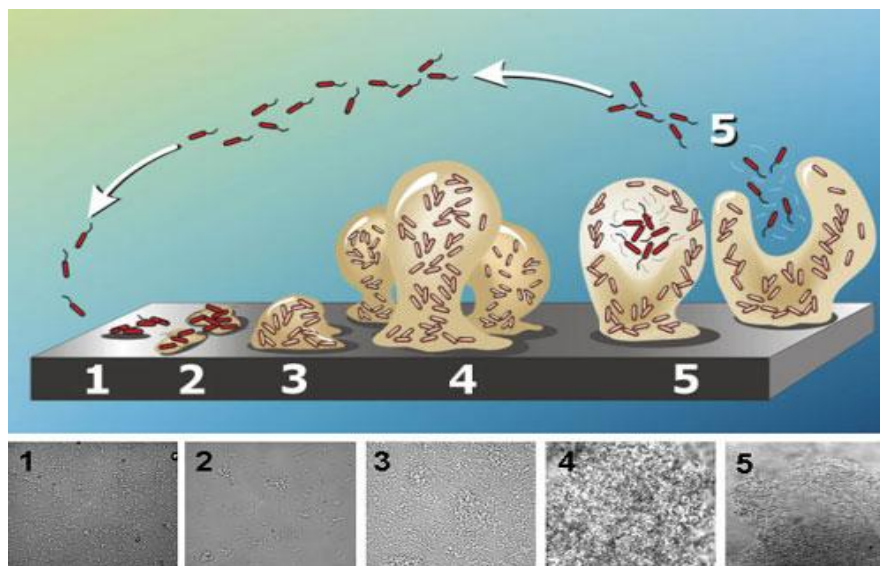
GtxA es un nuevo tipo de RTX y es responsable por la actividad leucotóxica y hemolítica de *G. anatis*; su región C-terminal comparte cierta homología en secuencias con toxinas RTX identificadas para varios miembros de la familia *Pasteurellaceae* así como también con la  $\alpha$ -hemolisina HlyA de *Escherichia coli*, sin embargo, se diferencia de estas toxinas formadoras de poros debido a que posee un dominio N-terminal formado por 950 aminoácidos que no presentan el resto de las toxinas (Fig. 2). Presumiblemente GtxA emplea un mecanismo de acción semejante a CyaA de *Bordetella pertussis*, donde el dominio RTX-hemolisina (ubicado en el extremo C-terminal) es responsable de la unión a la células blanco y de la posterior translocación del dominio N-terminal solo o de la toxina completa al citoplasma de la célula (Kristensen *et al.*, 2010). Además se ha demostrado que en bacterias de *E. coli* donde se expresa además de *gtxA*; *gtxC* (codifica acyltransferasa), la bacteria adquiere actividad citolítica.



**Fig. 2. Organización y ubicación en el genoma de la *gtxA* de *G. anatis*** A) Ubicación de *gtxA* y los genes que la flanquean en el genoma de *G. anatis* 12656/12. Las flechas indican los marcos de lectura abierta. B) Organización de GtxA. K indica los residuos conservados de lisina (Lys 1484 y 1607). Se muestra la región rica en glicina y aspartato (posición 1640-1830) ( Kristensen *et al.*, 2010).

#### 1.5.4 FORMACIÓN DE BIOFILM

Un biofilm es una agregación de organismos (bacterias, algas, hongos y/o protozoarios) (Fig. 3), asociados a una superficie viva o inerte, los cuales se encuentran inmersos en una matriz autoproducida (Costerton *et al.*, 1999). En biofilms bacterianos dicha matriz está formada principalmente por agua, células bacterianas, exopolisacárido, sustancias poliméricas, ácidos nucleicos y proteínas, así como también sales minerales, partículas y sedimento proveniente de células bacterianas lisadas y productos de metabolismo en menor cantidad (Dickschat, 2010). Recientemente se reportó la capacidad de algunas cepas de *G. anatis* (cepas F149<sup>T</sup>, 12158/5, CCM 5974 y *G. genomoespecies* 1) de formar biofilms en poliestireno y vidrio, su adhesión fue inhibida al tratar las células bacterianas con tripsina, sugiriendo la participación de proteínas en el proceso. Mediante microscopía electrónica pudo observarse material extracelular, micro-vesículas y estructuras filamentosas, formando parte de la matriz del biofilm (Vaca *et al.*, 2011; Sánchez-Espinosa, 2010).



**Fig. 3. Etapas de la formación del biofilm bacteriano.** Los números muestran las diferentes etapas de formación 1) Adhesión inicial y reversible 2) Adhesión irreversible y producción de matriz exopolimérica (EPS) 3) Desarrollo temprano de la arquitectura del biofilm 4) Maduración de la arquitectura 5) Dispersión de células individuales o planctónicas a partir del biofilm al medio exterior para colonizar otras superficies (Costerton *et al.*, 1995).

## 1.6 QUORUM SENSING

El término *Quorum Sensing* o detección de quórum fue acuñado por primera vez en 1994 por los investigadores Fuqua, Winans y Greenberg para describir de forma más particular el fenómeno anteriormente descrito como “autoinducción” (Fuqua *et al.*, 1994).

El QS fue originalmente descrito en la bacteria marina y bioluminiscente *Vibrio fischeri*, en la cual funciona como un mecanismo de control de la producción de luz, así como de otros rasgos (Antunes *et al.*, 2007). Por años, se pensó que este fenómeno se limitaba exclusivamente a unos pocos organismos marinos, pero hoy día es ampliamente reconocido que una gran cantidad de especies bacterianas lo utilizan como un sistema de regulación genética (Antunes & Ferreira, 2009).

El QS un mecanismo de comunicación bacteriana (comunicación célula-célula entre bacterias), que le permite a las células que comprenden una comunidad bacteriana coordinar la expresión de sus genes en una manera dependiente de densidad celular, comportándose como eucariotas (Tabla 3).

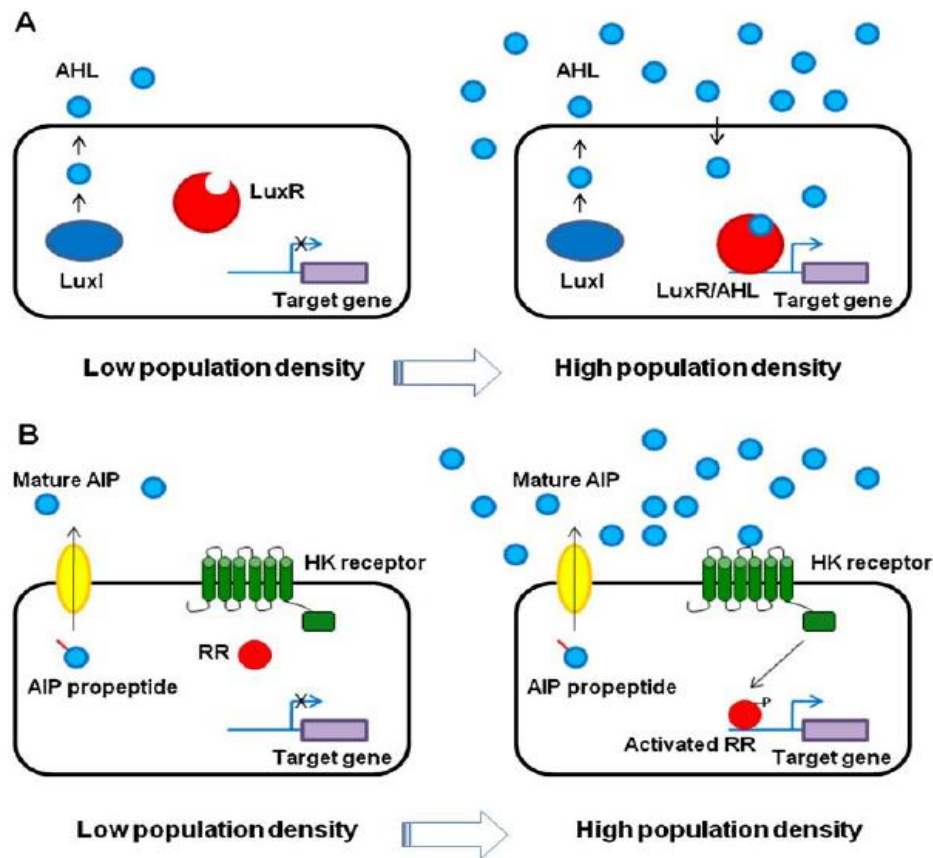
Este es mediado por pequeñas moléculas señalizadoras y difusibles, denominadas autoinductores (AIs), las cuales son sintetizadas intracelularmente durante el crecimiento de la bacteria y posteriormente liberadas en el medio circundante (Fig. 4).

Mientras el número de células dentro de la colonia bacteriana aumenta, también lo hace la concentración extracelular del AI; una vez que este ha alcanzado el umbral de concentración (punto en el que se considera que entre la población “hay quórum”), se presenta una unión estable del AI a sus receptores afines dentro de la célula bacteriana, activando así una cascada de transducción de señales que resulta en cambios en la expresión génica de toda la población (Galloway *et al.*, 2011).



Tabla 3. Ejemplos de comportamiento cooperativo en organismos superiores y su homología en el mundo microbiano. Las actividades han sido clasificadas asimilándolas a los términos utilizados en ecología y etología para organismos superiores (Crespi, 2001).

ACTIVIDAD COOPERATIVA EN ORGANISMOS SUPERIORES	HOMOLOGÍA EN EL MUNDO MICROBIANO
Creación de refugios	Biofilm
Caza o ataque Cooperativo	Mixobacterias <i>Pfiesteria</i> Algunos patógenos ( <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> )
Suministro de alimento	<i>Rhizobium</i> Heterocistes en Cianobacterias
Especialización en defensa	Células periféricas en mixobacterias <i>E. coli</i> : productoras de colicina Crecimiento en "ondas de mar" (swarming) Cuerpos fructíferos de mixobacterias
Especialización para la dispersión	Cuerpos fructíferos de la ameba <i>Dictyostelium discoideum</i>
Suicidio altruista (autolisis)	<i>E. coli</i> Mixobacterias
Comunicación química cooperativa	<i>Quorum sensing</i>



**Fig 4. Modelos de QS bacteriano.** Mediados en A) Gram negativas por AHL y B) Gram positivas dependiente de AIP.

Aun cuando por mucho tiempo se pensó que su principal función era la regulación de la producción de factores de virulencia en las bacterias (Gospodarek *et al.*, 2009), se ha demostrado que el QS no solamente controla genes involucrados en la patogénesis, incluyendo la producción de flagelo, motilidad y la expresión de toxinas, sino también aquellos involucrados en el metabolismo bacteriano (Tabla 4), reparación del DNA, biosíntesis de nucleótidos y proteínas, crecimiento y división celular (Sperandio *et al.*, 2001), entre otros.

Tabla 4. Factores de virulencia regulados por QS en Gram-negativas (Vendeville *et al.*, 2005).

BACTERIA	FENOTIPO
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Expresión de <i>afuA</i> e incremento en la producción de la leucotoxina
<i>Borellia burgdorferi</i>	Modulación del proteoma
<i>Campylobacter jejuni</i>	Motilidad reducida Disminución de la aglutinación
<i>Escherichia coli</i> entero-Hemorrágica (EHEC)	Regulación positiva de los operones <i>lee</i> Expresión de 404 genes alterados Aumenta la velocidad de división celular Motilidad reducida Activación de <i>qseA</i> Regulación negativa <i>qseBC</i> Regulación negativa del SST3
<i>E. coli</i> Entero- patogénica (EPEC)	Regulación positiva de los operones <i>lee</i> Reducción en la secreción de proteínas Regulación negativa del SST3 Adhesión a células HeLa Reducción en la motilidad
<i>Helicobacter pylori</i>	Aumento en la formación de biofilm Reducción en la expresión de <i>flaA</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	Atenuación de receptores para sideróforos Aumento en transcripción Aumento MetE y MetF
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Reducción en la expresión de TonB Aumento en la producción de la proteína captadora de hemina Reducción de <i>Rgp</i> y <i>Kgp</i> , proteasas y hemaglutinina

### 1.6.1 AUTOINDUCTORES AIs

Los AIs también llamados *quormonas* son moléculas señalizadoras secretadas al medio, cuya concentración aumenta de forma proporcional a la densidad celular, generando una respuesta concertada de la población (Otero *et al.*, 2005). Estas moléculas se definen por una serie de criterios:

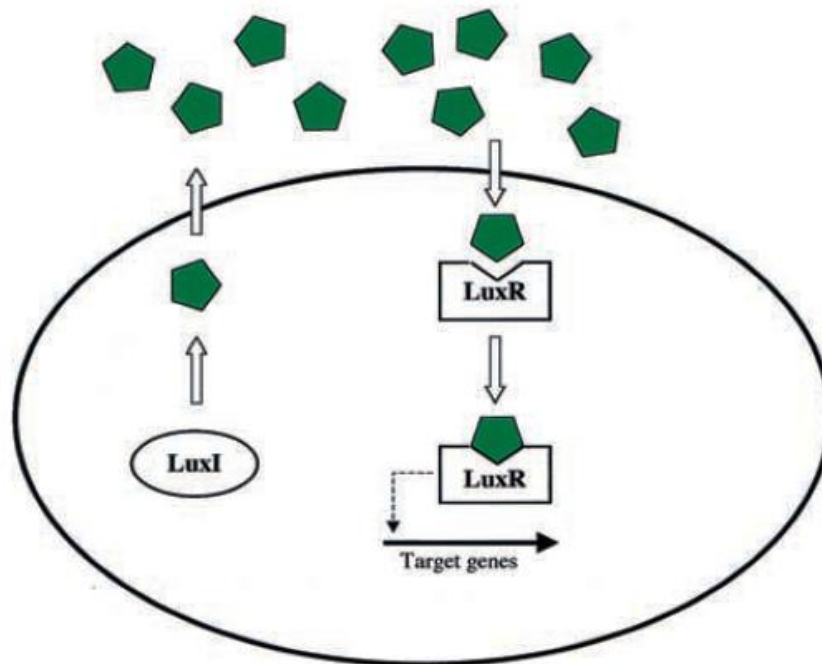
1. Su producción debe tener lugar: durante fases de crecimiento específico, en ciertas condiciones fisiológicas o en respuesta a cambios en el ambiente.
2. Deben ser acumuladas extracelularmente y ser reconocidas por un receptor específico.
3. Su acumulación debe inducir una respuesta concertada, una vez alcanzada la concentración umbral.
4. La respuesta celular debe ser distinta de los cambios fisiológicos necesarios para metabolizar o detoxificar el AIs (Winzer *et al.*, 2002).

Un gran número de AIs han sido identificados, los cuales pueden agruparse básicamente en cuatro sistemas de regulación global QS que coordinadamente controlan la expresión de determinados genes. Los sistemas AI-1/LuxIR- y AI-3/QsC que emplean los AIs 1 y 3 respectivamente, presentes únicamente en Gram-negativas, el sistema AIP-base Agr- presente en las Gram-positivas, el cual está basado en polipéptidos auto-inductores (AIP). Y finalmente el cuarto sistema de comunicación, AI-2/LuxS-, común para ambas Gram-positivas y negativas, el cual emplea el AI-2 (Gospodarek, *et al.*, 2009).

En general los diferentes AIs funcionan de una forma muy similar, estos son producidos por la célula bacteriana acumulándose progresivamente en el medio de crecimiento, cuando la densidad celular es alta, el autoinductor alcanza una alta concentración, es capaz de interactuar con activadores transcripcionales, promoviendo la expresión de un grupo de genes para regular una gran variedad de respuestas (Parsek and Greenberg, 2000).

### 1.6.1.1 SISTEMA AI-1/LuxIR-

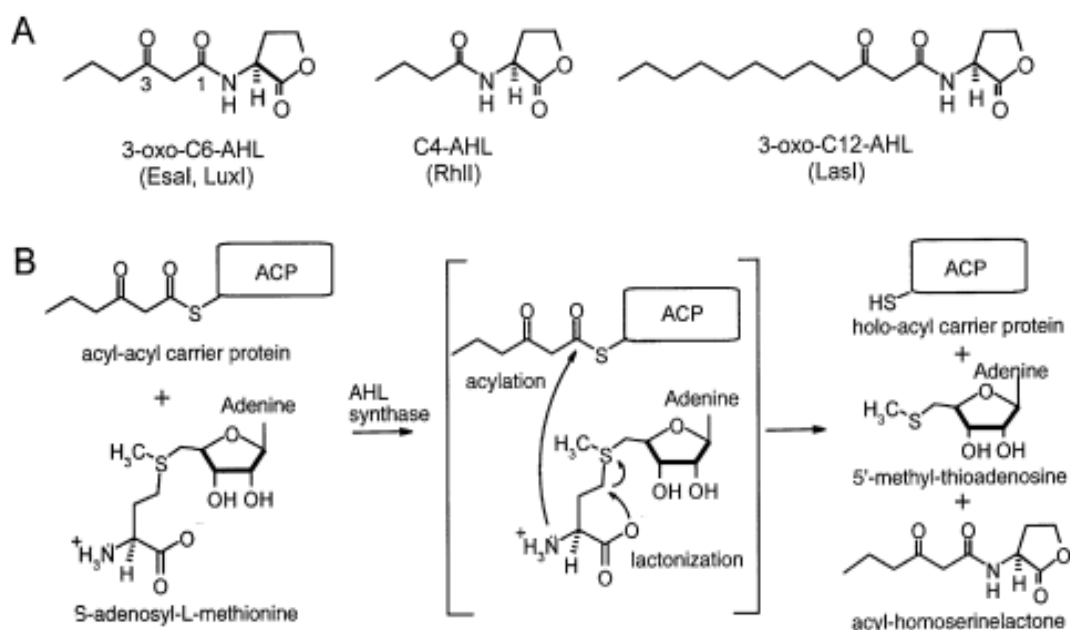
El sistema AI-1/LuxIR mediado por Acil-L-homoserín-lactonas, fue el primer sistema de QS descrito en su totalidad y sigue siendo el mejor caracterizado, lo que lo ha convertido en el paradigma de los sistemas descubiertos posteriormente en bacterias Gram-negativas. Fue descrito por primera vez a principios de la década de los 80s en la bacteria marina *Vibrio fischeri*, lográndose la identificación de la molécula responsable de la bioluminiscencia producida por este microorganismo, el AI-1. El sistema AI-1/LuxIR-, incluye a *LuxI*, productor de la *N*-acyl homoserin lactona (AHL) llamada también AI-1; y a *LuxR*, un factor de transcripción responsable del control de la expresión génica en presencia del AI (Gospodarek *et al.*, 2009) (Fig. 5).



**Fig 5. Sistema de AI-1/LuxIR- de QS en Gram-negativas.** Dos proteínas se encuentran controlando este sistema LuxI (sintasa del AI) y LuxR (proteína de unión de AI afines). Los pentágonos verdes representan el AI-1 en sus diferentes etapas (producción, secreción, reconocimiento y unión a la proteína LuxR) (Schauder and Bassler, 2001).

El descubrimiento de sistemas homólogos a LuxI/LuxR a principios de los 90s, en otras 3 bacterias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia carotovora* y *Agrobacterium tumefaciens*, en las que el sistema de autoinducción controlaba procesos tan distintos de la bioluminiscencia como la producción de la enzima elastasa, la producción de antibióticos y la transferencia conjugativa de plásmidos, constituyó el inicio de una larga lista de descubrimientos de sistemas mediados por AHLs (Otero *et al.*, 2005).

LuxI y sus homólogos producen el AI mediante la transferencia de una cadena de ácidos grasos de la proteína transportadora de acilos (ACP) a la S-adenosylmetionina (SAM), liberando AHL y metiltioadenosina (Schaefer *et al.*, 1996) (Fig.6).



**Fig 6. Características generales de la ruta biosintética de las AHLs.** ACP= proteína portadora de la cadena de ácido graso. La SAM y la acil-ACP se unen a la AHL sintasa (enzima tipo LuxI), tras lo cual ocurre una reacción de acilación y posterior lactonización. La AHL (en este caso OHL) es posteriormente liberada junto con los subproductos de la reacción holo-ACP y 5'-metiltioadenosina (Watson *et al.*, 2002).

