



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *fur* DE *Actinobacillus suis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

G. YMURI RIVERA RAMOS.

DIRECTOR DE TESIS: DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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

## INDICE.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Familia <i>Pasteurellaceae</i>	2
Género <i>Actinobacillus</i>	2
<i>Actinobacillus suis</i>	3
FACTORES DE VIRULENCIA	5
Colonización	6
Cápsula (CPS)	6
Lipopolisacáridos (LPS)	7
Toxinas	8
PROTEASAS	9
Clasificación de las Proteasas	9
Mecanismo de acción de las metaloproteasas	10
IMPORTANCIA DEL HIERRO	10
PROTEÍNA FUR	13
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18

OBJETIVOS PARTICULARES	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
Crecimiento bacteriano	19
Aislamiento del DNA cromosómico de <i>A. suis</i> y amplificación del probable gen <i>fur</i>	19
Clonación del producto de PCR y selección de las clonas transformantes	19
Análisis <i>in silico</i>	20
RESULTADOS	21
Aislamiento del ADN cromosómico de <i>Actinobacillus suis</i>	21
PCR	21
Secuenciación	23
Alineamiento múltiple del gen <i>fur</i> de <i>Actinobacillus suis</i>	24
Alineamiento múltiple de la proteína Fur de <i>Actinobacillus suis</i>	25
Clonación	26
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30

## RESUMEN

*Actinobacillus suis* es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* considerada uno de los principales agentes patógenos del tracto respiratorio superior de animales bovinos y porcinos. Este microorganismo obtiene el hierro necesario para su crecimiento de las transferrinas y hemoglobina del hospedero. El hierro es esencial para el metabolismo crecimiento bacteriano, ya que actúa como cofactor de un gran número de enzimas. Fur (ferric uptake regulatos) es una proteína autorregulable que responde a la concentración de hierro en el medio y que actúa como represor transcripcional de promotores regulados por hierro, contiene un motivo de unión al ADN y 2 sitios de unión con el hierro. Los genes regulados por la proteína Fur constituyen el llamado regulón Fur, cuya mayor parte está implicada en la captación de hierro. En *A. suis* se ha demostrado la presencia de genes y proteínas involucradas en captación de hierro a través de transferrina porcina y hemoglobina. En el presente trabajo por medio de PCR se obtuvo un amplificado de 477 pb, utilizando ADN cromosómico de *A. suis* como templado y los oligonucleótidos previamente diseñados para el gen *fur* de *Avibacterium paragallinarum*. La secuencia de aminoácidos obtenida presentó un 90% de similitud con las secuencias reportadas para genes *fur* de *A. pleuropneumoniae*, *A. pleuroneumoniae* L20 y *Av. paragallinarum*. La secuencia traducida dio como resultado una proteína de 154 aminoácidos, con un peso molecular de 17850.3 Daltones y un PI teórico de 5.33. Esta secuencia conserva los dominios de unión al DNA y de hierro típicos de las proteínas Fur descritas en diferentes microorganismos. *A. suis* contiene en su genoma un gen *fur* el cual puede participar en captación de hierro y regulación de la expresión de diferentes genes relacionados con virulencia.

## INTRODUCCIÓN.

### **FAMILIA *Pasteurellaceae*:**

La clasificación de esta familia se llevaba a cabo en base a una serie de características fenotípicas determinadas, tal es el caso del requerimiento de Nicotidamina Adenín Dinucleótido (NAD ó factor V y hemina o factor X) como factores de crecimiento y por su capacidad de causar enfermedades a vertebrados, principalmente a mamíferos y aves (MacInnes & Borr, 1990. Moller & Killan, 1990).

La familia *Pasteurellaceae* estaba inicialmente compuesta por 4 géneros principales: *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Pasteurella* y *Mannheimia*, aunque recientemente se han incluido nuevos géneros como son: *Lonepinella*, *Gallibacterium*, *Phocoenobacter*, *Avibacterium*, *Histophilus* y *Volucribacter*, entre otros. Todos estos constituyen patógenos importantes en animales, ya que son capaces de colonizar diferentes tejidos, invadiendo principalmente las mucosas de los tractos respiratorios y genitales de varias especies, incluyendo el ser humano (Cristensen & Bisgard, 2004).

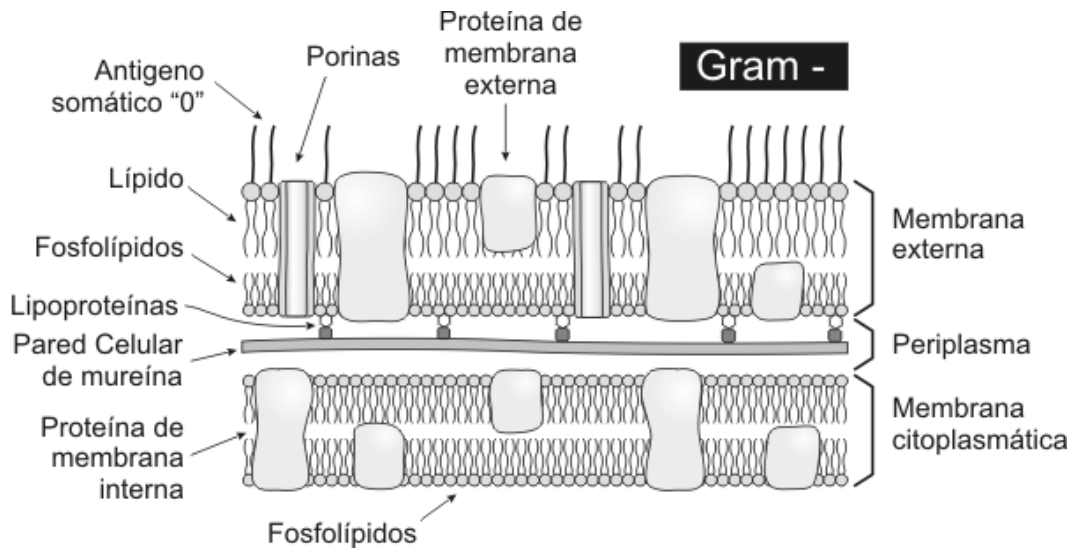
### **GÉNERO *Actinobacillus*:**

Los taxos reportados hasta la fecha para el género *Actinobacillus* constan de 22 especies, de las cuales 19 de ellas se consideran como parte de la flora normal de algunos animales, sin embargo, pueden llegar a provocar enfermedades en bovinos, carneros, caballos, cerdos e incluso humanos (Kuhnert, *et al.* 2003; Slavic, *et al.* 2000; Moller & Killan 1990).

Tres especies de este género (*Actinobacillus pleuroneumoniae*, *A. suis* y *A. equuli*) se encuentran frecuentemente asociadas con serias enfermedades del cerdo (las 2 primeras) y del caballo (la tercera), siendo *Actinobacillus pleuroneumoniae* el único considerado como patógeno primario (Bossé, *et al.* 2002).

## ***Actinobacillus suis*.**

Es una bacteria Gramnegativa (Fig. 1.) caracterizada por primera vez por Van Dorssen & Jaartsveld (1962), y originalmente fue considerada un comensal del tracto respiratorio de animales (Kim & Phillips. 1976).



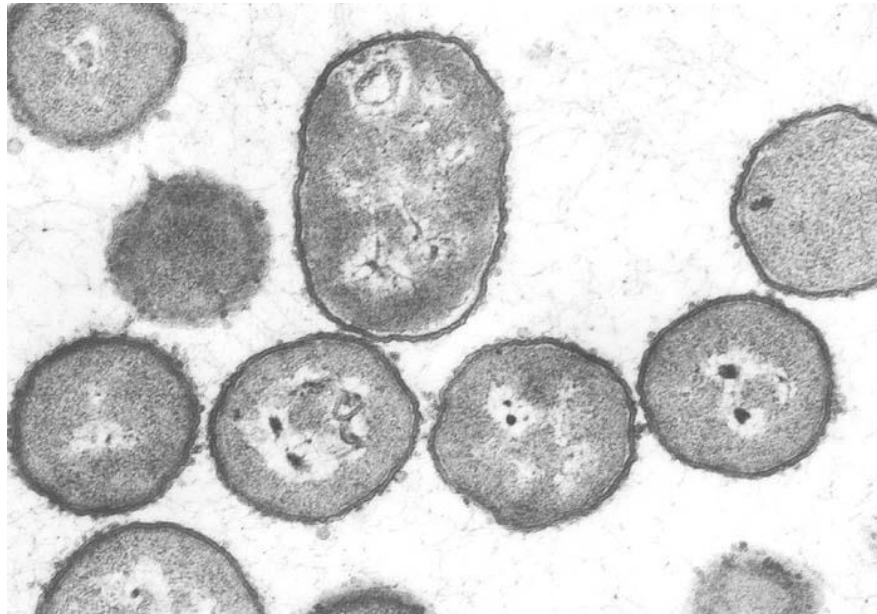
**Fig. 1. Esquema en el que se muestra la constitución de las membranas de una bacteria Gramnegativa ([www.genomasur.com/lecturas/Guia01.htm](http://www.genomasur.com/lecturas/Guia01.htm)).**

La infección que provoca *A. suis*, al igual que otras bacterias, se divide en 3 etapas básicas: Colonización, evasión de los mecanismos de limpieza del hospedero y daño a los tejidos. Aunque aún no se posee un esquema completo sobre la patología de infección por *A. suis* (Bossé, *et al.* 2002).