### AI-2/LuxS-

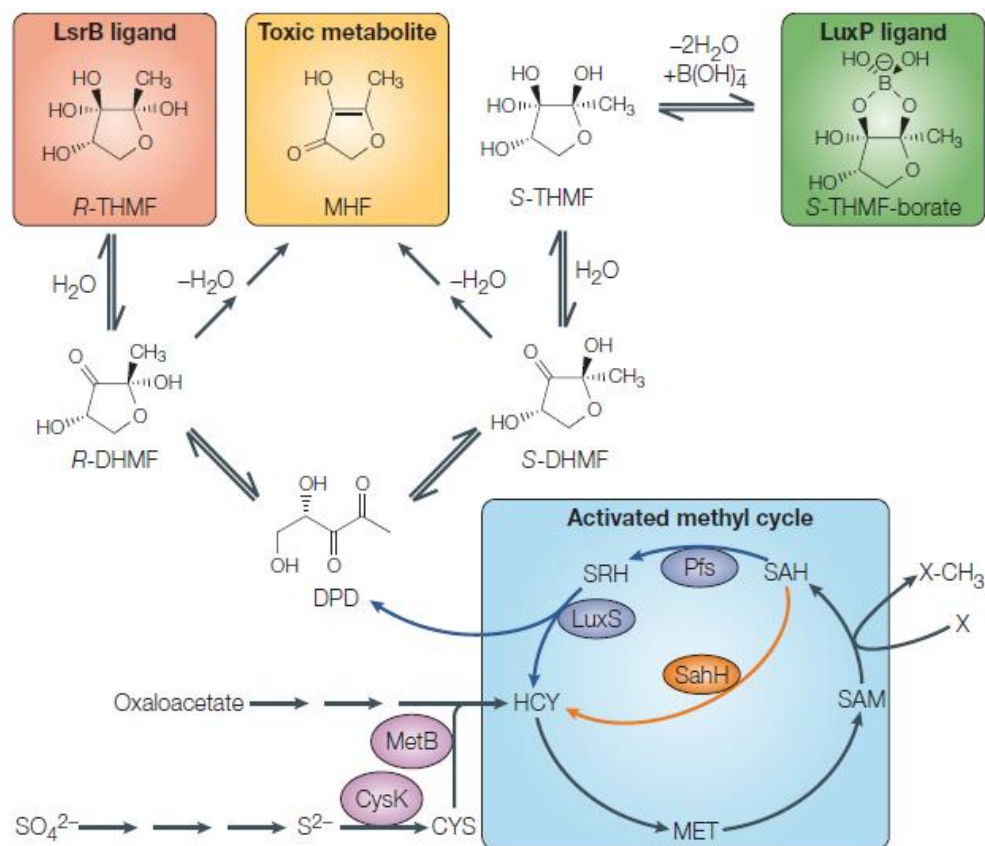
El sistema de QS regulado por el AI-2 fue identificado por primera vez en la bacteria Gram-negativa *V. harveyi*, tras observarse que las cepas de esta bacteria deficientes en la producción de AHL, conservaban la capacidad de producir bioluminiscencia en ausencia del autoinductor natural 3-hydroxy-C4-HSL, sugiriendo esto la presencia de una segunda ruta de QS.

Experimentos posteriores mostrarían que la actividad de cepas reporteras del AI-2 de *V. harveyi* podía ser estimulada por sobrenadantes libres de células de diferentes cultivos bacterianos. Años más tarde se descubriría el gen que codificaba para LuxS la enzima responsable de la biosíntesis del AI-2. La presencia del AI-2 en más de setenta especies bacterianas tanto Gram-negativas como Gram-positivas sugiere que éste podría ser el sistema más antiguo de autoinducción o detección de quórum, y que se desarrolló antes de la divergencia de ambos grupos, siendo la regulación de algún proceso metabólico, su papel anterior. Todos estos hallazgos permitieron establecer que este sistema considerado entre especies, cumplía hoy día la función de un “lenguaje universal” (Otero *et al.*, 2005).

El sistema AI-2/LuxS- implica la producción del AI-2 por la enzima LuxS; la cual se encarga de cambiar la ribosa-homocisteína en homocisteína y 4,5-dihidroxy-2,3-pentanodiona (DPD). La DPD, forma diferentes derivados de furanonas en presencia de agua (Fig.7), los cuales han sido identificados formando complejos cristalizados junto a sus respectivas proteínas receptoras, LuxP (*V. harveyi*) y LsrB (*Salmonella typhimurium*) (Fig. 8) (Vendeville *et al.*, 2005).

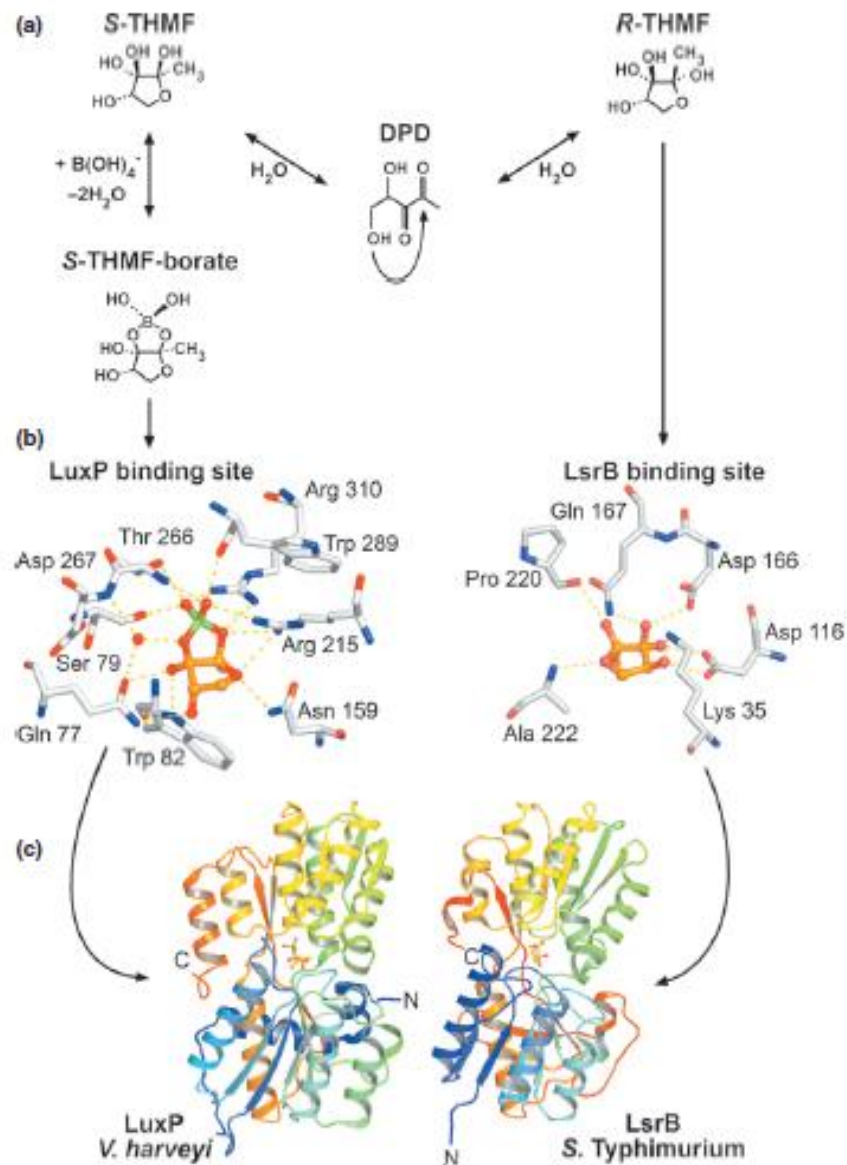
Se ha descrito que el AI-2 controla características asociadas a la virulencia como (formación de biofilm, producción de toxinas, proteasas, hemolisinas, citotoxicidad, adhesión, motilidad, respuesta a estrés, así como también las relacionados al metabolismo del hierro, azufre y carbón en algunas bacterias) (Xavier & Bassler, 2003).

El AI-2 ha sido asociado con tres posibles funciones: la primera como AI dentro del QS, la segunda como una señal ambiental que desencadena la respuesta a estrés oxidativo y por último como un metabolito que puede ser utilizado bajo ciertas condiciones (Watson *et al.*, 2002).



**Fig. 7. Interconversiones químicas de moléculas en relación al ciclo del metilo activado y la generación del AI-2.** Las reacciones para generar homocisteína (HCY) a partir de (i) sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) a sulfuro, y de (ii) oxalacetato (OA), en presencia de las enzimas (MetB y CysK) se muestran retroalimentando las reacciones que comprenden el ciclo de metil activado (caja azul). Este último implica la formación de metionina (MET) y su subsecuente conversión a *S*-adenosilmetionina (SAM). El grupo metilo activado ( $\text{CH}_3$ ) de la SAM es utilizado en la metilación de RNA, DNA, ciertos metabolitos y proteínas (X), lo cual genera un metabolito tóxico *S*-adenosilhomocisteína (SAH). SAH es removida posteriormente y el ciclo es completado por alguna de las dos rutas dependiendo del organismo. Una de las rutas involucra la conversión en un solo paso de SAH a HCY por la enzima SAH hidrolasa (SahH), la otra requiere la producción de *S*-ribosilhomocisteína (SRH) por Pfs y a partir de esta la generación de HCY por LuxS, quien simultáneamente produce 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD) precursor del AI-2. Este DPD sufre una ciclización espontánea a la forma *R* o *S* de 2, 4-dihidroxi-2-metildihidro-3-furaronona (DMHF). El *R*-DHMF experimentará una hidratación para formar la molécula que ha sido cristalizada junto a LsrB, (2*R*,4*S*)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofuranona (*R*-THMF, caja roja). Alternativamente, puede ocurrir hidrólisis del compuesto para generar 4-hidroxi-5-metil-3(2*H*)-furanona (MHF, caja amarilla). El MHF puede ser formado también a través de la hidrólisis del *S*-DHMF, el cual adicionalmente puede hidratarse para formar *S*-THMF y subsecuente formar un diéster con ácido bórico para producir el ligando acoplado con LuxP (caja verde). Las reacciones reversibles o interconversiones se muestran con flechas en doble sentido (Vendeville *et al.*, 2005; Winzer *et al.*, 2003, Miller & Duerre *et al.*, 1968, Nedvidek *et al.*, 1992).





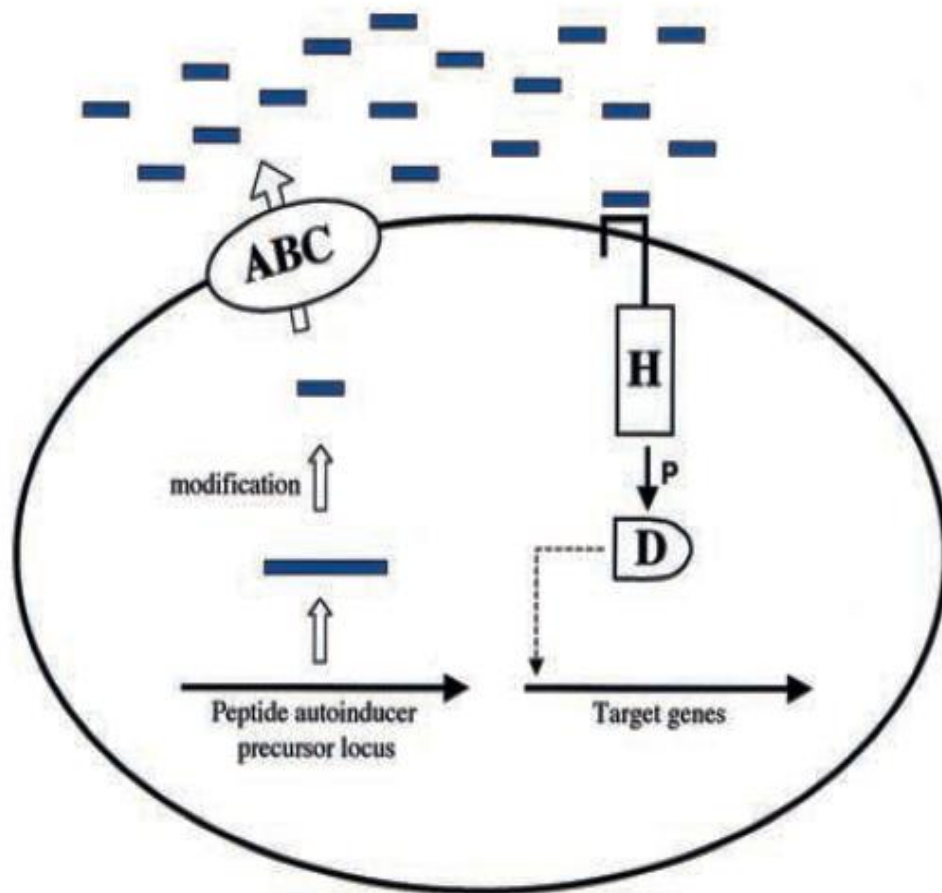
**Fig.8. Moléculas señalizadoras del AI-2 y sus receptores.** a) El DPD producto de LuxS experimenta de forma espontánea reacciones de hidratación y ciclización en solución para formar el R-THMF (detectado por *Salmonella typhimurium*) y S-THMF. En presencia de boro, esta última molécula reacciona formando S-THMF-borato (detectado por *V. harveyi*). B) Estos ligandos del AI-2 son coordinados por diferentes interacciones (puentes de hidrógeno o puentes salinos/ líneas amarillas discontinuas) con diferentes residuos de aminoácidos en los sitios de unión de sus respectivos receptores: LuxP acoplado a S-THMF-borato de *V. harveyi*, y LsrB acoplado a R-THMF de *S. typhimurium*. C) Modelo de cintas donde se muestran las terminales amino y carboxilo de la proteína (Pereira *et al.*, 2012).

### **AI-3/QseC**

El AI-3 fue descrito por primera vez como un componente de medios de crecimientos gastados, el cual activaba la expresión de los genes responsables de la adhesión de EHEC a células eucarióticas, cuyo resultado es el reacomodo de los filamentos de actina (Sperandio *et al.*, 2003). La estructura y síntesis de la señal aún no están claras. Se ha demostrado que la señal que controla este sistema está influenciada por *luxS*, ya que la producción del AI es menos eficiente en mutantes de este gen, sin embargo dicha producción no es dependiente de *luxS* (Gospodarek *et al.*, 2009).

### **AIP/Agr-**

Este sistema de comunicación célula-célula se presenta únicamente en bacterias Gram-positivas, y está basado en el prototipo de sistema Agr, descrito inicialmente en cepas de *Staphylococcus aureus*. El sistema AIP/Agr- emplea señales polipéptidicas o péptido-señales, los cuales poseen dos funciones: actúan sobre el organismo que los produce como AIs y funcionan sobre otros como inhibidores. Esa señal, denominada AIP, es codificada por los genes *agrD*, luego de su traducción, el propéptido AgrD es dirigido hacia la membrana por una secuencia N-terminal, una vez ahí, las endopeptidasas asociadas a la membrana cortan la secuencia Carboxilo terminal; la fracción N-terminal del propéptido que incluye la secuencia señal es eliminada por la peptidasa SpsB. Eventualmente, la fracción C-terminal, se unirá covalentemente mediante la cisteína situada en la posición central a un anillo de tiolactona (Fig. 9) (Gospodarek *et al.*, 2009).



**Fig. 9. Modelo de QS mediado por AIPs en bacterias Gram-positivas.** Se muestra la producción de un precursor de péptido (barra larga de color azul), su modificación, procesamiento, exportación ya como un péptido maduro o AIP (barra corta de color azul) por un cassette de unión de ATP (ABC). La proteína sensor kinasa reconoce el AI y subsecuentemente se autofosforila en un residuo conservado de histidina (H), el grupo fosforilo será transferido a una proteína reguladora de la respuesta, y esta se fosforilará en un residuo conservado de aspartato (D). El regulador de la respuesta una vez fosforilado se unirá a promotores para regular la expresión de diferentes genes (Schauder and Bassler, 2001).

## 1.7 REGULACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA POR QUORUM SENSING

Durante el proceso de infección, la sobrevivencia y la multiplicación en un ambiente hostil son prioridades claras para el patógeno, quien debe regular la expresión de aquellos genes necesarios para establecerse en su nuevo nicho. Algunos parámetros como temperatura, pH, osmolaridad y disponibilidad de nutrientes funcionan como señales ambientales que controlan la expresión coordinada de determinantes de virulencia en bacterias, algunos de los cuales se ha visto se encuentran sujetos a regulación por QS.

En las bacterias Gram-negativas el QS ha sido descrito en *Pseudomonas aeruginosa* (Latifi *et al.*, 1996), *Burkholderia cepacia* (Lewenza *et al.*, 1999), *Chromobacterium violaceum* (McClellan *et al.*, 1997), entre otras.

En *Edwardsiella tarda*, la inactivación del gen *edw1* que codifica para una N-acylhomoserinlactona sintasa, permite la expresión de la proteína FliC, una flagelina de aproximadamente 45 kDa, sugiriendo con esto que la motilidad se encuentra regulada negativamente por QS (Morohoshi, *et al.*, 2009) en este microorganismo.

Mientras que en *Brucella melitensis* un regulador putativo del QS, BlxR modula positivamente el operon *virB*, los genes que codifican flagelo y otros factores de virulencia como *bopA* (Rambow-Larsen, *et al.*, 2008). De igual forma, en las cepas EHEC y en K-12 de *E. coli*, QseB y C, participan en la cascada de regulación del flagelo y los genes de motilidad por QS (Sperandio, *et al.*, 2002).

## 2. ANTECEDENTES

Van der Vinne *et al.*, en el 2005 estudiaron la regulación de los genes de virulencia en *Mannheimia haemolytica* A1 por *Quorum sensing*, para ello construyeron una mutante de *luxS(-)*. Mediante análisis de RT-PCR demostraron que no se presentaban diferencias en los niveles de RNAm de la leucotoxina (*lktC*), sin embargo había un aumento en los niveles de RNAm de genes putativos de virulencia, proteínas de unión a transferrina (*tbpB*), adhesinas (*ahs*) y biosíntesis de cápsula (*nmaA*). Los resultados de microscopía electrónica mostraron una mayor formación de cápsula en la mutante respecto a la cepa silvestre, adicionalmente la mutante presentó más adhesión a células traqueales de bovino, sin embargo en terneros desafiados se recuperó la cepa silvestre en mayor cantidad.

En el 2008, Li *et al.*, trabajando con mutantes de *Actinobacillus pleuropneumoniae* para el gen *luxS* encontraron que la mutante presentó deficiencias en el crecimiento al ser cultivadas en medio libre de suero, así como también, menor habilidad para colonizar diferentes tejidos de ratón. En contraste, su capacidad para formar biofilm, se vio incrementada. Esto debido posiblemente a una regulación negativa de *apxIIA*, un factor de virulencia principal de *A. pleuropneumoniae*, lo cual podría contribuir a una atenuación de su virulencia. Sus resultados demostraron que *luxS* podría regular diferentes procesos incluidos la formación de biofilm y la expresión de factores de virulencia.

Vaca *et al.*, en el 2010 evaluaron la adhesión de 12 cepas de *G. anatis* a superficies inertes, como un posible mecanismo de formación de biofilm. Tres cepas formaron biofilms robustos sobre plástico, dos se adhirieron débilmente y siete fueron incapaces de adherirse al plástico; sin embargo todas se adhirieron al vidrio a 37°C. La adhesión no se observó en presencia de tripsina, lo que sugiere la participación de proteínas en este proceso. Mediante microscopía electrónica de barrido observaron material exudado, micro vesículas, canales, estructuras tubulares y estructuras parecidas a filamentos formando parte de un biofilm

Negrete-Abascal *et. al.*, en el 2011b, describieron la presencia de proteínas amiloides en la superficie de *G. anatis*, posiblemente fimbrias tipo curli, que presentaron resistencia al ácido fórmico, a las altas temperaturas y la digestión por tripsina, las cuales están relacionadas con la adhesión y la formación de biofilm.