*A. suis* es una bacteria patógena que se encuentra en el tracto respiratorio superior, genital y digestivo de diferentes animales (principalmente en los cerdos), también se ha aislado de animales domésticos como son los gatos y los perros (Jeannotte, *et al.* 2002). Aunque este microorganismo es considerado como un organismo comensal, bajo condiciones aun no conocidas puede producir infección asociada con múltiples signos clínicos tales como: disnea, tos, debilidad, fiebre, abscesos, cianosis, hemorragias en los oídos, abdomen y piel, además de la aparición de lesiones



cutáneas parecidas a erisipelas. Las lesiones patológicas producidas por *A. suis* incluyen varios tipos de neumonía, pericarditis, miocarditis, endocarditis, artritis, flúidos en cavidades corporales, pequeños focos blanquecinos de necrosis hepática y linfadenopatías en cerdos lactantes y adultos. También puede ocasionar muerte repentina (MacInnes & Desrosiers, 1998; Slavic, *et al.* 2000).



**Fig. 2. Fotografía en microscopio de *Actinobacillus suis***  
([www.affrc.go.jp/AVEM/english/em\\_en/bacteria/actinobac/actinoba2.jpg](http://www.affrc.go.jp/AVEM/english/em_en/bacteria/actinobac/actinoba2.jpg)).

Si la velocidad de reproducción bacteriana excede la velocidad de eliminación por parte de los mecanismos defensivos de los animales hospederos, una importante población de bacterias se acumulará gradualmente dentro del hospedero y en un determinado momento provocará una enfermedad (Bossé, *et al.* 2002). En animales sanos la eliminación ocurre principalmente gracias a los macrófagos (alveolares, intestinales e intravasculares), siendo predominantes los que se encuentran en el tracto respiratorio (Bertram, 1985. Sibille & Revnolds, 1990).

Los **macrófagos alveolares** están estratégicamente ubicados en los espacios superficiales aéreos entre los alvéolos, y son estas las primeras células que se encuentran como mecanismo de defensa. Los **macrófagos intravasculares** del

pulmón se adhieren a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y son rápidamente transportados a las áreas inflamadas y/o necrosadas en el pulmón del cerdo infectado. Los macrófagos Intravasculares se especializan en la función citolítica, mientras que los alveolares se encargan de las funciones fagocíticas (Bertram. 1985. Pabst. 1996).

Una respuesta inflamatoria surge con la finalidad de aislar y destruir agentes dañinos o reparar los tejidos u órganos dañados es iniciada cuando el organismo combate agentes patógenos y sus factores de virulencia durante una infección. Esto ocurre principalmente en tejidos vascularizados (en este caso el pulmón, por *A. suis*). La inflamación comienza cuando los macrófagos del hospedero inician una cascada de eventos en donde se reclutan a todos los leucocitos de la circulación de alrededor del endotelio y la membrana basal del tejido infectado (Kvietys & Sandig. 2001. Opdenakker, *et al.* 1998). Una vez en el tejido, los leucocitos interactúan con la bacteria, los factores de virulencia y los mediadores inflamatorios, los cuales son activados (Star, *et al.* 2004) como una medida para controlar dicha colonización. Si estos mecanismos son superados, se produce una enfermedad.

### **FACTORES DE VIRULENCIA DE *A. suis*.**

Después de que las bacterias patógenas se han adherido a las células del hospedero, la capacidad de infectar dependerá de la habilidad que tengan para adquirir los nutrientes esenciales para su desarrollo. En el tracto respiratorio, la variedad y cantidad de carbohidratos y otros nutrientes se encuentra restringida para los patógenos (Macfadyen, *et al.* 1996). Los mecanismos encargados de vencer estas limitaciones nutricionales están considerados como los **mecanismos de patogenicidad** o **factores de virulencia** causantes de las enfermedades (Bossé, *et al.* 2002).

Al igual que otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*, *A. suis* presenta diferentes factores de virulencia como son: cápsula (CPS), los lipopolisacáridos

(LPS) y diversas proteínas que secretan al medio extracelular como Toxinas RTX (repeats in toxins), hemolisinas y una metaloproteasa (MacInnes & Desrosiers., 1999. Negrete Abascal, *et al.* 2004).

### **COLONIZACIÓN:**

Es la habilidad que tiene un patógeno para adherirse a células o tejidos del hospedero y de poder multiplicarse dentro de éste. La mayoría de las veces, la adhesión es un requisito necesario para que pueda producirse una enfermedad. Un estudio *in vivo* de *A. pleuroneumoniae* reveló que este tipo de bacterias no se une al epitelio traqueal o de los bronquios, sino que posee una íntima adherencia a los cilios de los bronquios y a las células epiteliales de los alvéolos (Dom. *et al.* 1994). En el momento en que el patógeno permanece en el tracto respiratorio, se vuelve una colonización estable, siendo un preludio a la infección pulmonar, sin embargo, también depende de la naturaleza del microorganismo que infecte al animal, ya sean en forma de partículas en aerosol o secreciones mucosas (Kaltreider. *et al.* 1976). Aunque *A. pleuroneumoniae* y *A. suis* poseen muchas similitudes tanto estructurales como de factores de virulencia y padecimientos, recientes estudios sugieren que las diferencias entre las proteínas OmpA (Outer membrane protein A) de estas bacterias generan diferencias en su forma de interactuar con sus hospederos. La proteína OmpA provee a *A. suis* de mayor resistencia ante antibióticos y agentes antimicrobiales (Ojha, *et al.* 2010). A diferencia de *A. pleuroneumoniae*, la cepa *A. suis* es resistente al líquido biliar y al suero del hospedero (MacInnes & Desrosiers, 1999).

### **CÁPSULA (CPS):**

En bacterias Gram-negativas la cápsula está compuesta de polisacáridos polianúricos altamente hidratados. La cápsula tiene un papel importante al delimitar el acceso de ciertas moléculas a la membrana celular, participa en la adherencia a superficies e incrementa la tolerancia a la desecación (Boyce & Adler. 2000). La cápsula es considerada como uno de los más importantes factores de virulencia que

poseen los agentes patógenos, protegiéndolos incluso contra los anticuerpos y fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares (Inzana, *et al.* 1988).

En el caso de *A. suis*, la cápsula es la responsable de provocar una respuesta inflamatoria en los pulmones. El antígeno K es el mediador contra el efecto bactericida del suero y de esta forma inhibir la fagocitosis, ya que es un componente capsular, dándole mayor capacidad de resistencia a *A. suis*. Gracias a la presencia de la cápsula, *A. suis* puede llegar a sobrevivir poco más de 90 minutos dentro de los macrófagos; durante este tiempo libera toxinas RTX que provocan la lisis de estos fagocitos (Crijsen, *et al.* 1992).

Los polisacáridos capsulares y los lipopolisacáridos (LPS) son los factores que contribuyen mayormente a una resistencia contra el efecto bactericida del suero. En un estudio sobre la importancia de la cápsula como factor de virulencia realizado en cerdos con una mutante acapsulada del serotipo 5A de *A. pleuroneumoniae*. La mutante no capsulada fue susceptible al efecto bactericida del suero *in vitro*, a diferencia de un serotipo capsulado (Ward, *et al.* 1998).

### **LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS):**

Son polímeros complejos compuestos por ácidos grasos que componen la mayor parte de la membrana externa en bacterias Gram negativas. Son los encargados de inducir la respuesta inmunológica, infiltración masiva de neutrófilos y una activación de mediadores biológicos por parte del organismo afectado. Este proceso es quizá el responsable de causar daño en el epitelio pulmonar y en las células endoteliales al fomentar una mayor permeabilidad en las paredes del tejido (Slavic, *et al.* 2000, Idris, *et al.*, 1993).