Montes-García, en el 2012 demostró la movilidad de las cepas F149<sup>T</sup> y ESV-69 de *G. anatis*, esta movilidad se vió afectada por el pH y la temperatura del ambiente, y presentó como requerimientos dextrosa (13mM), cloruro de sodio (30.1 mM) y cloruro de calcio (7 mM). Mediante microscopía electrónica de transmisión encontró que *G. anatis* presentaba flagelos polares (16 micras de longitud y 10 a 20 nm de diámetro) constituidos por una proteína monomérica de 60 kDa, la secuencia de aa. de esta proteína mostró alta identidad con secuencias de flagelinas identificadas de *Clostridium chauvoei*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

*G. anatis* es responsable de originar una disminución en la producción de huevo debido a las afecciones que produce tanto en el aparato reproductor de gallinas de postura comercial así como también en las reproductoras, traduciéndose en fuertes pérdidas económicas para la industria avícola.

Dada a la importancia de este microorganismo, y debido a que durante el proceso de infección, los patógenos requieren de la liberación al medio de múltiples factores de virulencia, cuya expresión se encuentra regulada por numerosos procesos entre ellos el QS, este trabajo pretende contribuir al conocimiento de los factores de virulencia en *G. anatis* que se encuentran regulados por comunicación bacteriana célula-célula.

El entendimiento de la regulación de factores de virulencia regulados por QS permitirá el desarrollo de moléculas sintéticas específicas que neutralicen el efecto de los autoinductores en etapas determinantes de la infección como lo son la adhesión y adopción de formas de crecimiento particulares (biofilm), lo cual podría reducir las posibilidades de causar daño al hospedero por parte del patógeno.

### HIPÓTESIS

Si la expresión de factores de virulencia en *Gallibacterium anatis* se encuentra regulada por Quorum Sensing, entonces, la adición de SNs, MC o catecolaminas al medio de crecimiento de la bacteria, generará una diferente expresión de OMPs, así como también cambios en la tasa de crecimiento y la formación de biofilm.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

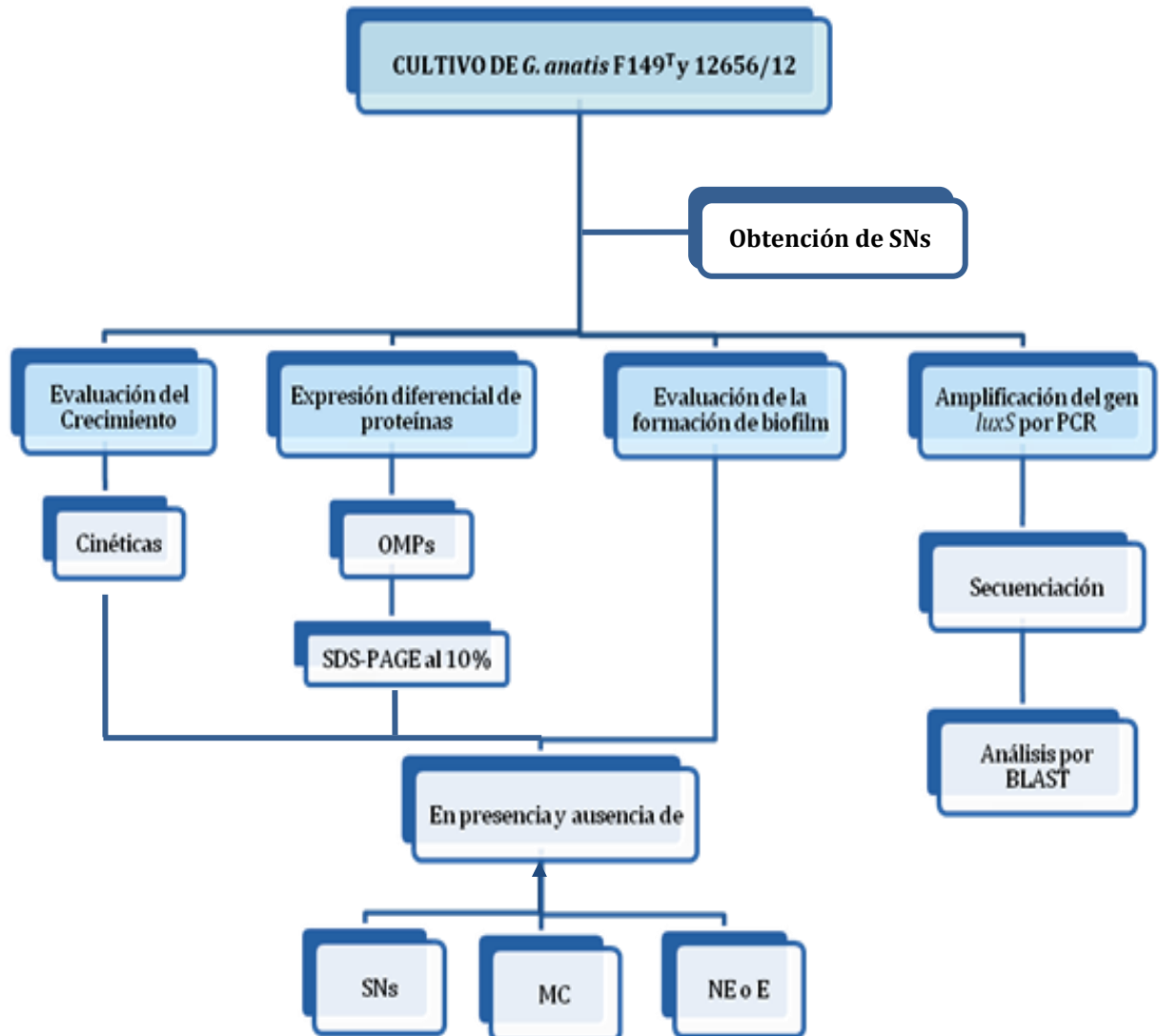
- Analizar la expresión de factores de virulencia en *G. anatis* regulada por *Quorum sensing*

### 4.2 OBJETIVO PARTICULARES

- Determinar si la capacidad de formar biofilm es modificada por la adición de SNs, NE, E y medio condicionado.
- Determinar el efecto de la adición de Sobrenadantes (SNs), NE, E o medios condicionados (MC) en el crecimiento la cepa F149<sup>T</sup> de *G. anatis*.
- Determinar la respuesta ante un AI autoproducido.
- Obtener un patrón de proteínas de membrana externa (OMPs) de *G. anatis* F149<sup>T</sup> y 12656/12 en presencia de Norepinefrina (NE) y Epinefrina (E).
- Analizar la expresión diferencial de OMPs en presencia de NE y E.
- Amplificar por PCR el gen *luxS* a partir de DNA genómico de las cepas 12656/12 y F149<sup>T</sup> de *G. anatis*.
- Obtener las secuencias de los genes amplificados.
- Realizar un análisis *in silico* de las secuencias obtenidas.



## 5. ESQUEMA DE TRABAJO



## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 CEPAS BACTERIANAS

Las cepas bacterianas empleadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 5.

Tabla 5. Cepas empleadas en el estudio

BACTERIA	BIOVAR/SEROTIPO	CEPA	AISLADA DE
<i>G. anatis</i>	Biovar no hemolítica	F149 <sup>T</sup>	Tracto intestinal de pato sano
<i>G. anatis</i>	Biovar hemolítica	12656/12	Hígado de gallina con septicemia
<i>Av. paragallinarum</i>	Serovar A	ATCC 0083	Pollo con coriza infecciosa
<i>A. pleuropneumoniae</i>	Serotipo 1	35	Absceso de pulmón de un caso clínico de Pleuroneumonía Contagiosa Porcina
<i>M. haemolytica</i>	Serotipo 1		Lavados bronquiales de ganado bovino con mannheimiosis neumónica

### 6.2 MEDIOS DE CULTIVO

Para el desarrollo de los diferentes ensayos, las bacterias fueron crecidas en Caldo de Infusión de Cerebro y Corazón (BD Bioxon). Para su mantenimiento se sembraron en Agar de Infusión de Cerebro y Corazón (BD Bioxon, Becton Dickinson, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, México). En los cultivos de *A. pleuropneumoniae* y *Av. paragallinarum* en caldo se adicionó NAD (0.01%) y en su crecimiento en placa se empleó como cepa nodriza *Staphylococcus aureus*.

### **6.3 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM EN PRESENCIA DE SNs, CATECOLAMINAS o MEDIO CONDICIONADO.**

Para evaluar la formación de biofilm en placas de microtitulación, se emplearon placas de poliestireno estériles con 96 pozos (Sarsted, Barcelona, España), cada uno de los cuales fue llenado con 180  $\mu$ l de medio BHI e inoculados con 20  $\mu$ l de células de *G. anatis*, que previamente fueron llevadas a una densidad óptica de 1 a 630 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado. Como control negativo se empleó caldo BHI sin inocular (Cramton *et al.*, 1999). Con el objetivo de determinar si la adición de diferentes componentes al medio de cultivo tenía algún efecto sobre la formación de biofilm se adicionó NE y E a una concentración final de 50  $\mu$ M, SNs (10% y 50% del Volumen Total (VT)) o bien medio DMEM condicionado (24 h en contacto con células MCF-7) (50% del VT).

Las placas fueron incubadas en condiciones estacionarias a 37<sup>o</sup> C por 12 horas. Los contenidos de cada pozo fueron aspirados y las células que quedaron pegadas fueron fijadas con 200  $\mu$ l de metanol por 15 min. Posteriormente se secaron al aire y a continuación cada pozo fue teñido con 150  $\mu$ l de cristal violeta Hucker's al 2% por 5 minutos. El exceso de tinción se eliminó mediante lavados con agua corriente. El colorante retenido por las bacterias adheridas fue recuperado con 150  $\mu$ l de ácido acético glacial al 33% (v/v). La densidad óptica (DO) de las soluciones de cada pozo a 630 nm se midió en un lector de placas ELISA (Microplate Reader model 680; BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) Los ensayos se realizaron por triplicado, y los resultados se promediaron (Fredheim *et al.*, 2009).

### **6.4 OBTENCIÓN DE SNs DE *A. pleuropneumoniae*, *M. haemolytica*, *G. anatis* F149<sup>T</sup>, 12656/12 y *Av. paragallinarum*.**

*A. pleuropneumoniae*, *M. haemolytica*, *G. anatis* F149<sup>T</sup>, 12656/12 y *Av. paragallinarum* fueron cultivadas en medio BHI y se incubaron durante 24 h o toda la noche a 37<sup>o</sup> C en agitación. Para obtener los SNs libres de células, los cultivos de toda la noche fueron centrifugados a 13,663 g durante 15 minutos, posteriormente fueron pasados por un filtro de 0.22- $\mu$ m y almacenados a -20<sup>o</sup> C o bien fueron utilizados en el momento.

### **6.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CATECOLAMINAS (NE o E) SOBRE EL CRECIMIENTO *G. anatis* F149<sup>T</sup> y 12656-12.**

Se cultivaron las cepas F149<sup>T</sup> y 12656-12 de *G. anatis* en 5 ml de medio BHI. Una alícuota de este cultivo se diluyó 1:100 en 25 ml de BHI y se incubó en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.1 a 595 nm, en ese momento se adicionaron SNs (10% y 50% VT), NE, E, (50 µM) o medio DMEM condicionado (50% VT) a diferentes matraces (Sperandio *et al.*, 2003). Como control negativo se empleó un matraz al cual no le fue adicionado ninguna catecolamina o SN. Se midió la absorbancia a 595 nm cada hora hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria. Los resultados de las absorbancias fueron graficados para su posterior análisis.

### **6.6 OBTENCIÓN DE OMPs DE LAS CEPAS F149<sup>T</sup> y 12656-12 DE *G. anatis* EN PRESENCIA DE CATECOLAMINAS**

Se cultivó *G. anatis* en tubos con 5 ml de medio BHI. Una alícuota de este cultivo se diluyó 1:100 en 100 ml de medio BHI se incubó en agitación hasta alcanzar una densidad de 0.1 a 595 nm, en este momento se adicionó NE o E (50 µM), y se incubaron en agitación durante toda la noche a 37° C. Los cultivos de toda la noche de las cepas F149<sup>T</sup> y 12656-12 de *G. anatis* fueron centrifugados a 13,663 g durante 20 minutos, las células obtenidas se resuspendieron en 1 ml de HEPES 10mM pH7.4 adicionado con lisozima (0.5mg/ml). Las células fueron colocadas en agitación durante 15 min a 37° C a 200 rpm, posteriormente las células se sonicaron durante 8 ciclos (10 segundos de sonicación y 10 segundos de pausa) todo el tiempo en hielo. Después de la sonicación las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 2 minutos en una microcentrífuga (rotor eppendorf AE01) para desechar las células que no se rompieron. El SN se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 minutos (rotor eppendorf AE01). La pastilla fue resuspendida en 200 µl de HEPES 10 mM y se agregaron 200 µl de HEPES 10 mM con 2% de Tritón X-100, luego fueron centrifugaron a 14 000 rpm durante 30 min (AE01). La pastilla obtenida se lavó sin resuspender en 500 µl de HEPES, nuevamente se centrifugó 2 minutos a 14 000 rpm (rotor eppendorf AE01) y se guardó en congelación sin líquido (Blackall *et al.*, 1990).

## 6.7 ELECTROFORESIS DE OMPs

Con el objetivo de determinar las diferencias de expresión en el patrón de proteínas, las muestras fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, durante 120 minutos a 97 V. Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie, y desteñidos con ácido acético al 10%. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford y se cargó 15 µg por pozo (Bradford, 1976).

## 6.8 EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO

Para obtener el ADN cromosómico de *G. anatis* F149<sup>T</sup> y 12656/12 por el método fenol-cloroformo descrito por Sambrook *et al.*, 1989, se incubó una colonia de *G. anatis* en 10 ml de caldo BHI, el cultivo de toda la noche fue centrifugado a 13,000 rpm, el SN obtenido fue desechado, y la pastilla obtenida se lavó 3 veces con Tris HCl 0.1M con NaCl, tras lo cual lo cual fue resuspendida en 200 µl de lisozima (5mg/ml en 10 mM de HEPES pH 7.4) e incubada durante 30 minutos a 37° C. A continuación le fue adicionado un volumen de 500 µl de buffer de lisis ( Tris acetato 40mM, pH 7.8, NaAc 20 mM, EDTA 1 mM, SDS 1% y RNAsa 10µg/ml), la mezcla se incubó nuevamente en las condiciones previamente descritas. En seguida se colocaron 100 µl de NaCl al 5M a la mezcla previamente mencionada, y posteriormente fue homogenizada por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm.

El SN fue recuperado en un tubo nuevo y se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó por inversión hasta formarse una suspensión y nuevamente fue centrifugada a 14,000 rpm durante 3 minutos.

Luego de esto, la fase superior fue recuperada en un tubo nuevo y se precipitada con 2 volúmenes de etanol frío al 100% y se dejó reposar durante 30 minutos. Finalmente la muestra se centrifugó durante 5 minutos y la pastilla obtenida fue lavada con 2 volúmenes de etanol al 70%, y se dejó secar a 40° C, una vez seca, fue resuspendida en 40 µl de agua desionizada libre de nucleasas (Sambrook *et al.*, 1989).

### 6.9 CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *luxS* DE LAS CEPAS F149<sup>T</sup> y 12656/412 DE *G. anatis*

Para la amplificación del gen *luxS* de las cepas F149<sup>T</sup> y 12656/12 de *G. anatis* se utilizaron los iniciadores que se muestran en la Tabla 6, los cuales fueron diseñados a partir de secuencias de homólogos de *luxS* pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*, reportados en GeneBank.

CEPA	INICIADORES	SECUENCIA
F149 <sup>T</sup>	GluxS F	ATTAGATTAGTTATGATACCCCTGCGG
	GluxS R	TTTAGAAACCCTCTCTAGACATTCGA
12656/12	LuxS F	TGGACCTCGCAGGCAGTGCAGCAGATG
	LuxS R	ATGAGATTAATGCTCGAAGTGTATGCGGAAC

**Tabla 6. Iniciadores empleados en este estudio**

Las condiciones de amplificación empleadas para la cepa F149<sup>T</sup> fueron las que a continuación se describen.

94° C	1.5 minutos	Inicio	
94° C	30 segundos	Desnaturalización	} 25 ciclos
45° C	30 segundos	Alineamiento	
72° C	1 minuto	Amplificación	
72° C	2 minutos	Elongación	
4° C	3 minutos	Conservación	

Las condiciones de amplificación que a continuación se describen fueron estandarizadas empleando los oligos Gluxsf y Gluxsr.

94° C	1.5 minutos	Inicio	
94° C	30 segundos	Desnaturalización	} 25 ciclos
55° C	30 segundos	Alineamiento	
72° C	1 minuto	Amplificación	
72° C	2 minutos	Elongación	
4° C	3 minutos	Conservación	

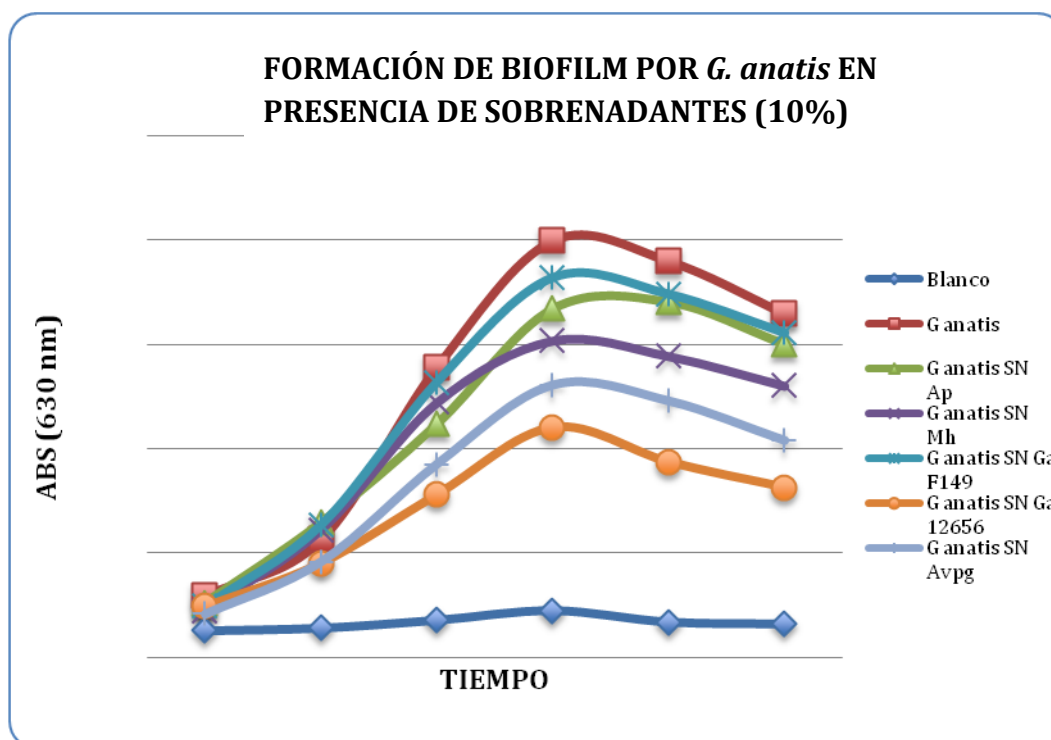
#### 6.10 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS *in silico*

La secuenciación se realizó utilizando el producto de PCR, por medio de un secuenciador ABI3730XL empleando el método de Sanger. El análisis *in silico* de la secuencia generada se realizó mediante el programa NCBI/Blast nucleotide ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), posteriormente se realizó la traducción de la secuencia obtenida con el programa Expasy ([www.expasy.org/tool/](http://www.expasy.org/tool/)) para conocer la secuencia de aminoácidos.

## RESULTADOS

### 7.1 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM POR *G. anatis*

Con el objetivo de evaluar si la formación de biofilm sobre superficies inertes se veía modificada al adicionar al medio SNs filtrados de *A. pleuropneumoniae*, *M. haemolytica*, *G. anatis* F149<sup>T</sup>, 12656/12 o *Av. paragallinarum*, se efectuaron ensayos sobre placas de poliestireno a diferentes tiempos. Como se puede observar en la Fig. 10 la adhesión de este microorganismo se vio ligeramente reducida en presencia de los cinco sobrenadantes empleados, esto respecto al control, al cual no le fue adicionado sobrenadante. El efecto más evidente se presenta al adicionar SNs de *G. anatis* 12656/12 y *Av. paragallinarum* en la cepa F149<sup>T</sup> de *G. anatis*.