En experimentos con preparaciones crudas de LPS se observó que existen diferencias notables en los antígenos somáticos O (cadenas O) de *A. suis*; al estudiar una gran cantidad de aislados de esta bacteria (151), se describieron 2 tipos diferentes de antígenos O, sugiriendo que las bacterias que portan el serotipo O2 se

encuentran relacionadas con infecciones severas, a diferencia de las que poseen el serotipo O1 (Slavic, *et al.* 2000).

Los LPS juegan un papel importante en la adherencia *A. pleuropneumoniae* a la tráquea porcina, esto se sugirió por observaciones en aislamientos de bacterias que se encontraban adheridas en gran número a la tráquea del hospedero (Paradis, *et al.* 1994), además de que se han encontrado glicoesfingolípidos en las células epiteliales respiratorias como posibles receptores de LPS de *A. pleuroneumoniae* (Abul-Milh, *et al.* 1999).

### **TOXINAS:**

Las bacterias patógenas producen muchas sustancias tóxicas, estas proteínas (principalmente enzimas) son directa o indirectamente tóxicas para las células del hospedero, llegando incluso a matarlas. Sin embargo requieren mecanismos de regulación especializada y factores de adhesión para potenciar su expresión, liberación y efectos dentro del hospedero (Finlay & Falkow. 1997).

Las toxinas RTX (repeats in toxins) pertenecen a una familia homogénea de proteínas formadoras de poros que se encuentran presentes en diferentes bacterias Gram-negativas. Estas toxinas están ampliamente distribuidas en especies altamente patógenas, especialmente en la familia *Pasteurellaceae*, siendo determinantes dentro de los factores de virulencia en la patogénesis de diversos animales incluyendo al humano (Frey & Kuhnert. 2002).

La mayoría de las consecuencias patológicas de la pleuroneumonía en cerdos se atribuye a las toxinas Apx, las cuales tiene efectos citotóxicos en varios tipos celulares, afectando directamente el tejido e indirectamente cuando estimulan la reacción inflamatoria por activación fagocítica (Frey. 1995).

*A. suis* produce 2 toxinas Apx, las cuales son fuertemente hemolíticas y citotóxicas; estas se encuentran muy relacionadas con las toxinas Apx I y Apx II de *A.*

*pleuroneumoniae*, además de Apx IV, la cual está presente en todos los serotipos. Sin embargo, aunque presentan una secuencia de aminoácidos idéntica, los genes que codifican (ApxICABD var. suis y ApxIICABD var. suis) presentan diferencias. Las toxinas Apx de *A. suis* provocan lisis de diferentes células inmunes y no inmunes, causando diferentes niveles de daño en el tracto respiratorio del hospedero (MacInness & Desrosiers. 1998. Ostaainjen, *et al.* 1997. Kamp, *et al.* 1994).

El principal factor de virulencia que participa en la resistencia a la fagocitosis por los macrófagos y los polimorfonucleares son las toxinas RTX (ApxI, ApxII y ApxIII) las cuáles son producidas en varias combinaciones por los distintos serotipos de *A. pleuroneumoniae* (Frey, *et al.* 1993).

## **PROTEASAS.**

Las proteasas son necesarias fisiológicamente para los seres vivos. Algunas bacterias patógenas secretan proteasas, las cuales son enzimas que degradan parcial o totalmente las proteínas que estructuran los tejidos del hospedero y de esta manera facilitan su invasión (González Pedrajo & Dreyfus. 2003) estas proteasas causan hidrólisis de grandes péptidos en fragmentos pequeños para facilitar su absorción (Rao, *et al.* 1998).

## **CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS.**

Según el Comité Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas se clasifican en 4 subgrupos de 3 grupos (hidrolasas). Son clasificadas en base a 3 criterios. 1) Tipo de reacción catalítica, 2) Naturaleza química del sitio catalítico, y 3) Reacción evolutiva estructural (Rao, *et al.* 1998).

Según el aminoácido en su sitio activo, las proteasas se catalogan en 4 grupos.

**Aspartato-proteasas:** Dependen de un Ac. aspártico para su actividad catalítica.

**Cisteín-proteasas:** Dependen de un intermediario covalente que consiste en cisteína o histidina.

**Serín-proteasas:** Se caracterizan por la presencia de un grupo

serina dentro de su sitio activo. **Metallo-proteasas:** Son las más diversas por sus tipos catalíticos, se caracterizan por requerir de un ión metálico divalente para su actividad, siendo este un átomo de zinc catalíticamente activo que puede ser remplazado en algunos casos por otro metal como el cobalto o el níquel sin que pierda su actividad (Rao, *et al.* 1998).

Diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae* como: *P. multocida*, *M. (Pasteurella) haemolytica*, *Av. paragallinarum* y más específicamente miembros del género *Actinobacillus* como *A. pleuroneumoniae* y *A. suis*, secretan metaloproteasas al medio extracelular (Negrete Abascal, *et al.* 2004. García, *et al.* 2004. Rivero. 2005). Jiménez González (2005) generó un banco genómico en *E. coli* DH5a a partir del DNA genómico de *A. suis*. De este banco genómico identificó y caracterizó una clona que expresaba actividad proteolítica similar a la expresada por la cepa silvestre.

### **Mecanismo de acción de las Metallo-Proteasas.**

Son las más diversas de todos los tipos de proteasas, se caracterizan por el requerimiento de un ión metal divalente para su actividad. Estas incluyen enzimas de una gran variedad de orígenes como: toxinas hemorrágicas de veneno de serpientes, termolisinas de las bacterias y colagenasas de algunos organismos entre otras más. Las metaloproteasas son una de 3 clases de proteínas más antiguas y pueden estar presentes en bacterias, hongos y otros organismos. Estas proteasas difieren ampliamente en sus secuencias y estructura, pero la gran mayoría contiene un átomo de zinc catalíticamente activo, y en algunos casos puede ser reemplazado por otro metal como el cobalto o el níquel sin la pérdida de su actividad. El mecanismo catalítico conduce a la formación de un intermediario tetraédrico no covalente después de que es llevado a cabo un ataque por una molécula de agua la cual se une al zinc sobre el grupo carbonilo del enlace móvil. Posteriormente este intermediario tetraédrico es descompuesto por transferencia de un protón del ácido glutámico al grupo saliente. Estas enzimas dependen de la presencia de un catión

divalente y pueden ser inactivadas por diálisis o por la adición de un quelante (Rao, *et al.* 1998).

## **IMPORTANCIA DE LA ADQUISICIÓN DE HIERRO.**

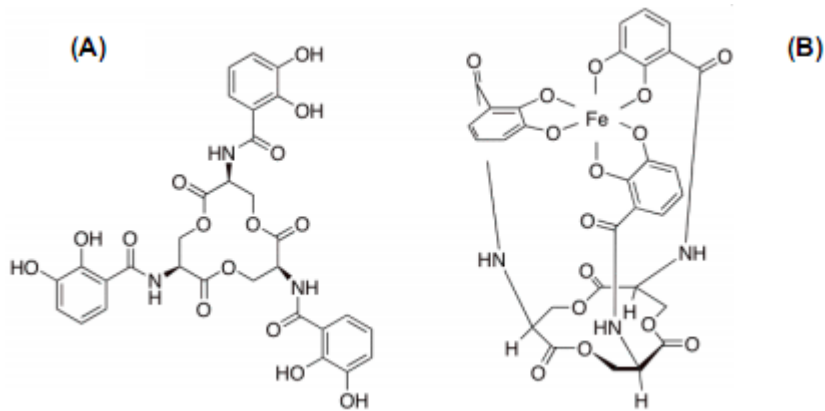
El hierro es el más importante micronutriente usado por todos los organismos. Este metal es esencial para el metabolismo celular; actúa como cofactor de un gran número de enzimas tales como las catalasas, peroxidasas, oxidasas y citocromos que participan en la síntesis de pirimidinas y aminoácidos (Wackett, *et al.* 1989).

Las bacterias necesitan una concentración de hierro entre  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  M para su crecimiento. En condiciones anaeróbicas (pH fisiológico) el hierro se encuentra en su estado  $Fe^{+2}$  que es su forma más soluble, y por lo tanto es fácilmente aprovechado por las bacterias sin la necesidad de mecanismos especializados, lo obtienen sin dificultad a partir del medio externo. En condiciones de acidez (pH 3), la concentración de  $Fe^{+3}$  soluble es de  $10^{-8}$  M, suficiente para cubrir las necesidades de la mayoría de las bacterias acidófilas. Los organismos superiores disponen de mecanismos constitutivos para mantener un bajo nivel de hierro extracelular, basados en proteínas que secuestran los iones de hierro, como son las transferrinas, hemoglobina, hemopexina, ferritina y albúmina. Existen 3 tipos de transferrinas: serotransferrina, que se encuentra en el plasma líquido y linfático; lactotransferrina, localizada en los fluidos seminales e intestinales (moco cervical, leche, etc.); ovotransferrinas, encontrada en la albúmina de los huevos (Ratledge & Dover. 2000).

Un organismo patógeno que requiere hierro para su desarrollo debe ser capaz de adquirirlo de su hospedero a pesar de que éste se encuentre restringido en el ambiente. Mientras que muchos patógenos utilizan sideróforos (moléculas de bajo peso caracterizadas por su afinidad al ión férrico) para la adquisición de hierro (Fig. 3.), los miembros de la familia *Pasteurellaceae* y *Neisseriaceae* pueden obtener el hierro directamente de las proteínas de su hospedero por mecanismos



independientes regulados por receptores de transferrinas (Tfs) (Bahrami, *et al.* 2003. Ratledge & Dover. 2000. Byers & Arsenaux. 1998). La adquisición de hierro mediada por receptores Tfs (Fig. 4.), implica dos proteínas superficiales del receptor que unen las proteínas A y B (TbpA y TbpB respectivamente) (Gray-Owen & Schryvers. 1996.). En el caso de los sideróforos, las bacterias Gram negativas captan los complejos Fe-sideróforo mediante receptores en la membrana externa (como FepA, FecA y FhuA). Las bacterias a menudo presentan múltiples receptores de especificidad para los sideróforos, e incluso pueden llegar a captar sideróforos producidos por otras bacterias (Andrews *et al.*, 2003).



**Fig. 3. (A) Esquema de un sideróforo octaédrico hexadentado. (B) Sideróforo unido a un ión férrico ([www.uni-marburg.de/fb15/ag-oberthuer/research](http://www.uni-marburg.de/fb15/ag-oberthuer/research)).**

*A. suis* puede adquirir hierro a partir de la transferrina porcina, pero no de la transferrina de otras especies de animales como la del ser humano. La membrana de *A. suis* capta específicamente transferrinas porcinas; puede crecer bajo condiciones restringidas de hierro, y se ha sugerido que esto ocurre por medio de sideróforos y receptores reprimibles por hierro análogos a los Tbp's: TbpA y TbpB (ej. los llamados lbp's), de otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* (Bahrami, *et al.* 2003. Gray-Owen & Schryvers. 1996. Schryvers & González. 1990).

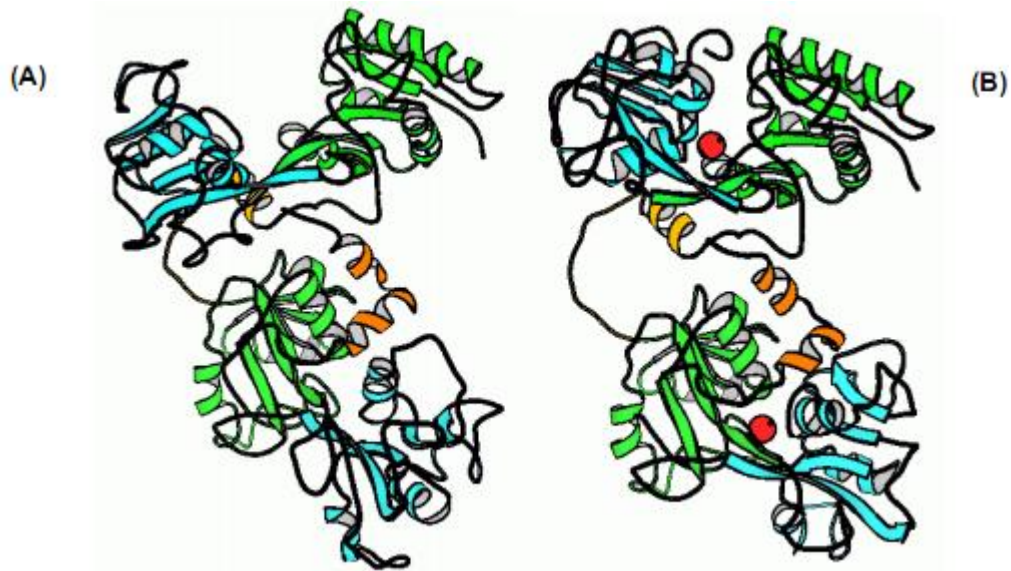


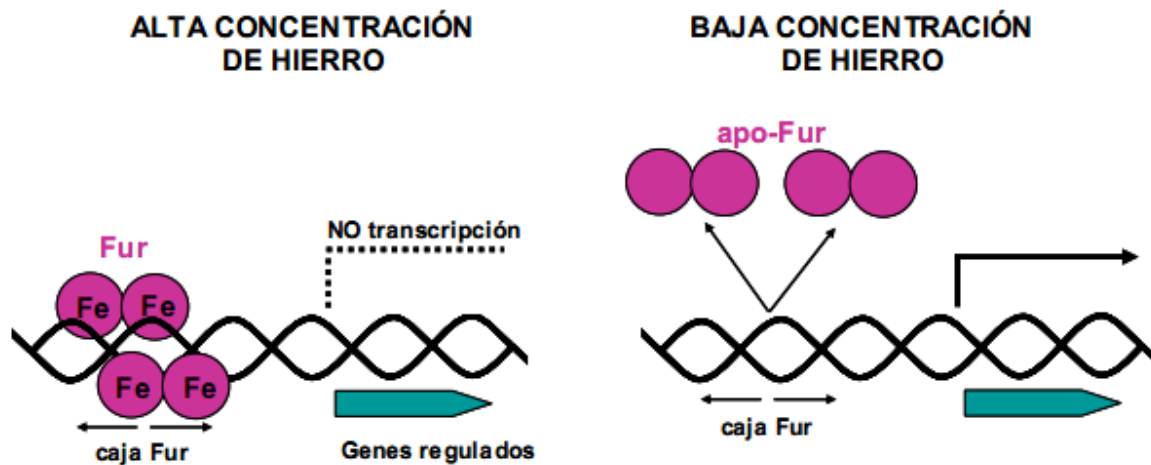
Fig. 4. Esquema de una transferrina en ausencia (A) y presencia (B) de moléculas de hierro (Bigas Terricabras. 2007).

## PROTEÍNA FUR.

Los estudios sobre el control de la homeostasis del hierro se han enfocado extensamente en **Fur** (ferric uptake regulador), proteína que responde a la concentración del hierro celular. Es un polipéptido que actúa como represor transcripcional de promotores regulados por hierro; el  $Fe^{+2}$  actúa como corepresor (Escolar, *et al.* 1999). En la proteína Fur se identifican 2 dominios: un dominio C-terminal, responsable de la unión con los iones metálicos, así como de la interacción con la proteína que dan lugar a la dimerización. El extremo N-terminal contiene un motivo de unión al ADN *helix-turn-helix* (HTH) involucrado en el reconocimiento y anclaje al ADN (Stojiljkovic & Hantake. 1995). La estructura de esta proteína se encuentra formada por 3 hélices- $\alpha$  seguidas de cadenas- $\beta$ , siendo similares a las regiones de unión al ADN descritas en otros reguladores como son: CAP, LexA o DtxR (González de Pedro, *et al.* 2001).

La regulación de la expresión del gen *fur* es muy compleja, ya que es autorregulable y está sujeta a represión catabólica, con lo que se liga su expresión con el metabolismo de la célula, y además es regulada también por la respuesta al estrés

oxidativo. Bajo condiciones ricas en hierro, Fur se une al ión divalente y forma el complejo  $\text{Fe}^{+2}$ -Fur, adquiriendo una configuración en su dominio N-terminal capaz de unirse a secuencias blanco palindrómicas de la cadena de ADN conocidas como **Cajas Fur** o cajas de hierro formada por 19 pares de bases (GATAATGATAATCATTATC), inhibiendo la transcripción de genes regulados por Fur downstream (río abajo). En situaciones contrarias, cuando el hierro es escaso, disminuye la concentración del complejo  $\text{Fe}^{+2}$ -Fur y se liberan regiones operadoras reguladas por hierro, permitiendo que la ARN polimerasa acceda a promotores de genes para la síntesis de sideróforos y otras proteínas reguladas por hierro, permitiendo la expresión de dichos genes (Fig. 5.) (Hantke. 2001). Además se ha reportado que la proteína Fur también es una Zinc metaloproteína, ya que contiene un sitio de unión para zinc, esencial para su función (Jacquamet, *et al.* 1998).