**Fig 10. Evaluación de la formación de biofilm por *G. anatis* F149<sup>T</sup> en presencia de 10% de SN de diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Se muestra el efecto de la adición de SN de *A. pleuropneumoniae*, *M. haemolytica*, *G. anatis* cepa F149<sup>T</sup>, 12656/12 o *Av. Paragallinarum* en la formación de biofilm a diferentes tiempos (2,4,6,8,10 y 12 h).**



Tras comprobar que la adición de los diferentes SNs al medio presentaba un efecto sobre la adhesión, se evaluó la adición de un volumen mayor al medio (50%), esto para determinar si se producían efectos más evidentes. En la Fig. 11 se observa una reducción mayor en la adhesión a la superficie en presencia de 50% de SNs, mostrando así, una relación inversamente proporcional entre la cantidad de SN adicionado al medio y la adhesión a placas.

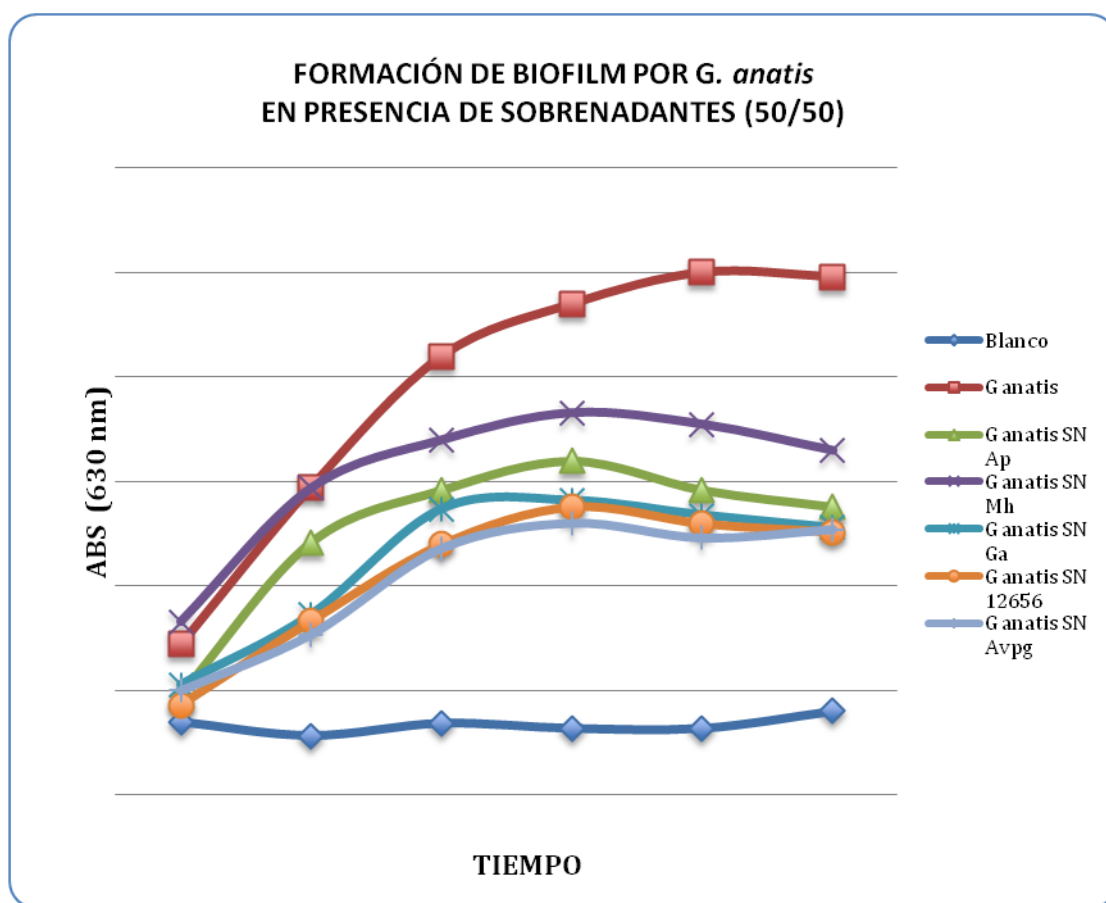
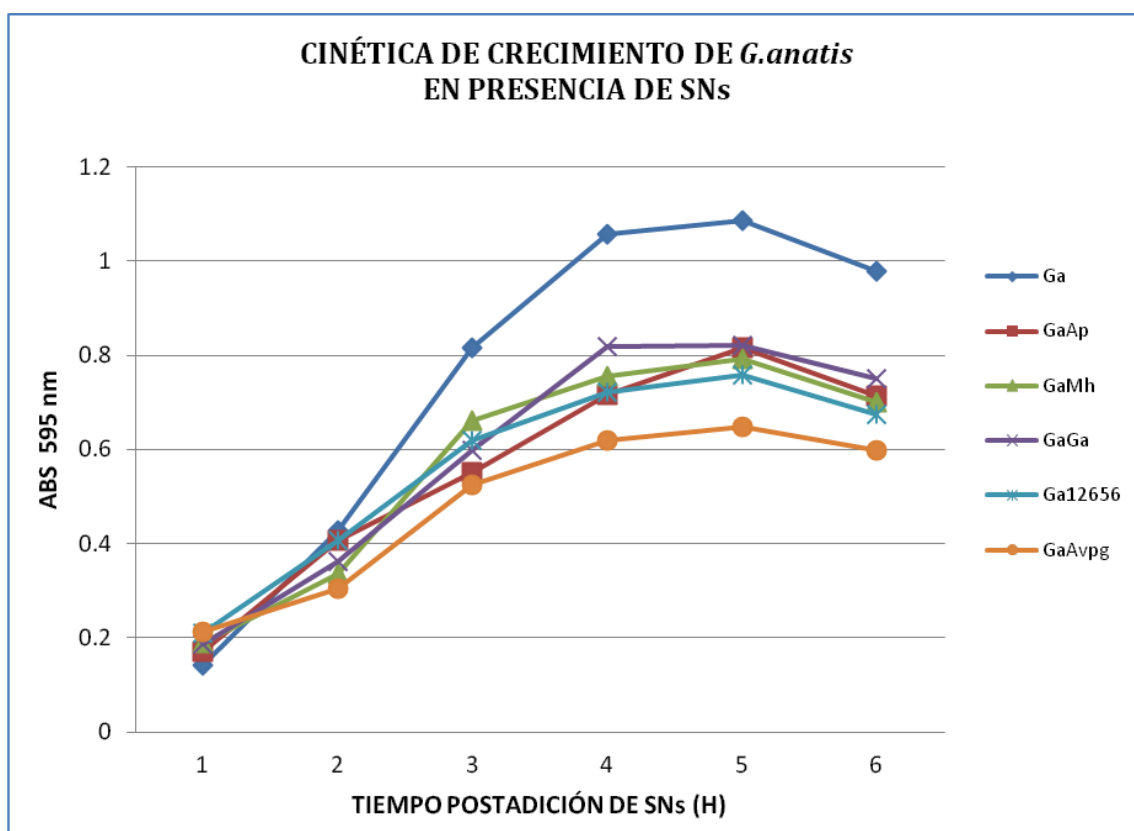


Fig 11. Evaluación de la formación de biofilm por *G. anatis* F149<sup>T</sup> en presencia de 50% de SNs de diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Se muestra el efecto de la adición de SN de *A. pleuropneumoniae*, *M. haemolytica*, *G. anatis* F149<sup>T</sup> y 12656/12 o *A. paragallinarum* en la formación de biofilm, a diferentes tiempos (2, 4, 6, 8, 10, 12 h).

## 7.2 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *G.anatis* F149<sup>T</sup> EN PRESENCIA DE SNs

Tras comprobar que la adición de SNs al medio inducía una disminución en la formación de biofilm, se realizaron cinéticas de crecimiento del microorganismo en presencia y ausencia de SNs. Los resultados obtenidos mostraron que tras la adición de los SNs al medio en el cual se cultivaba *G. anatis* F149<sup>T</sup>, su crecimiento se veía disminuido respecto al control al cual no se le adicionó SN, esto podría ser la causa de la reducción en la formación de biofilm evaluada previamente (Fig. 12).



**Fig 12.** Efecto de la adición de SN de diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae* en el crecimiento de *G. anatis* F149<sup>T</sup>. Se muestra una cinética de crecimiento postadición de SN de *A. pleuropneumoniae*, *M. haemolytica*, *G. anatis* F149<sup>Ty</sup> 12656/12 o *Av. paragallinarum*.

### 7.3 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM POR *G. anatis* EN PRESENCIA DE CATECOLAMINAS

Ya que en los SNs puede encontrarse moléculas derivadas del metabolismo bacteriano, que pudieran ser responsables de los efectos observados, se realizaron ensayos de formación de biofilm empleando moléculas químicamente puras, cuya función se asemeja a la de los AIs. Por lo cual se evaluó el efecto de las catecolaminas NE y E en ambas cepas.

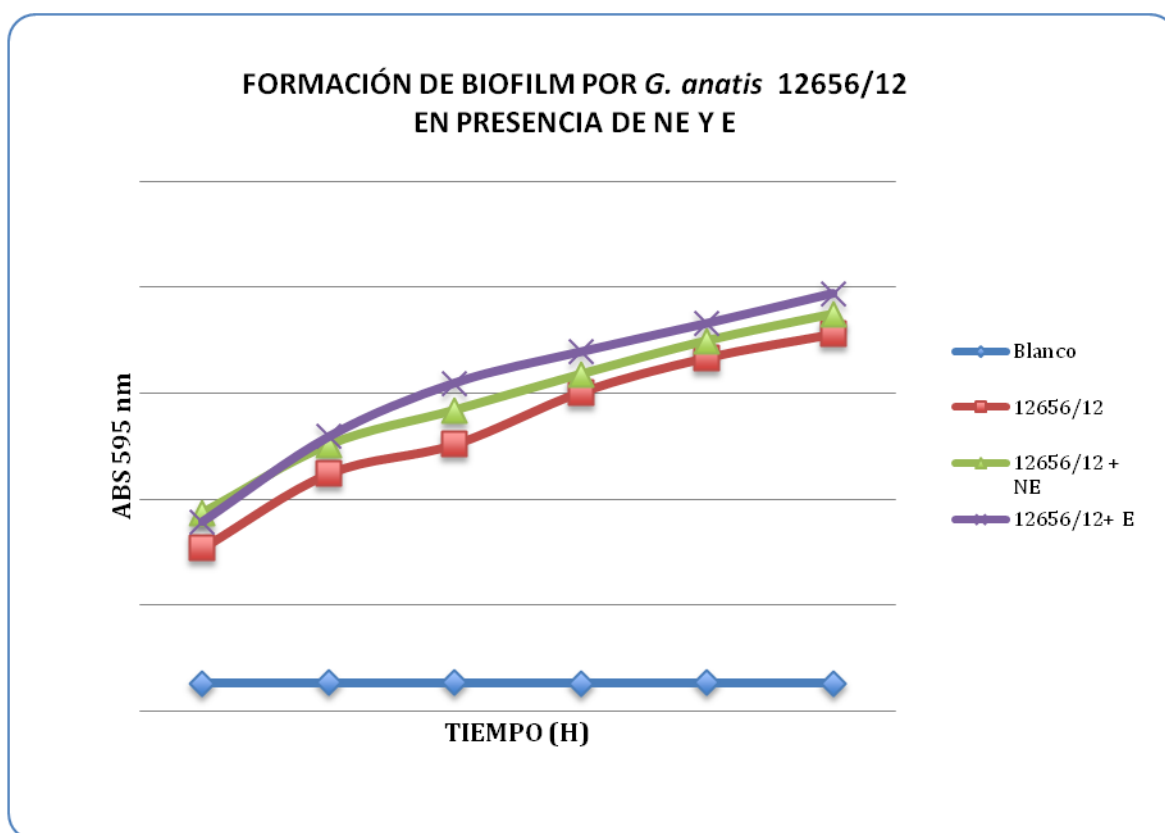


Figura 13. Evaluación de la formación de biofilm por *G. anatis* 12656/12 en presencia de NE o E (50  $\mu$ M).

Como se observa en las Fig. 13 y 14, la adición de catecolaminas al medio indujo un aumento en la formación de biofilm en ambas cepas, siendo dicho incremento mayor en presencia de E. La NE indujo también una sobreproducción de biofilm respecto al control, sin embargo este efecto fue menor en comparación con el generado por la E.

Se observaron diferencias en la producción de biofilm entre ambas cepas. La cepa 12656/12 alcanzó un valor máximo de ABS de 1.97 a las 12 h, mientras que F149<sup>T</sup> alcanzó 2.629 en el mismo período de tiempo ( Fig. 13 y 14).

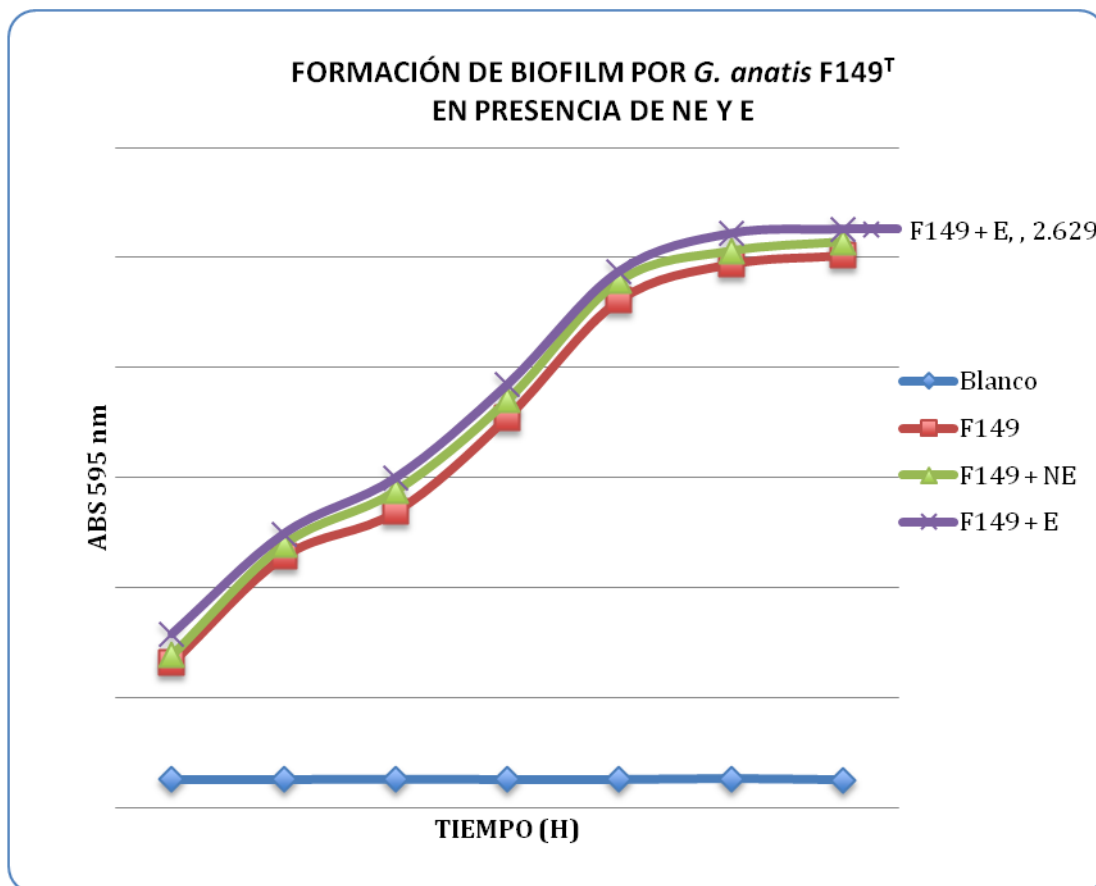


Fig. 14. Evaluación de la formación de biofilm por *G. anatis* F149<sup>T</sup> en presencia de NE o E (50 μM).

#### 7.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *G. anatis* F149<sup>T</sup> y 12656/12 EN PRESENCIA DE NE o E.

Con el objetivo de determinar si la adición de NE o E al medio, en una concentración de 50  $\mu$ M generaba cambios en el crecimiento de la cepa 12656/12 y F149<sup>T</sup> de *G. anatis*, se realizó una cinética de crecimiento en presencia y ausencia de NE o E. La cinética mostró que la adición de catecolaminas al medio produjo un cambio en el crecimiento, favoreciéndose este último en presencia de ambas moléculas (NE o E), siendo la NE la que indujo un mayor aumento en el crecimiento bacteriano, con una diferencia de aproximadamente 0.2 en la absorbancia respecto al control (sin catecolaminas) (Fig. 15).

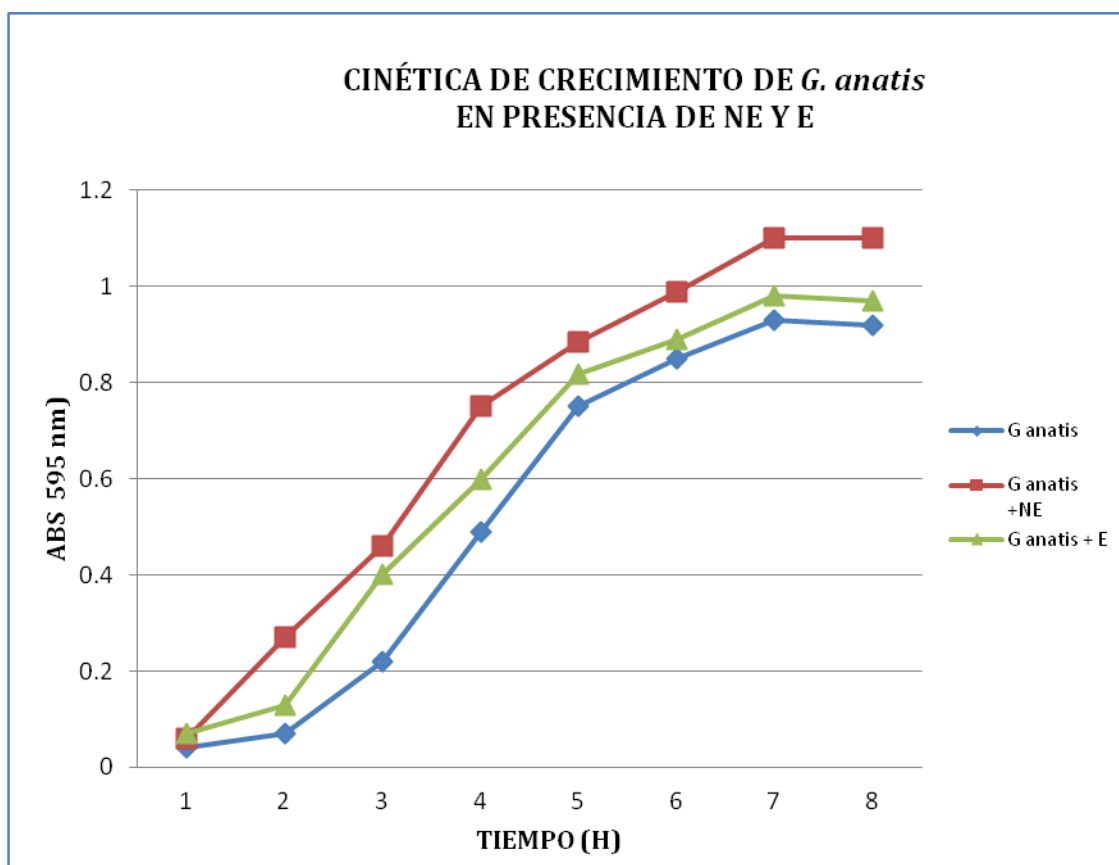
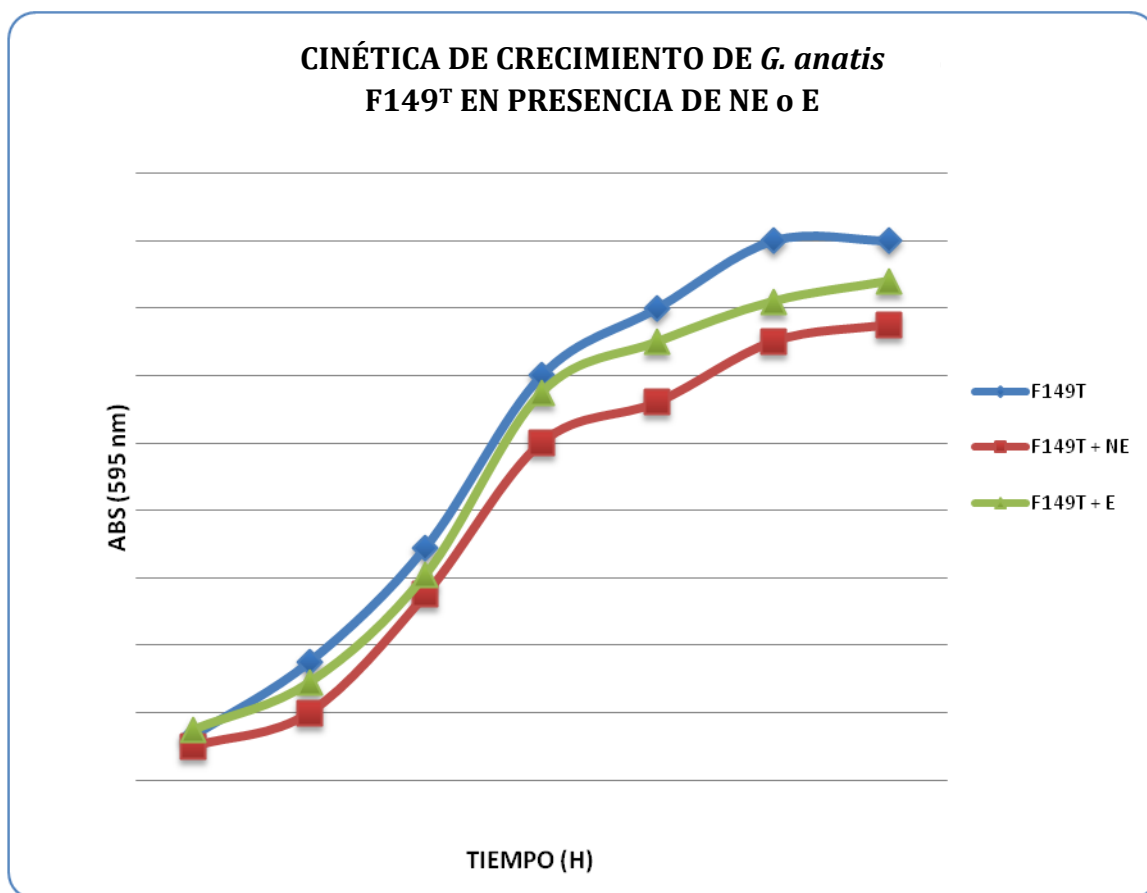


Fig. 15. Efecto de las catecolaminas en el crecimiento de *G. anatis* 12656/12. Se muestra una cinética de crecimiento de *G. anatis* en presencia y ausencia de 50  $\mu$ M de NE o E.