**Fig. 5. Mecanismo de acción de la proteína Fur.** A altas concentraciones, el hierro se une a la proteína Fur y el complejo Fe-Fur a su vez se une a la caja Fur, reprimiendo así los genes que se encuentran bajo su control. A bajas concentraciones de hierro, el complejo apo-Fur no puede incorporarse a la caja Fur del ADN y por lo tanto se transcriben los genes regulados por esta (Bigas Terricabras. 2007).

La unión de Fur a las cajas *fur* adyacentes al promotor es suficiente para bloquear la transcripción *in vitro*, por lo que se ha sugerido que Fur no recluta otro represor ni excluye alguna proteína activadora (Litwin & Calderwood. 1993). Además, la proteína Fur también puede regular la captación de hierro de forma indirecta a través

de varios sistemas de transducción de señal de 2 componentes reguladores: AraC-*like* en la síntesis de sideróforos y sistemas de absorción, y factores sigma de función extracitoplásmica. Fur también puede regular positivamente la expresión de algunos genes como son los que codifican la proteína Superóxido dismutasa (SodA), las ferritinas Bfr y Ftn, la aconitasa Acn, la fumarasa FumC y diversas proteínas que regulan la respuesta al estrés ácido (Hantke. 2001).

Los genes regulados por la proteína Fur constituyen el llamado regulón Fur, cuya mayor parte está implicada en la captación de hierro, en la biosíntesis y transporte de sideróforos, en la codificación de proteínas de la membrana externa receptoras de las moléculas transportadoras de hierro del huésped y en el metabolismo del hierro como son las bacterioferritinas. Además de su participación en la captación de hierro (Shite, *et al.* 2002).

Fur además de regular la expresión de otras proteínas implicadas en el metabolismo celular, tales como las Aconitas PurR o MetJ, o proteínas que participan en la respuesta del estrés oxidativo como la superóxido dismutasa SodA, regula también la expresión de algunos factores de virulencia como colicinas, hemolisinas de *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*, o la exotoxina A de *Pseudomona aeruginosa*; por lo que la acción de estas toxinas permitirá el acceso a fuentes de hierro como son las ferritinas o del grupo “hemo” de la hemoglobina, ubicadas en el interior de la célula hospedera (Escolar, *et al.* 1999).

La proteína Fur también parece controlar genes cuyos productos están implicados en la síntesis de flagelos, como el gen *flhD*, principal activador del sistema de biosíntesis de flagelos, además también se han detectado la presencia de cajas fur en los promotores de genes implicados en los procesos de regulación y transducción de señales de quimiotaxis tanto en *E. coli* como en *V. Cholerae* (Panina, *et al.* 2001).

## ANTECEDENTES.

- Bahrami, *et al.* (2003) demostraron la capacidad de *Actinobacillus suis* para obtener hierro a partir de la transferrina de cerdo por mecanismos mediados por receptores análogos a los ya descritos para otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*.
- Bigas Terricabras. (2007) en su tesis expone la importancia de los genes *fur* y *thyA* en la patogénesis de *Haemophilus parasuis*, donde logró aislar y caracterizar el gen *fur* de *H. parasuis* así como también la creación de mutantes de este mismo para probar la viabilidad de la bacteria con el gen defectuoso.
- Cox, *et al.* (2003) reportaron que los receptores de hemoglobina producidos por *P. multocida* (HgbA y HgbB) y por *A. pleuroneumoniae* (HgbA) son reprimidos por hierro y contienen una putativa caja Fur, que se identificó río arriba del gen *hgbB* de *P. multocida*.
- Grifantini, *et al.* (2003) luego de realizar análisis con *Neisseria meningitidis* mencionan que en algunos organismos Fur solo puede actuar como un regulador positivo en el control de la expresión genética, a través de la interacción entre la proteína Fur y la región del operador de genes activados por hierro.
- Hsu, *et al* (2003) clonaron y caracterizaron el gen *fur* de *Actinobacillus pleuroneumoniae*, además de ser capaz de complementar una mutante *fur*<sup>A</sup> de *E. coli* a partir de un análisis transcripcional de los promotores divergentes del operón de la toxina I (*apxI/CABD*) y el operón de absorción de hierro (*afuABC*) de *A. pleuroneumoniae*. Con esto demuestra que Fur y Ca<sup>+2</sup> regulan positivamente la transcripción de *apxI/CABD*, mientras que Fur es un represor para *afuABC*.

- Negrete-Abascal, *et al* (2004) descubrieron que *Actinobacillus suis* secreta metaloproteasas con actividad proteolítica en el medio de crecimiento, además de mencionar el nivel de actividad a diferentes temperaturas, también demostraron una similitud en las reacciones de las metaloproteasas de *A. pleuroneumoniae* y *A. suis*.
- Bahrami & Niven (2005) estudiaron la adquisición de hierro por *A. suis*: a partir de hemoglobina, identificando y caracterizando un gen que codifica para un receptor de hemoglobina, en donde se amplificaron los genes *hugZ* y *hgbA* para poder determinar si era posible que la bacteria obtuviera hierro a partir de la hemoglobina.
- Harasty *et. al* (2006), realizaron una identificación de genes *fur*-regulados por *A. actynomycetemcomitas*, creando una cepa mutante *fur-* la cual fue caracterizada determinando su respuesta al estrés por ácido en el ambiente.
- Chantes Guerra (2007) identificó y caracterizó el gen *fur* de *Av. paragallinarum* diseñando oligonucleótidos específicos para éste en base a secuencias de genes *fur* reportadas para diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*. A partir del DNA genómico de *Av. paragallinarum*, logró amplificar por PCR un fragmento de aproximadamente 500 pb. La banda del producto del PCR fue purificada, clonada y secuenciada usando primers universales (M13 Reverse y Forward) corroborando satisfactoriamente la identidad del gen *fur*.

## **JUSTIFICACIÓN.**

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento bacteriano. En diferentes microorganismos patógenos, se han descrito genes cuyos productos determinan factores de virulencia y/o participan en la captación de hierro y que se encuentran regulados por la proteína Fur. En *A. suis* se ha demostrado la presencia de genes y proteínas involucradas en captación de hierro a través de transferrina porcina y hemoglobina, pero la presencia y participación de un gen *fur* en este microorganismo no ha sido descrito, a pesar de ser uno de los agentes patógenos bovinos y porcinos más importantes. Por lo cual es importante identificar este gen en *A. suis* y su índice de similitud con otros genes *fur* reportados para diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

## **HIPÓTESIS.**

*A. suis* posee un gen *fur* con una secuencia similar a otras reportadas en organismos pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae* como *Av. paragallinarum* y *A. pleuroneumoniae*.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Clonar y caracterizar molecularmente el gen *fur* de *Actinobacillus suis*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Obtener un amplificado del gen *fur* de *A. suis*.
- Purificar el producto del gen *fur* de *A. suis*.
- Clonar y secuenciar el gen *fur* de *A. suis*.
- Analizar la secuencia *in silico* y determinar su similitud con otras secuencias *fur* ya reportadas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **Crecimiento bacteriano.**

La cepa utilizada de *Actinobacillus suis* forma parte de la colección de cepas del laboratorio. El crecimiento de la bacteria se realizó en el medio de cultivo de Base de Agar sangre suplementado con sangre (10-20 µg/ml), y se incubó a 37°C. Para el cultivo en agar sangre, la bacteria se propagara en condiciones de microaerofilia incubando las placas en un recipiente herméticamente cerrado en atmósfera húmeda y una vela que se mantiene encendida hasta que se apaga al consumirse el oxígeno contenido en el recipiente (Terzolo et al. 2000).

### **Aislamiento del DNA cromosómico de *A. suis* y amplificación del probable gen *fur*.**

El DNA genómico de *A. suis* se obtuvo usando el método de extracción descrito por Sambrook et al. (1989). Las condiciones de PCR para amplificar el posible gen *fur* de *A. suis* fueron estandarizadas usando DNA cromosómico y los oligonucleótidos previamente diseñados por Chantes Guerra (2007). El producto de PCR se observó en un gel de agarosa al 1%, después de someterlo a una separación electroforética. En caso de presentar impurezas, el producto se limpió mediante el uso de un Kit de purificación de productos de PCR y gel Wizard® SV de Promega para garantizar la pureza de la muestra.