A diferencia de lo observado para la variedad hemolítica de *G. anatis*, la cinética de crecimiento realizada con la cepa F149<sup>T</sup> mostró que en presencia de las catecolaminas NE o E, se presenta una disminución en el crecimiento, siendo la NE, la catecolamina responsable del decremento más evidente en el crecimiento bacteriano (Fig. 16).



**Fig.16. Efecto de las catecolaminas en el crecimiento de *G. anatis* 12656/12.** Se muestra una cinética de crecimiento de *G. anatis* en presencia y ausencia de 50  $\mu$ M de NE o E.

### 7.5 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM POR *G. anatis* EN PRESENCIA DE DMEM

En estudios previos se ha descrito la presencia de uno o más sistemas de QS en un mismo microorganismo; dado que el AI-3 ha sido reportado como componente de MC, se evaluó el efecto del MC, DMEM sobre la formación de biofilm en ambas cepas.

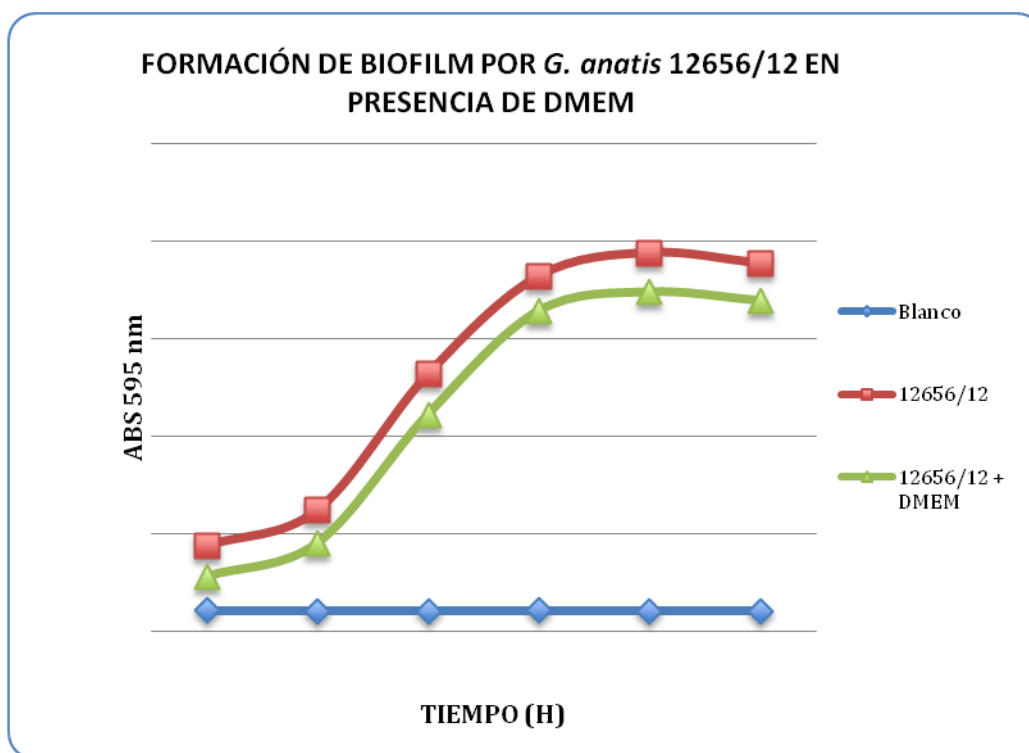


Fig. 17. Evaluación de la Formación de Biofilm por *G. anatis* 12656/12 en presencia de MC.

Como se observa en la Fig. 17 el MC no favoreció la formación de biofilm, generando valores menores de ABS en comparación con el control (sin DMEM ) en ambas cepas (Fig. 17 y 18). Se observa además que los valores máximos de DO en la cepa 12656/12 se alcanzan a las 10h y disminuyendo a las 12h. Mientras que en F149<sup>T</sup> el valor máximo se obtiene a las 12 h de incubación en microaerofilia a 37° C, alcanzando una densidad óptica cercana a los 2.5.

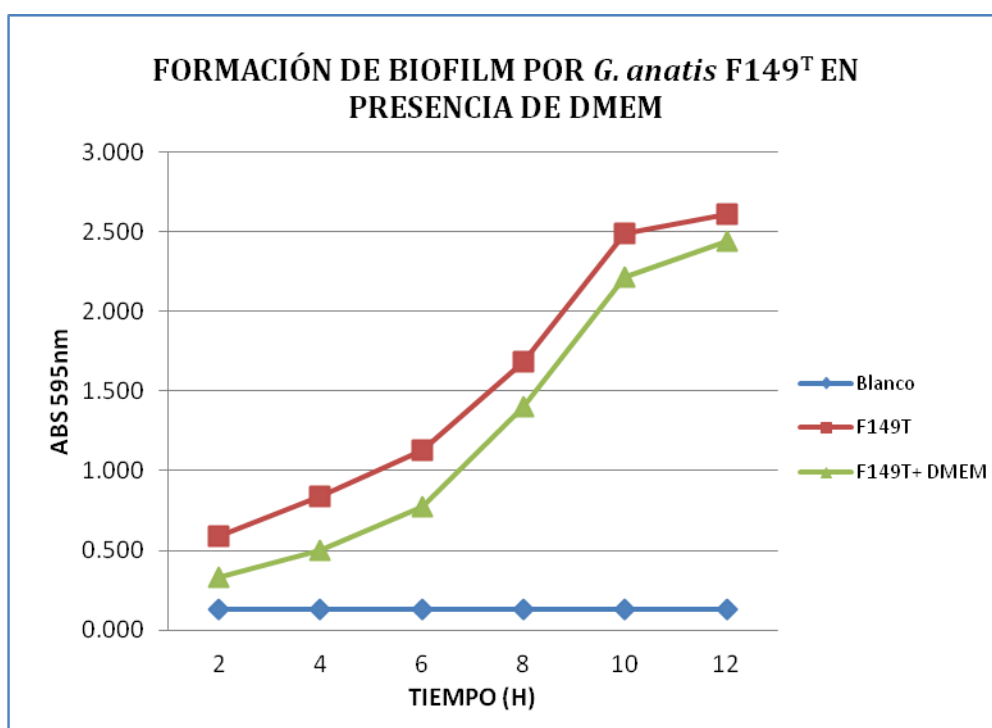


Fig. 18. Evaluación de la Formación de Biofilm por *G. anatis* F149<sup>T</sup> en presencia de MC.



### 7.6 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM POR *G. anatis* F149<sup>T</sup> A DIFERENTES TIEMPOS (12, 24, 36 Y 48 H)

Se realizaron ensayos de formación de biofilm por la cepa F149<sup>T</sup> de *G. anatis*, a tiempos posteriores (12, 24, 36 y 48 h) en presencia y ausencia de SNs (50%), NE (50  $\mu$ M), E (50  $\mu$ M) o MC (50%), esto para determinar si el efecto observado previamente (durante las primeras 12 h) se mantenía en tiempos posteriores o bien si este se veía modificado con el transcurso del tiempo. Los resultados obtenidos mostraron que los efectos generados por la adición de cada uno de los diferentes componentes SNs, NE, E o MC a las primeras 12h, son los mismos luego de 12h y estos se mantiene incluso hasta las 48 h (Fig. 19).

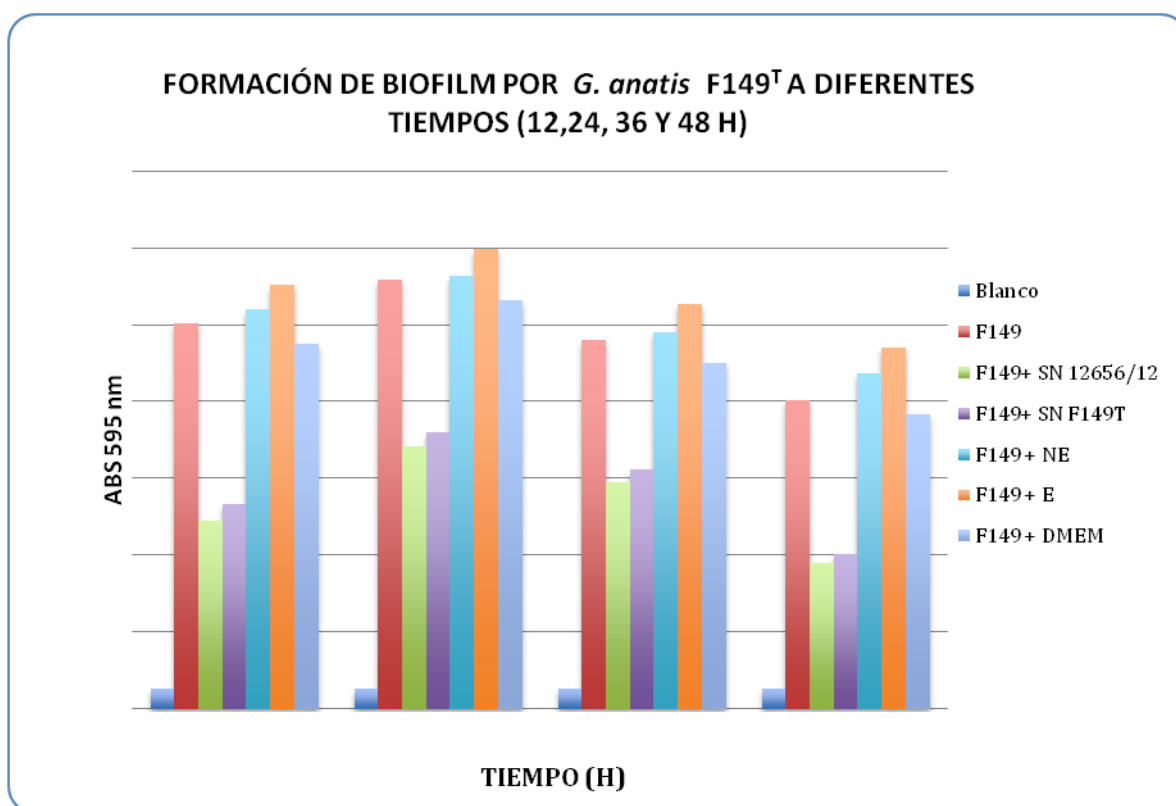


Fig 19. Evaluación de la formación de biofilm por *G. anatis* F149<sup>T</sup> a diferentes tiempos en presencia y ausencia de SNs (50%), 50  $\mu$ M de NE, E o MC DMEM (50%).

Bajo las mismas condiciones, fue evaluada la formación de biofilm de la cepa 12656/12 de *G. anatis*, como se observa en la Fig. 20 los efectos generados por la adición de SNs, NE, E o MC durante las primeras 12 h, son conngruentes con tiempos posteriores (24,36 y 48 h), observándose la mayor formación de biofilm a las 24h de incubación en condiciones de microaerofilia a una temperatura de 37º C, tras lo cual los valores de adhesión empiezan a descender progresivamente (36 y 48 h). Como se puede observar tanto para la cepa F149<sup>T</sup> como para la 12656/12 la adición de SNs y medio condicionado al medio en el cual fue cultivado *G. anatis* generó una disminución en la formación de biofilm por esta bacteria siendo más evidente este efecto en presencia de SNs. Por su parte la adición de catecolaminas indujo un aumento en la formación de biofilm, registrándose la mayor producción de este en presencia de 50 µM de E.

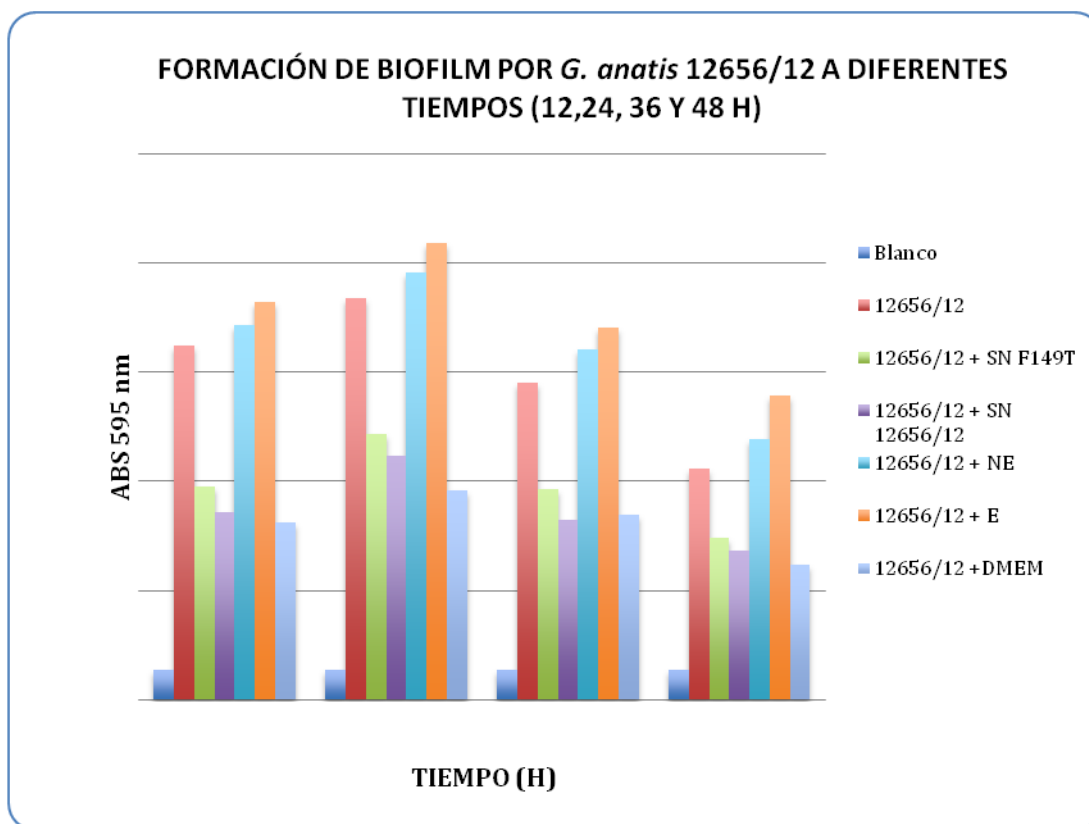
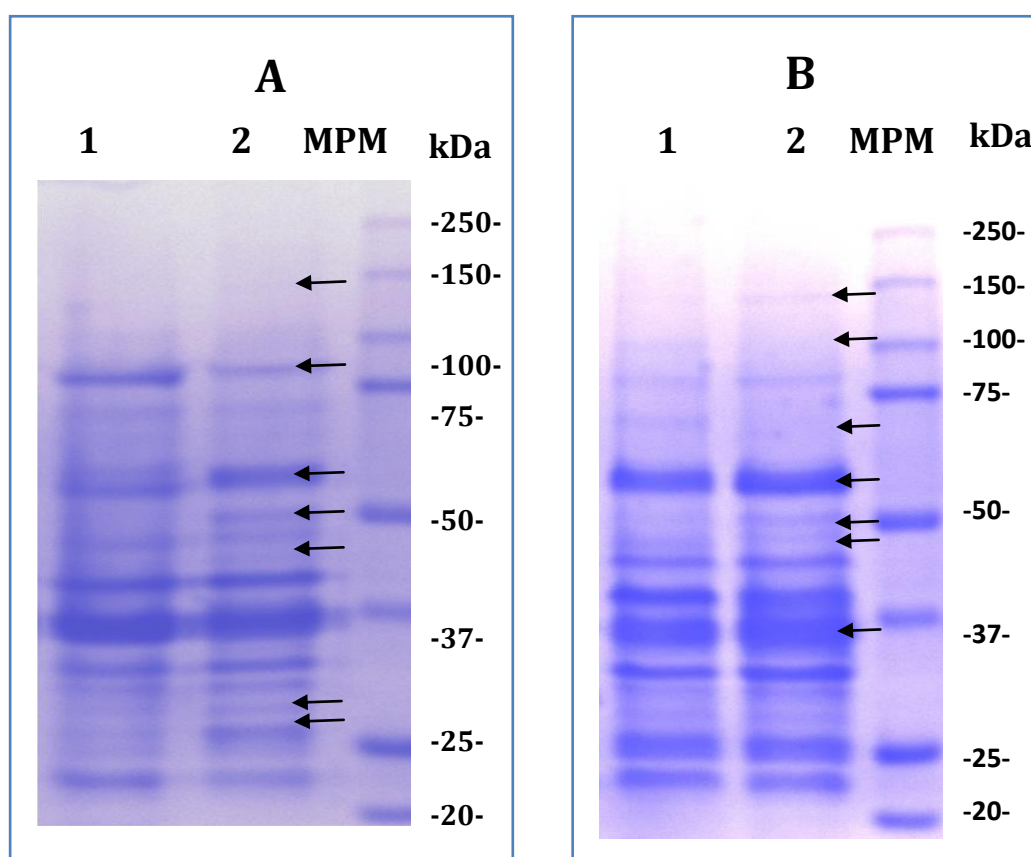


Fig 20. Evaluación de la formación de biofilm por *G. anatis* 12656/12 a diferentes tiempos en presencia y ausencia de SNs (50%), 50 µM de NE, E, o MC DMEM (50%).

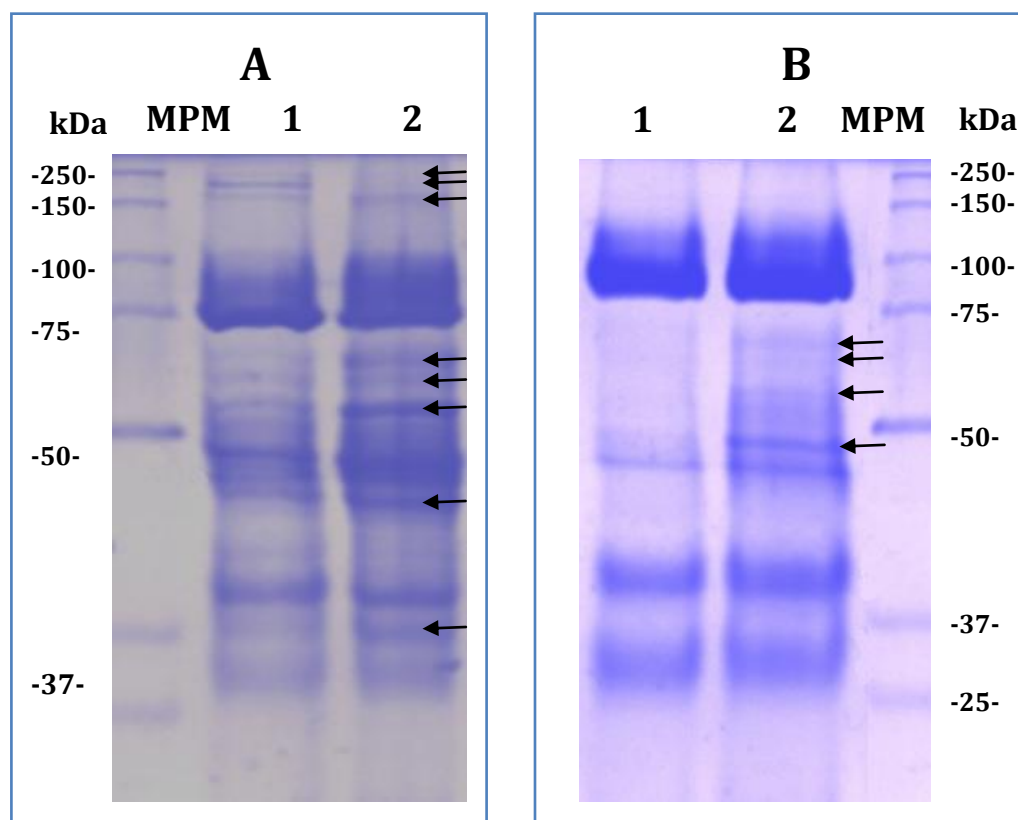
### 7.7 PATRÓN DE OMPs DE *G. anatis* F149<sup>T</sup> Y 12656/12 EN PRESENCIA DE E Y NE.

Mediante el corrimiento electroforético de geles SDS-PAGE al 10%, se obtuvieron perfiles proteicos de las cepas F149<sup>T</sup> y 12656/12 de *G. anatis* en presencia y ausencia de 50  $\mu$ M de E. Ambas patrones mostraron similitud presentando una gama de proteínas que iban desde los 23 hasta los 150 kDa.



**Fig 21. Perfil de OMPs de *G. anatis* en presencia o ausencia de E.** Se muestra en geles SDS-PAGE al 10% los perfiles proteicos de la cepas 12656/12 (A) y F149<sup>T</sup> (B) de *G. anatis* en ausencia (carril 2) y presencia (carril 1) de 50  $\mu$ M de E. Cada pozo contiene 15  $\mu$ g de proteína. La expresión diferencial de OMPs se señala mediante flechas negras.

En el caso de la cepa F149<sup>T</sup> se presentó una expresión diferencial de proteínas que corresponden a bandas de 26, 30, 50, 55, 80 y 150 kDa. La expresión de proteínas de 40, 50 y 150 kDa fue inducida en presencia de E, mientras que una proteína de 80 kDa fue reprimida bajo las mismas condiciones. La adición de E al medio de cultivo indujo la sobreexpresión de proteínas de 26, 30 y 55 kDa, con respecto al control (medio carente de E) (Fig. 21 A). Mientras que la cepa 12656/12 de *G.anatis* presentó una expresión diferencial de OMPs de aproximadamente 36, 47, 50, 60, 73, 100 y 150 kDa, en presencia de E, siendo inducidas las correspondientes a los 50 y 149 kDa y reprimidas en su expresión las que presentaron un PM de 73 y 100. La adición al medio de E también generó una sobreexpresión de proteínas de 36, 47 y 50 kDa (Fig. 21 B).

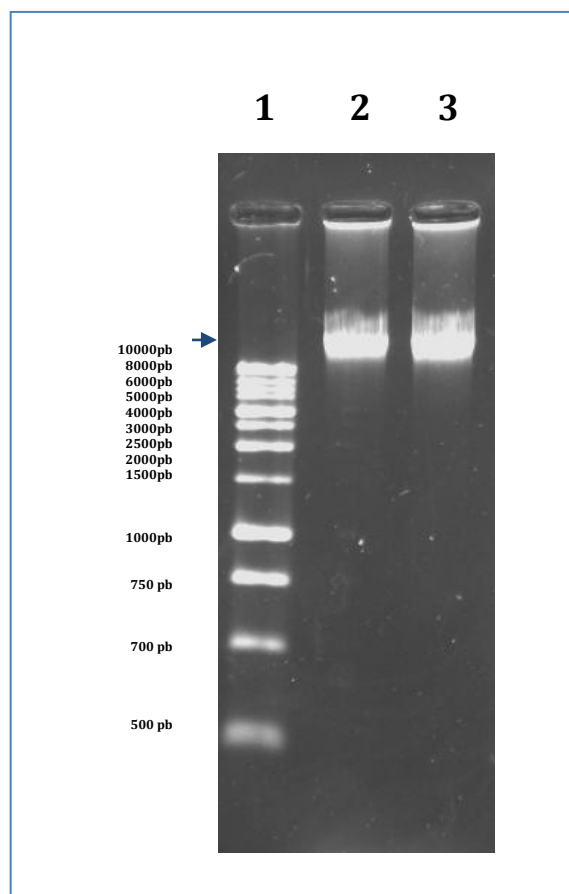


**Fig 22. Perfil de OMPs de *G. anatis* en presencia o ausencia de NE.** Se muestra en geles SDS-PAGE al 10% los perfiles proteicos de la cepas 12656/12 (A) y F149<sup>T</sup> (B) de *G. anatis* en ausencia (carril 2) y presencia (carril 1) de 50  $\mu$ M de NE. Cada pozo contiene 15  $\mu$ g de proteína. La expresión diferencial de OMPs se señala mediante flechas negras.

También mediante corrimiento electroforético en geles SDS-PAGE al 10% fue evaluado el efecto que presentaba la adición de 50  $\mu\text{M}$  de NE sobre las OMPs de la cepa 12656/12 y F149<sup>T</sup> de *G. anatis*. Tras obtener el perfil correspondiente se observó en la cepa 12656/12 una expresión diferencial de proteínas en un rango que iba desde los 30 hasta los 240 kDa aproximadamente, induciéndose una sobreexpresión de proteínas que corresponden a los 37, 45, 55, 60, 75 y 150 kDa aproximadamente. También se reprimió la expresión de dos proteínas cuyo PM corresponde a los 175 y 200 kDa.

Para el caso de la cepa F149<sup>T</sup> de *G. anatis* se presentó un bandeo que iba de los 30 a los 80 kDa, la adición de NE al medio de cultivo indujo la expresión de 4 proteínas cuyos PM son de 48, 60, 70 y 72 kDa. A diferencia de la cepa 12656/12, en la cepa F149<sup>T</sup> no se observaron proteínas de alto PM.

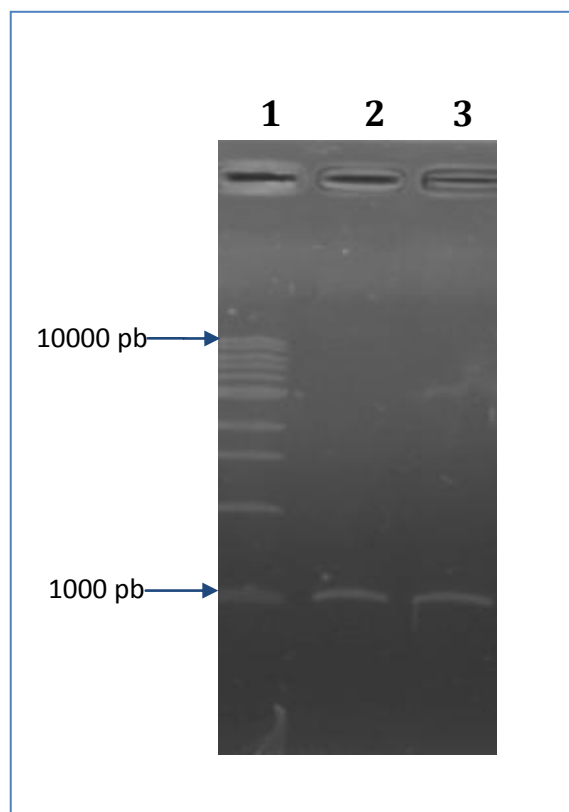
### 7.8 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE LAS CEPAS F149<sup>T</sup> Y 12656/12 DE *G. anatis*.



**Fig. 23. DNA genómico de *G. anatis*.** Se muestra un gel de agarosa al 1.2% donde se observa el DNA genómico extraído de las cepas F149<sup>T</sup> (carril 2) y 12656/12 (carril 3) de *G. anatis*. En el carril 1 se observa el marcador. Cada carril fue cargado con 3  $\mu$ l de muestra.

Mediante la técnica de Fenol-Cloroformo descrita por Sambrook y cols. se logró la extracción del DNA genómico de las cepas F149<sup>T</sup> y 12656/12 de *G. anatis*, el cual fue evidenciado mediante su corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.2%, obteniéndose 40  $\mu$ l de ADN genómico integro a una concentración de 209 ng/ $\mu$ l para la cepa 12656/12 y 40  $\mu$ l a 192 ng/ $\mu$ l (Fig. 23).

### 7.9 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *luxS* DE LAS CEPAS F149<sup>T</sup> Y 12656/12 DE *G. anatis*.



**Fig. 24. Probables genes *luxS* amplificados a partir de DNA genómico de *G. anatis*.** Gel de Agarosa al 1.2% Carril 1, Marcador de 1Kb. Carril 2 y 3 genes *luxS* de *G. anatis* cepas F149<sup>T</sup> y 12656/12, respectivamente.

Utilizando el ADN genómico de las cepas de *G. anatis* como templado y los oligos GluxS F y GluxS R para la cepa F149<sup>T</sup> y Luxsf y Luxsr para 12656/12, se amplificaron dos productos de aproximadamente 1000 pb (Fig. 24), empleando un termocycler CR Corbett Research®. Los amplicones fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Obteniéndose un producto de 1000 pb a una concentración de 98 y 102 ng/ $\mu$ l para F149<sup>T</sup> Y 12656/12 respectivamente.

## 7.10 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS *IN SILICO*

El producto de amplificación obtenido usando los oligos GluxS F y GluxS R (F149<sup>T</sup>) y Luxsf y Luxsr (12656/12) fue purificado con el kit QIAquick PCR Purification y posteriormente secuenciado en una secuenciador ABI3730XL, obteniéndose dos secuencias la primera con un tamaño de 758 pb correspondiente a *G. anatis* 12656/12, y la segunda de 863 pb para *G. anatis* F149<sup>T</sup>.

### A

```
ATGCAAACGCCTAAAGGCGATAAAAATTACGGTTTTTGGATCTTCGTTTTTGCAAACCGAATCAAGA  
CAATATCAGTCCGAAAGGTATTCACACTTTGGAACATCTTTTCGCCGGTTTTATGCGTGATCATC  
TCAATAGTGACAGCGTTGAAATTATTGATATTTACCAATGGGTTGCCGCACCGGATTTTATATG  
AGTTTAATCGGTACGCCTGCGGAACAACAAGTTGCTGCGGCGTGGGAAAAAGCAATGCAGGATGT  
ATTGTCGGTGAAAAGCGAAAAAGAGATCCCGGAATTAACCAATATCAATGCGGAACCTACACCG  
AACATTCGTTAGCGGATGCTCAGGCAGCAGCGAAAAAGGTGCTTGCTCAGGGAATCGGCATTAAT  
CACAATCAAGATTTATTACTTGATGACCGTTTAAAAAAAACCAGTAA
```

### B

```
TGGACCTCGCAGGCAGTGCAGCAGATGTTGTTTCACTCAATGTATCAGCTTGCACCGGCTGATCCG  
CGACGTAAGCTATTATTAGAACGTCTGCTTGGAAAAGCGGAGATAATTTGCATATTAATTCGCCG  
TTTTTCTGCGATTATGGCTTTAATATTGAAGTCGGCGACAATTTTTTTGCTAATCATCAATGCAC  
CATTTTGGACAGCGGCAAGGTTTCCATCGGTGATAATGTGATGTTTGCCCCTAATGTCAGTCTTT  
ATACGGTCCGGCATCCATTGCATTATCAGCAAAGAAATCAAGGCTATGAACAAGCAAAGGCAATT  
ATTATTAAGATAATGTCTGGATTGGCGGCAGCTGCGTGATTTTAGCGGAGTGACTATCGGTGA  
AAACAGCGTTATCGGTGCCGGCAGCGTAGTAACAAAATCGATTCCGGCAAACAGTTTAGCGTTCCG  
GCAACCTTGTCGGTAATTTCGAGAAATCAACGATCAGGAGCGTATACAGTATCAACAACCTGCTG  
GATCGCACTGTTTAA
```

Fig. 25. Secuencias nucleotídicas del gen *luxS*. A) Cepa F149<sup>T</sup> (438 pb) y B) 12656/12 (536) de *G. anatis*.



Estas secuencias fueron posteriormente analizadas con ayuda del programa ORF Finder del NCBI; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) encontrando dos posibles ORFs de 438 (Fig. 25a) y 536 pb (Fig. 25b) para F149<sup>T</sup> y 12656/12 respectivamente. Las secuencias de nucleótidos del gen *luxS* de las cepas F149<sup>T</sup> y 12656/12 de *G. anatis* fueron analizadas con el programa NCBI/Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), lo que nos permitió encontrar similitud y cobertura con genes *luxS* de otras bacterias. Ambas variedades presentaron en sus secuencias un 95% de identidad al ser comparadas con la secuencia reportada para un gen que codifica para una S-ribosylhomocisteínasa en *G. anatis* UMN 179, mientras que la cobertura fue de 96% para F149<sup>T</sup> (Tabla 6) y 97% para 12656/12 (Tabla 7). La secuencia generada para la cepa F149<sup>T</sup> mostró también valores de identidad menores con el gen *luxS* de *Shewanella sp.* MR-2 y MR-4 que codifica para un AI-2, así como también con el gen *luxS* de *Vibrio diazotrophicus* (Tabla 6).

*G. anatis* F149<sup>T</sup> (438pb)

No. Acceso		Cobertura	Identidad
CP002667.1	S-ribosylhomocysteinase <i>G. anatis</i> UMN179	96%	95%
CP000469.1	quorum-sensing autoinducer 2 (AI-2), LuxS <i>Shewanella sp.</i> MR-2	42%	78%
CP000446.1	quorum-sensing autoinducer 2 (AI-2) LuxS <i>Shewanella sp.</i> MR-4	42%	77%
HQ400989.1	S-ribosylhomocysteine lyase ( <i>luxS</i> ) <i>Vibrio diazotrophicus</i>	59%	74%

**Tabla 7. Secuencias de genes *luxS* que producen alineamientos significativos con la secuencia del gen *luxS* de la cepa F149<sup>T</sup> de *G. anatis*.** Se muestran los valores de cobertura, identidad y números de accesos a la base de datos NCBI.

*G. anatis* 12656/12 (536pb)

No. Acceso	Descripción	Cobertura	Identidad
CP002667.1	S-ribosylhomocysteinase <i>G. anatis</i> UMN179	97%	95%

**Tabla 8. Secuencia del gen *luxS* que produce alineamientos significativos con la secuencia del gen *luxS* de *G. anatis* 12656/12.** Se muestran los valores de cobertura, identidad y números de accesos a la base de datos NCBI.

Por medio del programa Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>), se llevo a cabo la traducción *in silico* de las secuencias nucleotídicas; obteniéndose un total de 145 aa. para F149<sup>T</sup> (Fig. 26a) y 174 aa. para 12656/12 (Fig. 26b).

### A

MQTPKGDKITVFDLRFCKPNQDNISPKGIHTLEHLFAGFMRDHLNSDSVEIIDISPMGCRTGFYMSL  
IGTPAEQQVAAAWEKAMQDVLVSKSEKEIPELNQYQCGTYTEHSLADAQAAAKKVLAQGIGINHN  
QDLLLLDDRLKKNQ.

### B

LAGSAADVSLNVSACTGSATAIIRTSAWKSGDNLHINSPFFCDYGFNIEVGDNFFANHQCTILDSG  
KVSIGDNVMFAPNVSLYTVGHPLHYQQRNQGYEQAKAIIKDNVWIGGSCVILGGVTIGENSVIGAG  
SVVTKSIPANSLAFGNPCRVIREINDQERIQQQLLDRTV

**Fig. 26. Secuencias obtenidas de la traducción *in silico* de las secuencias nucleotídicas de *G. anatis*.** A) cepa F149<sup>T</sup> B)12656/12.

En las Figs. 27 y 28 se observa el alineamiento de la secuencia de aa. de F149<sup>T</sup> y 12656/12 respectivamente con la secuencia de *luxS* de *G. anatis* UMN179. Nuevamente se realizó un análisis por BLAST donde se encontró un porcentaje de similitud de 96% con el gen que codifica para la proteína S-ribosylhomocisteínasa de *G. anatis* UMN179.

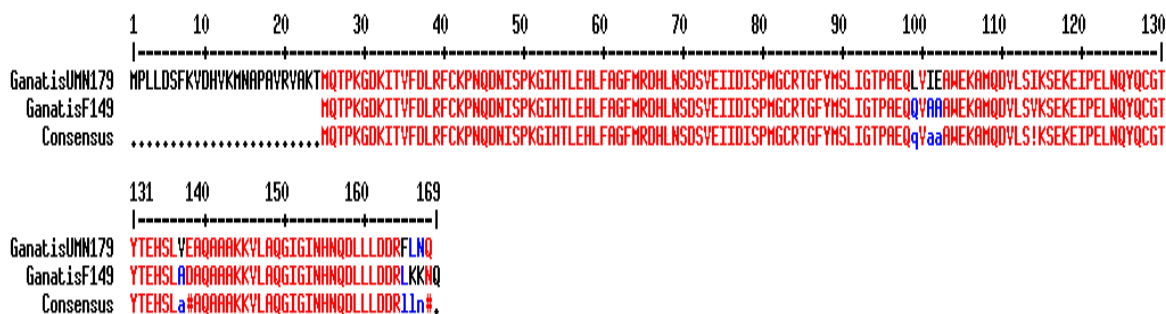


Fig. 27. Alineamiento de la secuencia de aa. del gen *luxS* de *G. anatis* F149<sup>T</sup> con *G. anatis* UMN179.

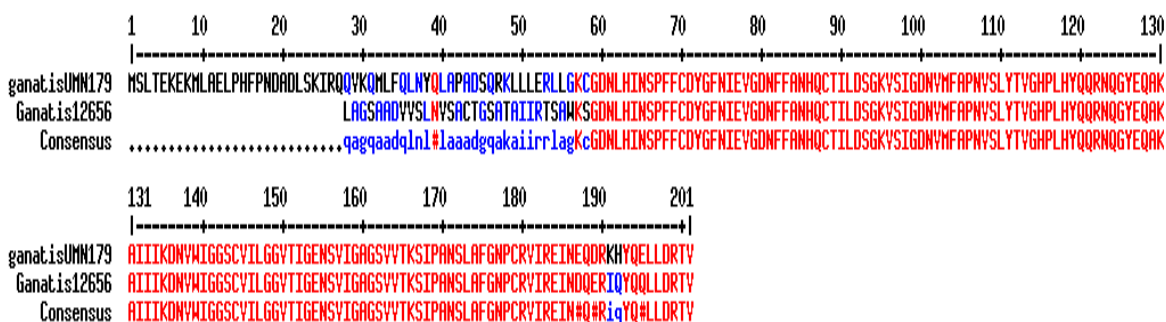


Fig. 28. Alineamiento de la secuencia de aa. del gen *luxS* de *G. anatis* 12656/12 con *G. anatis* UMN179.