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

La clonación se realizó bajo las siguientes condiciones: Se colocaron 4 µl del producto de PCR fresco + 1 µl de solución de sal + 1µl del vector TOPO (pCR® 2.1-TOPO), se mezcló cuidadosamente y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se realizó la transformación de células competentes de *E. coli DH5α* siguiendo el protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). La selección de



las transformantes se efectuó en placas de medio LB que contenían Ampicilina (100 µg/ml), IPTG (50 µg/ml) y X-gal (40 µg/ml), obteniendo colonias blancas y azules, de las cuales se seleccionaron las colonias blancas debido a que el fragmento del gen *fur* de *A. suis* interrumpe el gen *lacZα* del pCR2.1 TOPO por lo que las colonias *lacZα* negativas son las que tienen el inserto; generando las clonas pCR2.1 TOPO-*fur*.

### **Análisis *in silico*.**

El análisis *in silico* de la secuencia obtenida del posible gen *fur* de *Actinobacillus suis* se llevó a cabo al compararlo con secuencias ya reportadas en los bancos de genes, utilizando el programa “nucleotide blast” de la página: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Para la conversión de la secuencia obtenida a una cadena de aminoácidos, se ocupó el programa “traslate tool” que se encuentra en la página: <http://www.expasy.ch/tools/>. Mientras que para realizar la tabla de comparación entre las distintas secuencias (obtenida y otras de comparación), se usó el programa de alineación múltiple que está en la página: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>.

## RESULTADOS.

- **Aislamiento del ADN cromosómico de *Actinobacillus suis*.**

El ADN genómico de *A. suis* se obtuvo usando el método de extracción descrito por Sambrook, *et al.* (1989) como se observa en la figura 6.

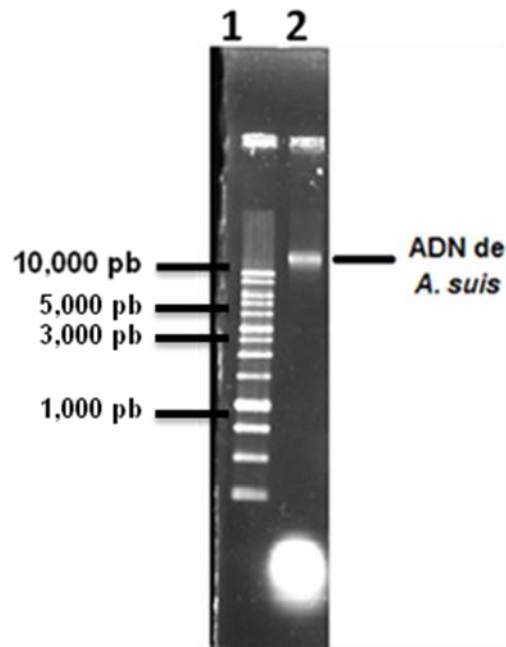


Fig.6. La columna de la izquierda (1) está el marcador de 1Kb. A la derecha (2) se muestra la banda de ADN de *A. suis*.

- **PCR.**

Para poder amplificar el probable gen *fur* de *A. suis* se emplearon los oligonucleótidos previamente diseñados por Chantes Guerra A. (2007) para el gen *fur* de *A. paragallinarum*, los cuáles fueron:

PRIMERS	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	T (C°)
Fur upper	5´ ATGTCTGAAGAAAATRYWAAA 3´	52.4
Fur lower Hd	5´ TTAATCTTTTTTATCTTTTG 3´	48.03
SÍMBOLOS:	R=A+G, Y=C+T, W=A+C	

Las condiciones de PCR estandarizadas para amplificar el gen *fur* de *A. suis* a partir del ADN cromosómico obtenido fueron: Desnaturalización a 95°C por 5 min. Alineamiento a 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 43°C y 1:30 minutos a 72°C. Extensión final de 10 minutos a 72°C y 3 minutos a 15°C.

El producto obtenido fue de un tamaño cercano a los 500 pb que presentó reminiscencias de material genético de bajo peso como se observa en la figura 7:

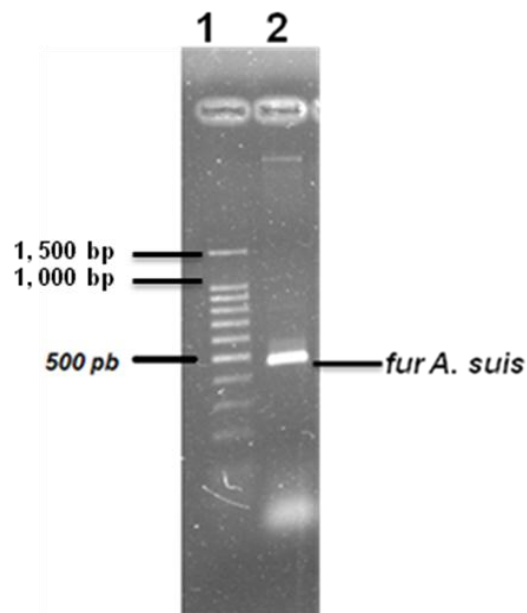


Fig. 7. A la izquierda (1) se observa el marcador de 100 pb en el cual se resalta la banda que indica los 500 pb. A la derecha (2) se encuentra el amplificado del posible gen *fur*.

Para eliminar estas impurezas, el producto fue purificado siguiendo las instrucciones del kit de purificación de productos de PCR y gel Wizard® SV de Promega, obteniendo un producto puro y sin ningún otro residuo (Fig. 8).

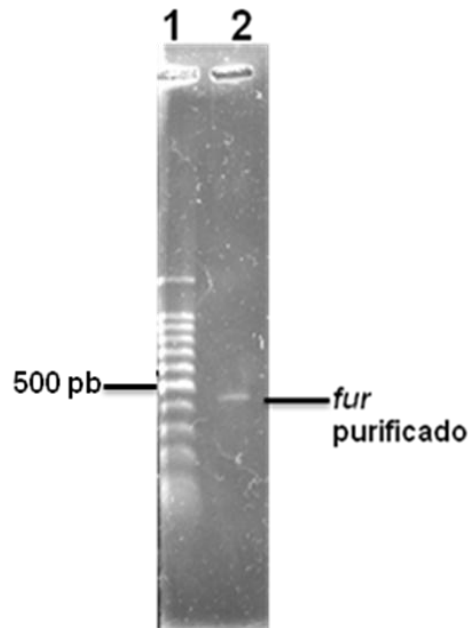


Fig. 8. A la izquierda (1) el marcador de 100 pb. A la derecha (2) se encuentra el producto purificado del gen *fur*.

- **Secuenciación:**

Después de ser purificado, el producto fue secuenciado utilizando los oligos Fur upper y Fur forwar. La secuencia obtenida de este amplificado fue de 477 nucleótidos y se muestra abajo.

```
GAATTCGCCCTTATGTCTGAAGAAAATGCTAACTTCTTAAAAGTGTTGGCTTAAAAGTAACCG
AGCCTCGCTTAACCATTCTTGCGTTAATGCAACAACATCGCGATCAAATGCAGCACTTTTCTGC
AGAAGATATTTACAACTCTTATTAGAACAAGGTTCTGATATTGGTTTAGCAACGGTTTACCGTG
TATTAAACCAATTTGAAGAGGTTGGTATTTTACTTCGCCATAACTTTGATGCGAACAAAGCGGTA
TTCGAGCTTAACGTAGAGCAAGAACACGATCATATTATCTGTATGGATTGCGGTAAGGTATTTG
AATTTAAAGATCCGGATATCGAACGCCGTCAGCGCGAAATCAGTCAACAACATGGTATGGAAT
TAGCGACTCACAGCTTATATCTCTATGCTAAATGTAATGACATTGCGCATTGTGATTCATCAAAA
GATAAAAAAGATTAAGGGCGAATTC
```

Al analizar esta secuencia mediante el programa Nucleotide blast de NCBI ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)), dicha secuencia presentó un 90% de identidad con la secuencias reportadas para los genes *fur* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

(AF330229.1), *Actinobacillus pleuroneumoniae* L20 (CP000569.1) y un 85% de identidad con la de *Avibacterium paragallinarum* (FJ004891.1).