A partir de las secuencias de aa. obtenidas y por medio del programa protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>) se obtuvo el peso molecular de las probables proteínas producidas por ambas cepas, obteniéndose una masa molecular de 18.64 kDa para *G. anatis* 12656/12 y de 16.17 kDa para F149<sup>T</sup>.

## 8. DISCUSIÓN

El QS es un mecanismo de comunicación bacteriana mediado por una gran variedad de moléculas señalizadoras, que está involucrado en la regulación de numerosas funciones y procesos celulares bacterianos (Bassler, 1999). Una de esas moléculas, el AI-2, presumiblemente facilita la comunicación inter-específica entre las bacterias que co-habitan un nicho ecológico (Xavier & Bassler, 2003).

En estudios previos se evaluó la presencia de AIs en los SNs de cultivos de diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Esto mediante ensayos de bioluminiscencia, donde se empleó como cepa reportera a *V. harveyi*, demostrando que *P. multocida*, *P. trehalosi*, *A. suis*, *A. pleuropneumoniae* y *M. haemolytica* A1 son capaces de producir y secretar moléculas que pueden estimular el sistema de QS encargado de regular la expresión del operon luciferasa en *V. harveyi*. Estudios semejantes donde se reporta la presencia de moléculas tipo AI-2 en SNs libres de células han sido efectuados en otros patógenos bacterianos como *Helicobacter pylori* (Forsyth and Cover, 2000), *Shigella flexneri* (Day Jr. and Maurelli, 2001), *Neisseria meningitidis* (Green *et al.*, 2001), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ( Barbieri *et al.*, 2011; Fong *et al.*, 2001), *Bacillus anthracis* (Bourgogne *et al.*, 2001), *Bacillus subtilis* (Das *et al.*, 2001) así como en un gran número de patógenos periodontales ( Chung *et al.*, 2001; Frias *et al.*, 2011).

En este estudio se evaluó el efecto de la adición de SNs filtrados de diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae* sobre la formación de biofilm de *G. anatis* F149<sup>T</sup>, como un método indirecto para determinar si *G. anatis* era capaz de producir y reconocer AIs propios y/o ajenos. Las cepas de *G. anatis* F149<sup>T</sup> y 12656/12 fueron capaces de formar biofilms en placas de poliestireno luego de 12h de incubación a 37°C, la cepa 12656/12 presentó una menor capacidad para formar biofilm respecto a la variedad no hemolítica, esto corresponde con lo reportado por Sánchez-Espinosa en el 2010, en sus ensayos de adhesión a placas de

poliestireno en los cuales, los valores más altos de adhesión los obtuvo la cepa F149<sup>T</sup>, mientras que 12656/12 mostró valores menores. Los resultados mostraron que tras la adición de SNs al medio de cultivo de *G. anatis*, se generaba un decremento en la producción de biofilm respecto al control (sin SNs), siendo más evidente en presencia de 10% de SNs de *G. anatis* 12656/12 o *Av. paragallinarum*, al incrementar el volumen de SN adicionado pudimos observar efectos más drásticos en la formación de biofilm, de particular interés resultó que los SNs que generaron una mayor disminución, fueron los provenientes de *A. paragallinarum* y *Gallibacterium anatis* 12656/12; microorganismos que infectan a los mismos hospederos que infecta la cepa F149<sup>T</sup> de *G. anatis*, pudiendo sugerir esto un sistema de comunicación mejor conservado entre especies que colonizan las mismas especies animales, en otras palabras que existe un reconocimiento de moléculas señalizadoras entre diferentes especies (AI-2) capaces de colonizar el mismo nicho ecológico.

Estos resultados contrastan con los realizados por González y colaboradores en el año 2006 quienes demostraron que el AI-2, señal del QS entre especies, estimuló la formación de biofilm en 5 diferentes cepas de *E. coli* (ATCC 25404, MG1655, BW25113, DH5 y JM109), crecida en dos diferentes medios (M9 citrato y LB) y en sistemas de flujo continuo y estacionario, esto para estudiar la formación del biofilm desde dos diferentes condiciones hidrodinámicas, así como también con los obtenidos por Yang *et al.*, en el 2003, quienes evaluaron el efecto de MCs de *E. coli* y de *Listeria innocua* sobre el crecimiento de esta última, demostrando que MCs provenientes de *E. coli* no tenían efecto sobre el crecimiento de *Listeria*, ya que solamente presentó diferencias en su crecimiento ante la adición de MC propios. Luego de realizar cinéticas de crecimiento de *G. anatis* en presencia y ausencia de SNs, se observó que la adición de estos disminuye ligeramente el crecimiento bacteriano, pudiendo ser esta la causa que origine la disminución en la formación de biofilm. Resultados semejantes fueron obtenidos por Yang *et al.*, quienes en el 2006, mostraron que existe un decremento en el crecimiento el cual es proporcional a un incremento en la adición de SNs obtenido de la especie *L. innocua*, debido a la presencia de metabolitos secundarios en el MC con diversas funciones esto es, como estimuladores del crecimiento o bien como inhibidores del crecimiento (Yang *et al.*, 2006).

Dado que los SNs podían presentar moléculas tóxicas o metabolitos secundarios, que interfirieran con los resultados obtenidos, se optó por el uso de moléculas químicamente puras, que actúan como AIs, y se evaluó nuevamente el efecto en la formación de biofilm, en este caso se emplearon las catecolaminas NE y E. Estas han sido motivo de numerosas investigaciones, debido a que su producción guarda estrecha relación con condiciones de estrés, que debilitan el sistema inmune y favorecen la infección (Freestone *et al.*, 2000).

Resultados obtenidos por Lu *et al.*, en el año en curso, demostraron mediante microarreglos y ensayos de formación de biofilm, que en el patógeno de cerdos *A. pleuropneumoniae*, la NE y la E regulaban la expresión del gen *pgaB* (involucrado en la formación de biofilm), no obstante dicha regulación, la formación de biofilm no se veía afectada por ninguna de las dos catecolaminas. En el microorganismo objeto del presente estudio se observó que la adición tanto de NE como de E, inducen un aumento en la formación de biofilm, en ambas cepas (hemolítica y no hemolítica), siendo dicho efecto más evidente en presencia de E. Este comportamiento es semejante al reportado por Bansal *et al.*, quienes en el 2007 evaluaron el efecto de la NE, E e indol en la expresión génica, quimiotaxis y colonización de *E. coli* O157:H7 (EHEC), encontrando que la NE y E aumentaban la motilidad y la formación de biofilm, mientras que el indol reprime estos fenotipos. Posteriormente mediante ensayos *in vitro* confirmaron que la NE y E aumentan también la adhesión a células HeLa S3, estos resultados en conjunto sugieren que la NE y E favorecen el proceso infeccioso en EHEC, debido a la semejanza en sus comportamientos frente a la NE y E, podríamos suponer que en *G. anatis*, la presencia en el medio de catecolaminas podría de manera similar a EHEC favorecer la infección, esto es, a través de la regulación positiva de aproximadamente 15 genes que codifican para factores de virulencia y formación de biofilm.

Sin embargo, los efectos de la NE y E sobre las bacterias no se limitan a adhesión, formación de biofilm o quimiotaxis, en trabajos realizados con la bacteria Gram positiva *S. epidermidis* se demostró que las catecolaminas inotropas comúnmente empleadas en las salas de cuidados intensivos eran capaces de estimular el crecimiento así como la formación de

biofilm por este microorganismo en materiales medicamente relevantes (Lyte *et al.*, 2003). Los efectos de las catecolaminas no se encuentran restringidos a las Gram positivas, algunos estudios han demostrado que especies de la familia *Enterobacteriaceae* (Gram negativa)(Roberts *et al.*, 2002 ;Freestone *et al.*, 2000; Lyte *et al.*, 1997; Lyte, 1992) incluyendo cepas patogénicas de seres humanos tales como *E. coli* 0157H7, pueden responder a las catecolaminas, incrementando la expresión de factores de virulencia, tales como adhesinas ( Lyte *et al.*, 1997).

En el presente estudio se evaluó el efecto sobre el crecimiento que se presentó al adicionar NE y E al medio de cultivo donde se crecieron por separado las cepas F149<sup>T</sup> y 12656/12 de *G. anatis*. Esta adición de catecolaminas generó un incremento en el crecimiento de *G. anatis* variedad hemolítica (12656/12), lo cual es congruente con experimentos previamente realizados en los cuales se afirma que la exposición de las bacterias Gram negativas a la NE estimula el crecimiento bacteriano *in vitro*, dado que dichas moléculas funcionan como AIs, el incremento generado en el crecimiento, podría sugerir que en este microorganismo el este proceso se encuentra regulado por quórum sensing( Neal *et al.*, 2001; Freestone *et al.*, 1999; Lyte *et al.*, 1997a; Lyte *et al.*, 1997b; Lyte *et al.*, 1996a; Lyte *et al.*, 1996b; Lyte *et al.*, 1993; Lyte *et al.*, 1992). Así como también con los realizados por Cooper y Evans en los cuales demostraron la habilidad de la E para incrementar el crecimiento *in vivo* y la virulencia de varias especies bacterianas tanto Gram positivas y como Gram negativas ( Lyte *et al.*, 2003).

En nuestros resultados observamos un mayor efecto en la estimulación del crecimiento bacteriano de la cepa 12656/12 ante la adición de NE, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Primrose y colaboradores quienes en el 2007 evaluaron el crecimiento inducido por diferentes concentraciones de ( 0-500  $\mu$ M) NE, E y dopamina en las enterobacterias *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella enterica* demostrando que la NE fue la catecolamina más potente en la estimulación del crecimiento en las tres especies evaluadas; por lo cual se especuló que la NE más que la E podría ser la señal

adrenérgica responsable de la comunicación molecular cruzada entre el hospedero y los patógenos entéricos. Un mecanismo sugerido para su actividad como estimulantes del crecimiento bacteriano es su capacidad de suministrar hierro a las bacterias *in vitro* e *in vivo*, a través de sus interacciones con lactoferrinas o transferrinas (Freestone *et al.*, 2000).

Esta adquisición de hierro por parte de bacterias podría estar involucrada en el crecimiento y/o la alteración en la expresión de genes por la activación de sensor quinasas que pueden además incrementar la motilidad u otras actividades requeridas para la colonización (Hughes *et al.*, 2009; Pullinger *et al.*, 2010; Reading *et al.*, 2010).

Debido a que los niveles de catecolaminas pueden variar de acuerdo al nivel de estrés, la localización del tejido y el ritmo circadiano, es difícil determinar las concentraciones exactas de dichas catecolaminas dentro de los tejidos y la sangre (Spencer *et al.*, 2010). Los fagocitos por ejemplo, son una fuente importante de estas moléculas, ya que las catecolaminas que derivan de ellos son capaces de potencializar la respuesta inflamatoria (Flierl *et al.*, 2007). Las niveles de catecolaminas pueden alcanzar concentraciones milimolares posteriores a su liberación por los fagocitos (Brown *et al.*, 2003).

Debido a esto, las concentraciones con las cuales se han trabajado los ensayos de evaluación del efecto de las catecolaminas sobre el crecimiento bacteriano son muy variadas, por ejemplo en los estudios efectuados por Naresh y Hampson en el 2010 con la bacteria *Brachyspira pilosicoli* (patógena de aves y mamíferos incluido el ser humano), mostraron que el incremento significativo en el crecimiento bacteriano se presentaba luego de la adición al medio de NE 0.05mM. Primrose *et al.* 2007, por su parte, tras evaluar diferentes concentraciones determinaron que la estimulación más notable del crecimiento se presentaba empleando una concentración de 100  $\mu$ M de NE, sin embargo nosotros observamos diferencias evidentes en el crecimiento entre el control (sin catecolaminas) y las muestras suplementadas con NE y E al trabajar con una concentración de 50  $\mu$ M tanto para NE como para E. Esta concentración ha sido empleada para evaluar los mismos efectos, en estudios realizados con el patógeno respiratorio *Bordetella bronchiseptica*



(Anderson and Armstrong, 2008; 2006). Debido a los bajos niveles de estas catecolaminas *in vivo*, la concentración empleada en este trabajo, es por tanto, biológicamente relevante.

Dado que en los últimos años se ha descrito la presencia de uno o más sistemas de QS dentro de una misma especie, y ya que el AI-3 ha sido reportado como un componente de MC, se evaluó el efecto que este generaba en la formación de biofilm. En ambas cepas la adición de MC DMEM indujo una disminución en la formación de biofilm, este comportamiento es semejante al reportado por Yang *et al.*, quienes en el 2006, demostraron que se presentaba un decremento en el crecimiento tras la adición de SNs provenientes de MC. Esta disminución fue proporcional a la cantidad adicionada de MC obtenidos de la especie *Lysteria innocua*. Un aspecto de interés lo constituye el que los cambios se presentaron con la adición de MC obtenidos en tiempos próximos a la fase estacionaria, consistente con un fenómeno dependiente de QS o de densidad celular. La diferencia en los efectos generados por las catecolaminas (NE y E) y los MCs podría estar debida a la presencia de varios sistemas de regulación diferentes dentro del mismo microorganismo, como ha sido descrito para bacterias como *V. harveyi* (Bassler, 1999).

Debido a que la adhesión es necesaria para muchos aspectos del modo de vida bacteriano, incluyendo la adherencia a superficies bióticas y abióticas, la interacción bacteria-bacteria y la formación de biofilm, y ya que en general, se asume que cualquier antígeno de la superficie bacteriana que tenga una conformación estereoquímica, perfil hidrofóbico y carga neta electrostática complementaria con las estructuras de membrana de su célula blanco puede funcionar como adhesinas (Jaramillo, 1998) en este estudio se evaluó la expresión diferencial de OMPs y su relación con la formación de biofilm.

Previamente Danese *et al.* 2000, demostraron la participación de la OMP de *E. coli* ZK2686, conocida como el antígeno 43, en las interacciones célula-célula en los biofilms formados por esta bacteria, demostrando que las células deficientes en la producción de Ag43 no presentaban la capacidad de formar biofilms en medios mínimos en glucosa, ya que aunque tenían la capacidad de formar conglomerados no lograban la maduración del biofilm.

En el presente trabajo mediante corrimiento electroforético de las muestras en geles SDS-PAGE al 10% se analizó la expresión diferencial de OMPs de *G. anatis* F149<sup>T</sup> y 12656/12 en presencia y ausencia de NE y E (moléculas con actividad de AI). Siendo de particular interés la proteínas inducidas *de novo* o bien aquellas que presentaron una sobreexpresión.

Estudios semejantes en los cuales las OMPs presentaban un papel determinante en la formación de biofilm, lo constituyen los realizados por Vidal y cols. en 1998, quienes tras aislar una mutante de OmpR de *E. coli* K-132 descubrieron que está presentaba la capacidad de formar biofilm en superficies inertes ( vidrio y poliestireno), presumiblemente mediante un incremento en la producción de curli, demostrando que el curli es una de las estructuras morfológicas de mayor importancia en la colonización de superficies, así como también que la formación de biofilm esta controlada por un sistema regulatorio de dos componentes EnvZ-OmpR.

En el caso de *G. anatis* F149<sup>T</sup> la E indujo la expresión *de novo* (40, 50 y 150 kDa) y la sobreexpresión (26, 30 y 55 kDa,) de OMPs. Mientras que en la cepa 12656/12 se indujeron 2 OMPs *de novo* (los 50 y 149 kDa) y se sobreexpresaron 3 proteínas más, de aprox 36, 47 y 50 kDa). Tanto en la variedad hemolítica como en la no hemolítica la presencia de E en el medio induce la expresión de dos proteínas de PM semejantes (50 y 150 kDa), que podrían ser compartidas dentro del género *Gallibacterium*. La NE indujo en la cepa 12656/12 la sobreexpresión de 6 proteínas que corresponden a los 37, 45, 55, 60, 75 y 150 kDa, mientras que en la variedad no hemolítica únicamente 4 proteínas cuyos PM son de 48, 60, 70 y 72 kDa. A pesar de que no se logró la identificación de ninguna de las OMPs inducidas *de novo*, no se puede descartar la posible participación alguna de ellas en la formación del biofilm de *G. anatis*, ya que su expresión inducida únicamente bajo la adición de catecolaminas es congruente con el aumento en la formación de biofilm evaluada previamente en presencia de estas moléculas.

Adicionalmente a los resultados previamente descritos, en este trabajo se identificó la presencia de un homólogo del gen *luxS*, en los genomas de *G. anatis* cepas F149<sup>T</sup> y 12656/12; reportes de homólogos de dicho gen han sido descritos en el genoma de *P. multocida* (homólogo de *luxS*) y de *H. influenzae* (homólogo de *luxQ*) (Armbruster *et al.*,

2009), esto es consistente con lo sugerido por Bassler *et al.*, 1999, quienes argumentan la presencia de sistema de QS mediado por AI-2 en una amplia variedad de microorganismos. Este AI-2 en los sistemas de QS reportados ha sido descrito como un subproducto de la interconversión de S-ribosylhomocisteína a Homocisteína durante el ciclo de la S-Adenosil metionina. Dado que la proteína codificada por el gen *luxS* es la encargada de esta interconversión, la presencia de un gen *luxS* en el genoma de *G. anatis*, sugiere que de ser este un gen funcional, dicho microorganismo podría realizar la interconversión previamente descrita y por lo tanto generar como subproducto dihidroxipentanodiona (DPD), precursora del AI-2. Por lo tanto la presencia de *luxS* facultaría a *G. anatis* para realizar QS, pudiendo estar este proceso involucrado en la regulación de numerosos procesos bacterianos como se ha descrito en otros microorganismos. Para corroborar esta posibilidad, sería adecuado evaluar la participación en QS del gen *luxS* de *G. anatis* y su participación en la regulación de determinantes de virulencia. En este estudio sin embargo no se determinó la funcionalidad de dicho gen.

Los resultados del análisis por BLAST de las secuencias de los genes *luxS* obtenidos para ambas variedades de *G. anatis*, mostraron un 96% de identidad con la proteína S-ribosylhomocysteinasas de *G. anatis* UMN179, perteneciente a la familia de las *LuxS*, estas proteínas también han sido identificadas en los genomas de *P. multocida subsp. multocida* (Acceso NC\_002663.1), *H. influenzae* (Acceso NC\_000907.1), *A. pleuropneumoniae* serovar 5b cepa L20 (Acceso NC\_009053.1), *M. succiniproducens* MBEL55E (Acceso NC\_006300.1), *H. ducreyi* 3500HP (Acceso NC\_002940.2), *H. somni* 129PT (Acceso NC\_008309.1), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ANH9381 (Acceso NC\_016513.1) y *A. succinogenes* 130Z (Acceso NC\_009655.1), por lo general corresponden a proteínas formadas por un número variable de aa. que va de 126- 168 aa., presentándose algunas excepciones como lo constituye la S-ribosylhomocysteinasas de *P. multocida subsp. multocida* cepa Anand1 (Acceso NZ\_ALBX01001153.1 con apenas 90 aa. Estos resultados corresponden con los obtenidos en el presente trabajo en el cual la traducción de la secuencia nucleotídica nos dio una proteína de 145 aa. para la cepa F149<sup>T</sup> y 174 aa. para 12656/12, siendo esta última ligeramente más grande que el promedio reportado para otros miembros de la familia (168 aa.)(Acceso NC\_002663.1, NC\_008309.1, NC\_006300.1).

## 9. CONCLUSIONES

- La adición al medio de E y NE produjo un incremento en la formación de biofilm en ambas variedades de *G. anatis*, por lo que estas moléculas podrían estar funcionando como AIs y regulando la expresión de genes asociados a la formación de biofilm.
- La adición de SNs y MC al medio indujo una disminución en la formación de biofilm presumiblemente por una disminución en el crecimiento bacteriano.
- Los genomas de las cepas F149<sup>T</sup> y 12656/12 de *G. anatis* poseen un gen *luxS*.
- La traducción de la secuencia nucleotídica de ambas variedades de *G. anatis*, mostraron un 96% de homología con la proteína S-ribosylhomocysteinasa de *G. anatis* UMN179, perteneciente a la familia de las *LuxS*.