La secuencia del gen *fur* de *A. suis* fue traducida *in silico* con el programa Translate tool de ExPASy ([www.expasy.ch/tools/dna.html](http://www.expasy.ch/tools/dna.html)) obteniéndose una proteína de 154 aminoácidos, la cual al ser analizada en el programa ProtParam de ExPASy ([www.expasy.ch/tools/protparam.html](http://www.expasy.ch/tools/protparam.html)), indicó que la proteína putativa tiene un peso de 17850.3 Daltones y un PI (Potencial Isoeléctrico) teórico de 5.33:

EFALMSEENAKLLKSVGLKVTEPRLTILALMQQHRDQMQHFS AEDIY  
KLLLEQGS DIGLATVYRVLNQFEEVGILLRHNFDANKAVFELNVEQEH  
DHIICMDCGKVF EFKDPDIERRQREISQQHGMELATHSLYLYAKCNDI  
AHC DSSKDKKD

- **Alineamiento múltiple del gen *fur* de *Actinobacillus suis*.**

Para comparar la secuencia del amplificado de *fur* de *A. suis* con las de otros genes *fur* previamente reportados, se realizó un alineamiento de estas secuencias utilizando el programa de comparación de la página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y el programa de alineación múltiple de la página: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>. Como se observa en la figura 9, el alineamiento de las secuencias nos indica una alta identidad del gen *fur* de *A. suis* con las secuencias *fur* de *A. pleuroneumoniae* (90%), *A. pleuroneumoniae* L20 (90%) y *A. paragallinarum* (85%).

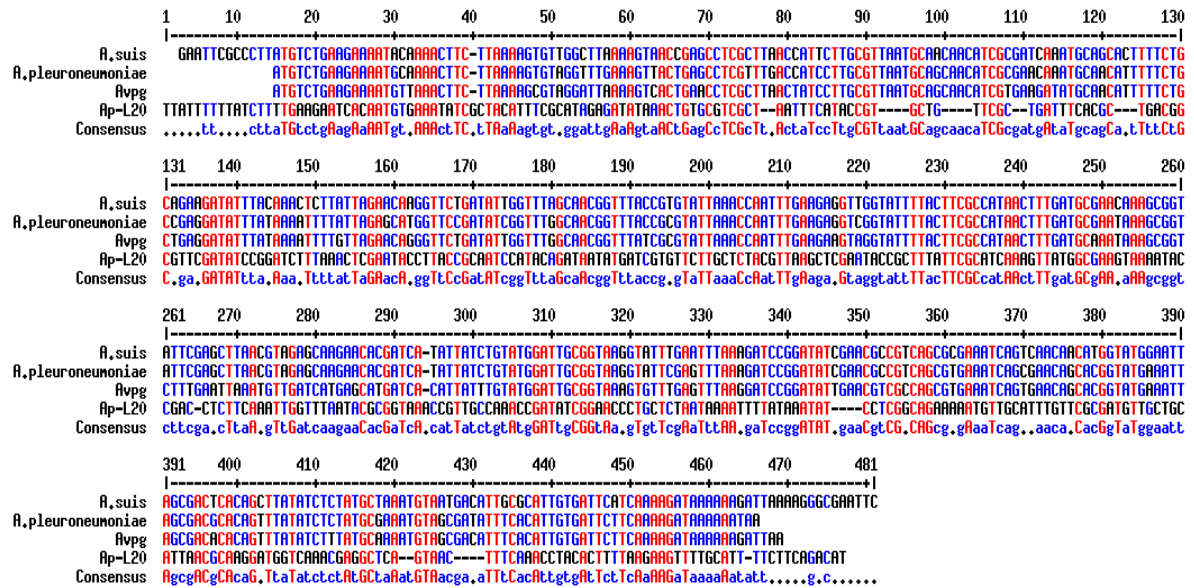


Fig. 9. Alineamiento del gen *fur* de *A. suis* con las secuencias *fur* de *A. pleuroneumoniae*, *A. pleuroneumoniae* L20 y *Av. paragallinarum*. En color rojo se muestran los nucleótidos idénticos en las todas secuencias, en azul, identidad en al menos 3 nucleótidos y en negro aquellos que son distintos o que solo 2 son iguales.

- Alineamiento múltiple de la proteína Fur de *Actinobacillus suis*.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína Fur de *A. suis* con las otras proteínas Fur mostró un 96% de identidad con las secuencias reportadas para *A. pleuropneumoniae* (AF330229.1), *A. pleuroneumoniae* L20 (CP000569.1) y *Av. paragallinarum* (FJ004891.1). El análisis también permitió identificar que la secuencia de aminoácidos de la proteína Fur de *A. suis* conserva los dominios de unión al ADN (Helix-Turn-Helix) y al hierro como se ha descrito para otras secuencias Fur (Fig. 10).

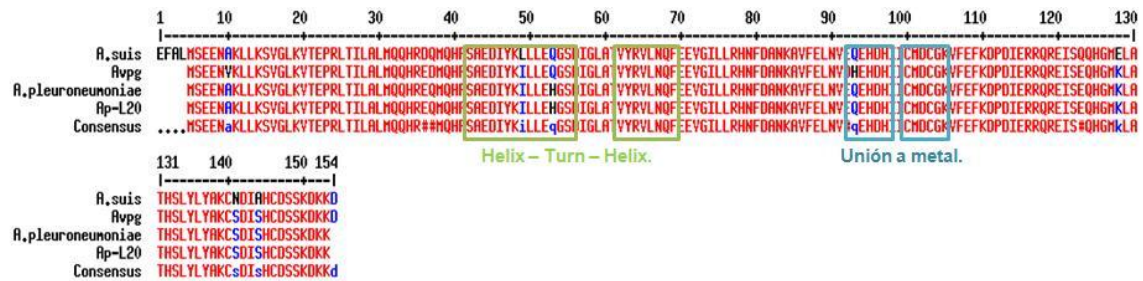
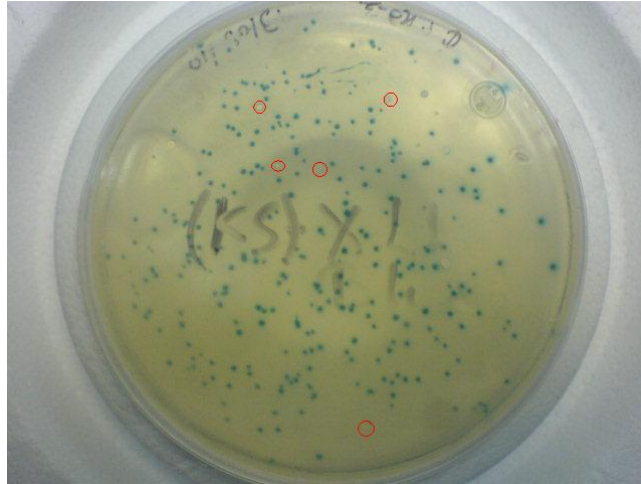


Fig. 10. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína Fur de *A. suis* con las secuencias de Fur de *A. pleuropneumoniae*, *A. pleuropneumoniae* L20 y *Av. paragallinarum*, en las cajas verdes se encierra el dominio de unión al ADN y en las cajas azules se encierra el dominio de unión al metal.

- **Clonación.**

Posteriormente a su amplificación y purificación, el gen *fur* de *A. suis* fue clonado en el vector pCR 2.1 TOPO (Invitrogen), generando el plásmido pCR 2.1 TOPO-*fur*. Con este plásmido se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . La selección de las transformantes se realizó en placas de medio LB suplementadas con Ampicilina (50  $\mu$ g/ml), IPTG (50  $\mu$ g/ml) y X-gal (40  $\mu$ g/ml); se seleccionaron las colonias blancas debido a que el fragmento del gen *fur* de *A. suis* interrumpió el gen *lacZ $\alpha$*  del pCR 2.1 TOPO (Fig. 11). Para comprobar que las clonas seleccionadas tuvieran el inserto, se realizó una digestión con la enzima *EcoRI*, observándose la liberación del fragmento de aproximadamente 500 pb.



**Fig. 11.** Placa de medio LB con Ampicilina, Xgal e IPTG en donde aparecen las colonias azules que no pudieron absorber el inserto. En un círculo rojo se denotan las colonias blancas que asimilaron el gen *fur* de *Actinobacillus suis*.