## 10. PERSPECTIVAS

- Determinar si el gen *luxS* presente en los genomas de las cepas F149<sup>T</sup> y 12656/12 es funcional
- Diseñar mutantes para el gen *luxS* de las cepas F149<sup>T</sup> y 12656/12 y evaluar el efecto de dicha mutación en la formación de biofilm, crecimiento y expresión de OMPs.
- Determinar si *G. anatis* produce un AI.
- Purificar y caracterizar el AI en ambas cepas.
- Realizar un análisis *in silico* para determinar si *G. anatis* presenta un gen (*luxP*) que codifique para la proteína en membrana que funciona como receptor del AI.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

**Addo, P.B. and K. Mohan.** 1984. Atypical *Pasteurella haemolytica* Type A from poultry. Avian Dis 29:214-217.

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

**Anderson, M.T. and S.K. Armstrong.** 2006. The *Bordetella* bfe system: growth and transcriptional response to siderophores, catechols, and neuroendocrine catecholamines. J Bacteriol 188:5731-5740.

**Antunes, L.C., Schaefer, A.L., Ferreira, R.B., Qin, N., Stevens, A.M., Ruby, E.G. and E.P. Greenberg.** 2007. Transcriptome analysis of the *Vibrio fischeri* *LuxR-LuxI* regulon. J Bacteriol 189:8387-8391.

**Antunes, L.C. and R.B. Ferreira.** 2009. Intercellular communication in bacteria. Crit Rev Microbiol 35:69-80.

**Armbruster, C.E., Hong, W., Pang, B., Dew, K.E., Juneau, R.A., Byrd, M.S., Love, C.F., Kock, N.D. and E. Swords.** 2009. LuxS promotes biofilm maturation and persistence of nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo via modulation of lipooligosaccharides on the bacterial surface. Infect Immun 77:4081-4091.

**Bansal, T., Englert, D., Lee, J., Hedge, M., Wood, T.K. and A. Jayaraman.** 2007. Differential effects of Epinephrine, Norepinephrine, and Indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization and gene expression. Infect Immun 75:4597-4607.

- Barbieri, B., Spratt, D., Wilson, M. and R. McNab.** 2001. *Quorum sensing* in the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. In: ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria, Snowbird, Utah, abstract 52.
- Bassler, B.L.** 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by *quorum sensing*. *Curr Opin Microbiol* 2:582-587.
- Bisgaard, M., Korczak, B.M., Busse H.J., Kuhnert, P., Bojesen, A.M. and H. Christensen.** 2009. Classification of the taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard within *Gallibacterium melopsittaci* sp. nov., *Gallibacterium trehalosifermentans* sp. nov. and *Gallibacterium salpingitidis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:735-744.
- Bisgaard, M.** 1993. Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. *Zentralbl Bakteriol* 279:7-26.
- Bisgaard, M.** 1977. Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis. Characterisation of 213 strains. *Avian Pathol* 6:285-292.
- Blackall, P.J., Rogers, D.G., Busse, H., Kuhnert, P., Bojesen, A.M. and H. Christensen.** 1990. Outer Membrane Proteins of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 34:2737-2740.
- Bourgogne, A.D. and T.M. Koehler.** 2001. *Bacillus anthracis* harbors a functional orthologue of luxS, a gene essential for autoinducer-2 activity. In: 101st ASM General Meeting, Orlando, FL, abstract B-385.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

- Brown, S.W., Meyers, R.T., Brennan, K.M., Rumble, J.M., Narasimhachari, N., Perozzi, E.F., Stewart, J.K. and K. Fischer-Stenger.** 2003. Catecholamines in a macrophage cell line. *J Neuroimmunol* 135: 47-55.
- Christensen, H., Bisgaard, M., Bojesen, A.M., Muttters, R. and J.E. Olsen.** 2003. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitidis* or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 275-287.
- Chung, W.O., Park, Y., Lamont, R.J., McNab, R., Barbieri, B. and D.R. Demuth.** 2001. Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a LuxS protein. *J Bacteriol* 183:3903-3909.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and E.P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
- Costerton, J.W.** 1995. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15:137-140.
- Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W. and F. Götz.** 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 67: 5427-5433.
- Crespi, B.J.** 2001. The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in Ecol Evol* 16:178-183.
- Danese, P.N., Pratt, L.A., Dove, S.L. and R. Kolter.** 2000. The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 37:424-432.



- Das, S.K., Sedelnikove, S.E., Baker, P.J., Ruzheinikov, S.N., Foster, S., Hartley, A., Horsburgh, M.J. and D.W. Rice.** 2001. Cloning, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Bacillus subtilis* LuxS. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 57:1324-1325.
- Day Jr., W.A. and A.T. Maurelli.** 2001. *Shigella flexneri* LuxS quorum-sensing system modulates *virB* expression but is not essential for virulence. Infect Immun 69:15-23.
- Dickschat, J.S.** 2010. Quorum sensing and bacterial biofilms. Nat Prod Rep 27:343-369.
- Flierl, M.A., Rittirsch, D., Nadeau, B.A., Chen, A.J., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., McGuire, S.R., List, R.P., Day, D.E., Hoesel, L.M., Gao, H., Van Rooijen, N., Huber-Lang, M.S., Neubig, R.R. and P.A. Ward.** 2007. Phagocyte derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. Nature 449:721–725.
- Fong, K.P., Gao, L, and D.R. Demuth.** 2003. *luxS* and *arcB* control aerobic growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* under iron limitation. Infect Immun 71: 298–308.
- Fong, K.P., Chung, W.O., Lamont, R.J. and D.R. Demuth.** 2001. Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* luxS. In: ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria, Snowbird, Utah, abstract 56.
- Forsyth, M.H. and T.L. Cover.** 2000 Intercellular communication in *Helicobacter pylori*: luxS is essential for the production of an extracellular signaling molecule. Infect Immun 68:3193-3199.
- Fredheim, E.G., Klingenberg, C., Rodhe, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flaegstad, T. and J.E. Sollid.** 2009. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. J Clin Microbiol 47:1172-1180.

- Freestone, P.P.E., Haigh, R.D., Williams, P.H. and M. Lyte.** 2007. Specificity of catecholamine-induced growth in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*. FEMS Microbiol Lett 269:221-228.
- Freestone, P.P.E., Haigh, R.D., Williams, P.H. and M. Lyte.** 1999. Stimulation of bacterial growth by heat-stable norepinephrine- induced autoinducers. FEMS Microbiol Lett 172:53-60.
- Frias, J., Ollie, E. and M. Alsina.** 2001. Periodontal pathogens produce *quorum sensing* signal molecules. Infect Immun 69:3431-3434.
- Frey, J. and P. Kuhnert.** 2002. RTX toxins in *Pasteurellaceae*. Int J Med Microbiol 292:149-158.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and E.P. Greenberg.** 1994. *Quorum sensing* in bacteria: the *LuxR-LuxI* family of cell density-responsive transcriptional regulators. J Bacteriol 176:269-275.
- Galloway, W.R.J.D., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M. and D.R. Spring.** 2011. *Quorum Sensing* in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and AI-2 *Quorum Sensing* Pathways. Chem Rev 111:28-67.
- García-Gómez E., Vaca S., Pérez-Méndez A., Ibarra-Caballero J., Pérez-Márquez V., Tenorio V.R. and E. Negrete-Abascal.** 2005. *Gallibacterium anatis*-secreted metallo proteases degrade chicken IgG. Avian Pathol 34: 426-429.

- González, A.F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W.E. and T.K. Wood.** 2006. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a Novel Motility Quorum-Sensing Regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol* 188:305-316.
- Gospodarek, E., Bogiel, T., and P. Zalas-Wiecek.** 2009. Communication between microorganisms as a basis for production of virulence factors. *Pol J Microbiol* 58:191-198.
- Green, A.D., Winzer, K., Delaroy, M., Sun, Y., Blackley, D., Hardie, K.R., Tang, C. and T. Baldwin.** 2001. Synthesis of autoinducer-2 depends on LuxS in *Neisseria meningitidis*. In: ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria, Snowbird, Utah, abstract 64.
- Häse, C.H. and R.A. Finkelstein.** 1993. Bacterial extracellular Zinc-containing metalloproteases. *Microbiol Rev* 57:823-837.
- Hughes, D.T., Clarke, M.B., Yamamoto, K., Rasko, D.A and V. Sperandiosha.** 2009. The *QseC* adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). *PLoS Pathog* 5(8):e1000553.
- Hultgren, S.J., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., St Geme, J.W. 3rd and S. Norman.** 1993. Pilus and non-pilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 73:887-901.
- Jansen, R., Briaire, J., Smith, H.E., Dom, P., Haesebrouck, F., Kamp, E.M., Gielkens, A.L. and M.A. Smits.** 1995. Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. *Infect Immun* 63:27-37.

- Jaramillo-Meza, L.** 1998. Aislamiento de una hemaglutinina de *Pasteurella haemolytica* A1 y el estudio de su especificidad por carbohidratos. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UNAM.
- Kristensen, B.M., Frees, D. and A.M. Bojensen.** 2011. Expression and secretion of the RTX-toxin GtxA among members of the genus *Gallibacterium*. *Vet Microbiol* 153:116-123.
- Kristensen M.B., Frees D. and A.M. Bojesen.** 2010. GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organization. *Vet Res* 4:1-25.
- Kristensen, M.B., Frees, D. and M.A. Bojesen.** 2009 GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organization. *Vet Res* 4:1-25.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams P., and A. Lazdunski.** 1996. A hierarchical quorum sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21:1137-1146.
- Li, L., Zhou, R., Li, T., Kang, M., Wan, Y., Xu, Z. and Z. Chen.** 2008. Enhanced biofilm formation and reduced virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* luxS mutant. *Microb. Pathog.* 45:192-200.
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E.P. and P.A. Sokol.** 1999. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the *LuxRI* homologs *CepRI*. *J Bacteriol* 181:748-756.
- Lyte, M., Freestone, P.P.E., Neal, C.P., Olson, B.A., Haigh, R.D., Bayston, R. and P.H. Williams.** 2003. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *Lancet* 361:130-135.

- Lyte, M. and M.T. Bailey.** 1997a. Neuroendocrine-bacterial interactions in a neurotoxin-induced model of trauma. *J Surg Res* 70:195–201.
- Lyte, M., Erikson A.K., Arulanandam, B., Frank, C.D., Crawford, M.A. and D.H. Francis.** 1997b. Norepinephrine-Induced expression of the K99 pilus adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Comm* 232:682–686.
- Lyte, M., Frank, C.D. and B.T. Green.** 1996a. Production of an autoinducer of growth by norepinephrine cultured *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Micro Lett* 139:155–160.
- Lyte, M., Arulanandam, B.P. and C.D. Frank.** 1996b. Production of shigela-like toxins by *Escherichia coli* O157:H7 can be influenced by the neuroendocrine hormone norepinephrine. *J Lab Clin Med* 128:392–398.
- Lyte, M.** 1993. The role of microbial endocrinology in infectious disease. *J Endocrinol* 137:343–345.
- Lyte, M. and S. Ernst.** 1992. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci* :203–213.
- Malott, R.J. and R.Y.C. Lo.** 2002. Studies on the production of *quorum-sensing* signal molecules in *Mannheimia haemolytica* A1 and other *Pasteurellaceae* species. *FEMS Microbiol Lett* 206:25–30.
- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S. and P. Williams.** 1997. *Quorum sensing* and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol* 143:3703-3711.

- Miller, C.H. and J.A. Duerre.** 1968. S-ribosylhomocysteine cleavage enzyme from *Escherichia coli*. J Biol Chem 243:92-97.
- Miyoshi, S. and S. Shinoda.** 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. Microbes Infect 2:91-98.
- Montes-García, J.F.** 2012. Determinación de condiciones de movilidad in vitro de *Gallibacterium anatis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.
- Morohoshi, T., Yokoyama, Y., Ouchi, M., Kato, N. and T. Ikeda.** 2009. Motility and the expression of the flagellin protein FliC are negatively regulated by *quorum sensing* in *Edwardsiella tarda*. J Biosci Bioeng. 108:314-318.
- Mráz, O., Vladík, P. and J. Boháček.** 1976. *Actinobacilli* in Domestic Fowl. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg 236:294-307.
- Mushin, R., Weisman, Y. and N. Singer.** 1980. *Pasteurella haemolytica* found in respiratory tract of fowl. Avian Dis 24:162-168.
- Naresh, R. and D.J. Hampson.** 2010. Attraction of *Brachyspira pilosicoli* to mucin. Microbiology 156:191-197.
- Neal, C.P., Freestone, P.P., Maggs, A.F., Haigh, R.D., Williams, P.H. and M. Lyte.** 2001. Catecholamine inotropes as growth factors for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *staphylococci*. FEMS Microbiol Lett 194:163-169.
- Nedvidek, W., Ledl, F. and P. Fischer.** 1992. Detection of 5-hydroxymethyl-1-2-methyl-3(2H)-furanone and of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in reaction mixtures of hexoses and pentoses with different amines. Z Lebensm Unters Forsch 194:222-228.

- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V.R. and M. De la Garza.** 1999. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Curr Microbiol* 38:64-67.
- Negrete-Abascal, E., Salgado-Lucio, M.L. and S. Vaca.** 2011a. *Gallibacterium anatis* express fimbriae. In: International *Pasteurellaceae* Conference, Elsinore, Den. University of Copenhagen. Poster 43.
- Negrete-Abascal, E., Montes García F. and S. Vaca.** 2011b. Expression of amyloid proteins type curli by *Gallibacterium anatis*. In: International *Pasteurellaceae* Conference, Elsinore, Den. University of Copenhagen. Poster 44.
- Otero Casal, A.M., Muñoz Crego, A., Bernárdez Hermida, M.I., Fábregas Casal, J.** 2005. *Quorum Sensing* : El lenguaje de las bacterias. Editorial Acirbia, S. A. Zaragoza.
- Parsek, M. and E.P. Greenberg.** 2000. Acyl-homoserine lactone *quorum sensing* in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci* 97: 8789-8793.
- Pereira, C.S., Thompson, J.A. and K.B. Xavier.** 2012. AI-2 mediated signaling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 19:1-26.
- Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart.** 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124:715-727.
- Pullinger, G.D., Carnell, S.C., Sharaff, F.F., Van Diemen, P.M., Dziva, F., Morgan, E., Lyte, M., Freestone, P.P. and M.P. Stevens.** 2010. Norepinephrine augments *Salmonella enterica*-induced enteritis in a manner associated with increased net replication but independent of the putative adrenergic sensor kinases QseC and QseE. *Infect Immun* 78:372-380.

- Rambow-Larsen AA, Rajashekara G, Petersen E, Splitter G.2008.** Putative *quorum-sensing* regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J Bacteriol.* 190(9):3274-3282.
- Ramsay, J.P., Williamson, N.R., Spring, D.R. and G.P. Salmond.** 2011. A *quorum-sensing* molecule acts as a morphogen controlling gas vesicle organelle biogenesis and adaptive flotation in an enterobacterium. *Proc Natl Acad Sci* 108:14932-14937.
- Reading, N.C., Rasko, D., Torres, A.G. and V. Sperandio.** 2010. A transcriptome study of the *QseEF* two-component system and the *QseG* membrane protein in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *Microbiol* 156:1167-1175.
- Salgado Lucio, M.L., Vaca, S., Vázquez, C., Zenteno, E., Pérez-Márquez, V.M., Rea, I. and E. Negrete Abascal.** 2012. Adhesion of *Gallibacterium anatis* to chicken oral-pharyngeal epithelial cells and identification of putative fimbriae. *Advances in Microbiol*
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Schaefer, A.L., Val, D.L., Hanzelka, J.E., Cronan, J. y E.P. Greenberg.** 1996. Generation of cell-to-cell signals in *quorum sensing*: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri LuxI* protein. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 93:9505-9509.
- Schauder, S. and B.L. Bassler.** 2001. The languages of bacteria. *Genes Dev* 15:1468-1480.
- Shaw, D. P., Cook, D. B., Maheswaran, K., Lindeman, C. J., and D. A. Halvorson.**1990. *Pasteurella haemolytica* as a co-pathogen in pullets and laying hens. *Avian Dis* 34:1005-1008.



- Spencer, H., Karavolos, M.H., Bulmer, D.M., Aldridge, P., Chhabra, S.R., Winzer, K. and C.M.A. Khan.** 2010. Genome-wide transposon mutagenesis identifies a role for host neuroendocrine stress hormones in regulating the expression of virulence genes in *Salmonella*. *J Bacteriol* 192:714–724.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P. and J.B. Kaper.** 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci* 100:951-956.
- Sperandio, V., Torres, A.G. and J.B. Kaper.** 2002. *Quorum sensing Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by *quorum sensing* in *E. coli*. *Mol Microbiol* 43:809-821.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Girón, J.A. and J.B. Kaper.** 2001. *Quorum sensing* is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* EHEC O157:H7. *J Bacteriol* 183: 5187–5197.
- Suzuki, T., Ikeda, A., Shimada, J., Yanagawa, Y., Nakazawa, M. and T. Sawada.** 1996. Isolation of *Actinobacillus salpingitidis* / avian *Pasteurella haemolytica*-like organisms from diseased chickens. *J Jpn Vet Med Assoc* 49:800-804.
- Tascon, R.I., Vazquez-Boland, J.A., Gutierrez-Martin, C.B., Rodriguez-Barbosa, I. and E.F. Rodriguez-Ferri.** 1994. The RTX haemolysins *ApxI* and *ApxII* are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol Microbiol* 14:207–216.
- Tatum, F.M., Briggs, R.E., Sreevatsan, S.S., Zehr, E.S., Ling, Hsuan S., Whiteley, L.O., Ames, T.R. and S.K. Maheswaran.** 1998. Construction of an isogenic leukotoxin deletion mutant of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: characterization and virulence. *Microb Pathog* 24:37–46.

- Thanassi, D.G.** 2011. The long and the short of Bacterial Adhesion Regulation. *J Bacteriol* 193: 327-328.
- Vaca, S., Monroy, E., Rojas, L., Sánchez, P., Soriano-Vargas, E., Bojesen A.M. and E. Negrete-Abascal.** 2011. Adherence of *Gallibacterium anatis* to inert surfaces. *J Anim Vet Adv* 13:1688-1693.
- Van der Vinne, A.N., Lo, R.Y. and P.E. Shewen.** 2005. Construction and analysis of a *Mannheimia haemolytica* A1 luxS mutant. *Vet Microbiol* 110:53-66.
- Vendeville, A., Winzer, K., Heurlier, K., Tang, C.M. and K.R. Hardie.** 2005. Making “sense” of metabolism: Autoinducer-2, *LuxS* and Pathogenic Bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3:383-396.
- Vidal, O., Longin, R., Prigent-combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M. and P. Lejeune.** 1998. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J Bacteriol* 180:2442-2449.
- Watson, W.T., Minogue T. D., Val, D.L, von Bodman, S.B. and M.E. Churchill.** 2002. Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol Cell* 9:685-694.
- Winzer, K., Hardie, K.R. and P. Williams.** 2003. *LuxS* and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Adv Appl Microbiol* 53:291-396.
- Winzer, K., Hardie, K.R. and P. Williams.** 2002. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now-gone to lunch! *Curr Opin Microbiol* 5:216-222.

- Xavier, K.B. and B.L. Bassler.** 2003. *LuxS quorum sensing: more than just a numbers game.* Curr Opin Microbiol 6:191-197.
- Yang, L., Portugal, F. and W.E. Bentley.** 2006. Conditioned Medium from *Listeria innocua* Stimulates Emergence from a Resting State: Not a Response to *E. coli* Quorum Sensing Autoinducer AI-2. Biotechnol Prog 22:387-393.
- Zepeda, A., Ramírez, S., Vega, V., Morales, V., Talavera, M., Salgado-Miranda, C., Simón-Martínez, J., Bojesen A.M. and E. Soriano-Vargas.** 2009. Hemagglutinating activity of *Gallibacterium* Strains. Avian Dis 53:115-118.