## DISCUSIÓN.

Con la finalidad de contribuir al entendimiento de los mecanismos de patogenicidad de *A. suis*, en el presente trabajo se obtuvo e identificó el gen *fur* perteneciente a esta bacteria. El producto de este gen *fur* puede ser el regulador transcripcional que se encuentra involucrado tanto en la adquisición y transporte de hierro así como en la expresión de diferentes factores de virulencia de *A. suis* (Escolar et al. 1999).

En diferentes microorganismos patógenos Fur se encarga de la regulación positiva de algunos genes como son la superóxido dismutasa SodB, las ferritinas Bfr y Ftn, la aconitasa Acn, la fumarasa FumC y diversas proteínas que regulan la respuesta al estrés ácido (Hantake, 2001), además de regular negativamente un gran número de genes como *tonB* y el operón *afeABCD* del sistema de transporte de Fe (Rhodes et al. 2005). También regula los genes *SoxR* y *SoxS* de la respuesta al estrés oxidativo, los genes *ydeP* y *RyhB* de respuesta de adaptación al pH ácido y el gen *aceB* del metabolismo celular (Oglesby et al. 2005). En *A. suis* podría existir una regulación por parte de Fur de genes similares, este proceso tendría que ser probado posteriormente.

Con los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen *fur* de *A. paragallinarum* (Negrete Abascal et al, 2009) se pudo amplificar el gen *fur* de *A. suis*, obteniendo como producto una banda de 477 pb (Fig. 7), tamaño similar a los reportados para genes *fur* de *A. pleuropneumoniae* de 450 pb (Hsu et al. 2003) y *Av. paragallinarum* con 453 pb (Chantes Guerra. 2007, Negrete Abascal et al, 2009). Esto sugiere un origen común entre genes *fur* de diversos microorganismos.

El alineamiento de la secuencia obtenida mostró una identidad del 90% con las secuencias del gen *fur* reportadas para *A. pleuropneumoniae* y del 85% con la secuencia reportada para *Av. paragallinarum* (Fig. 9), sugiriendo un posible origen común para este tipo de reguladores.

La secuencia nucleotídica obtenida fue analizada por el programa *Traslate tool* de la página [www.expasy.ch/tools/protparam.html](http://www.expasy.ch/tools/protparam.html), mostrando que la proteína Fur de *A. suis* posee los dos dominios descritos para otras proteínas Fur y que determinan su acción como regulador transcripcional, uno de estos es el dominio amino terminal (del aminoácido 42 al 55 y del 62 al 69) que contiene el sitio de unión al ADN Helix-Turn-Helix (HTH), y el otro es el dominio carboxilo terminal (del aminoácido 92 al 96 y del 99 al 104), que contiene 1 sitio de unión para el metal  $Fe^{+2}$  (Chantes Guerra. 2007).

El alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos traducida *in silico* indicó un 96% de identidad con las secuencias reportadas para *A. pleuropneumoniae* (AF330229.1), *A. pleuroneumoniae* L20 (CP000569.1) y *Av. paragallinarum* (FJ004891.1). Estos resultados sugieren que la proteína Fur de *A. suis* posee un origen común con las proteínas Fur estas otras bacterias, debido a los sitios de conservación amino terminal y carboxilo terminal observados dentro de las secuencias, lo que indica una correlación con otras bacterias Gram negativas; sugiriendo también que este mecanismo de regulación por Fur está muy generalizado en el mundo bacteriano. Algunos organismos utilizan mecanismos similares de captación y transporte de hierro, como el sistema *exbB-ExbD-TonB*, el cuál está regulado por Fur. Este argumento ha sido corroborado al demostrar que la proteína Fur de *E. coli* reconoce las cajas Fur de otros microorganismos, inclusive Gram positivas, por lo que al parecer esta secuencia regulatoria está muy bien conservada evolutivamente (Escolar *et al.* 1999).

El peso molecular descrito para proteínas Fur de diferentes microorganismos oscila entre los 17-18 kDa (Haraszthy *et al.* 2002). La secuencia de aminoácidos codificada por este gen *fur* de *A. suis* fue de 17.8 kDa de peso. El análisis de la secuencia mostró que esta posee un PI (Potencial Isoeléctrico) teórico de 5.33, ligeramente más ácido que el reportado de 5.56 para *Av. paragallinarum* (Chantes Guerra. 2007).

La importancia de Fur como regulador de diferentes genes que participan en el metabolismo, transporte y captación de hierro, en respuesta a las condiciones ambientales como estrés oxidativo, además de su participación en el control de diferentes factores de virulencia (Litwin *et al.* 1993) resalta la importancia de la continuidad de este estudio, ya que Fur regula genes que participan en la patogénesis de esta bacteria de enorme interés productivo.

## CONCLUSIONES.

- *A. suis* posee un gen *fur*.
- La secuencia nucleotídica de *fur* de *A. suis* presenta una alta identidad con la secuencia *fur* reportada para *A. pleuroneumoniae* (90%), *A. pleuroneumoniae* L20 (90%) y *A. paragallinarum* (85%).
- La secuencia de aminoácidos de Fur presenta 94% de identidad con las secuencias reportadas para *A. pleuroneumoniae*, *A. pleuroneumoniae* L20 y *A. paragallinarum*.
- La secuencia de aminoácidos presenta los dominios de unión a metal y Helix-Turn-Helix característico de las proteínas Fur.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Abul-Milh, M., Paradis, S. E., Dubreuil, D. & Jacques, M. 1999. "Binding of *Actinobacillus pleuroneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thi-layer chromatography". *Infect. Immun.* 67: 4983-4987.
- Andrews S. C., Robinson A. K. & Rodríguez-Quiñones F. 2003. "Bacterial iron homeostasis". *FEMS. Microbiol. Rev.* 27: 215-237.
- Bahrami F., Ekins A. & Niven D. F. 2003. "Iron acquisition by *Actinobacillus suis*. Identification and characterization of transferrin receptor proteins and encoding genes". *Vet. Microbiol.* 94: 79-92.
- Bahrami, F. & Niven, D. F. 2005. "Iron acquisition by *Actinobacillus suis*: Identification and characterization of a single-component hemoglobin receptor and encoding gene". *Microbial. Pathogen.* 39: 45-51.
- Bertram, T. A. 1985. "Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuroneumoniae*". *Vet. Pathol.* 22: 598-609.
- Bigas Terricabras Anna. 2007. "Importancia de los genes *fur* y *thyA* en la patogénesis de *Haemophilus parasuis*". Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Barcelona
- Bossé, J. T., Janson, H., Sheehan, B. J., Beddeck, A. J., Rycroft, N., Kroll, J. S. & Langford, P. R. 2002. "*Actinobacillus pleuroneumoniae*: Pathology and pathogenesis of infection". *Microbes infect.* 4: 225-235.

- Boyce, J. D. & Adler, B. 2000. "The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2)". *Infect. Immun.* 68: 3463-3468.
- Byers, B. R. y Arsenaux. J. E. L. 1998. "Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms: in metal ions in biological systems". (Sigel, A. & Sigel, H. Eds.) 35: 37-66. Marcel Dekker.
- Chantes Guerra A. 2007. "Clonación y caracterización molecular del gen *fur* de *Av. paragallinarum*". Tesis de Maestría, BUAP-ICUAP.
- Crijnsen, T. L., Van Leengoed, L. A., Dekker-Nooren, T. C., Schoevers, E. J. & Verheijden, J. H. 1992. "Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuroneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs". *infect. immun.* 60: 4867-4871.
- Cristensen, H. & Bisgard, M., 2004. "Revised definition of *Actinobacillus sensu stricto* isolated from animals. A review with special emphasis on diagnosis". *Vet. Microbiol.* 99: 13-30.
- Dom, P., Haesebrouk, F., Ducatelle, R. & Charlier, G. 1994. "In vivo association of *Actinobacillus pleuroneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs". *Infect. Immun.* 62: 1262-1267.
- Escolar, L., Pérez-Martín J., & De Lorenzo, V. 1999. "Opening the iron box: Transcriptional metalloregulation by the Fur protein". *J. Bacteriol.* 181: 6223-6229.
- Fastrez, J., Fersht, A. R. 1973. "Mechanism of chymotrypsin. Structure, reactivity and nonproductive binding relationships". *Biochemistry.* 6:1067-1074.

- Finlay, B. B., Falkow, S. 1997. "Common themes in microbial pathogenicity revisited". *Microbiol.* 3:257-261.
- Frey, J., Bosse, J. T., Chang, Y. S., Cullen, J. M., Fenwick, B., Gerlach, G. B., GYgi, D., Haesebrouck, F., Inzana, T. J., Jansen, R. 1993. "*Actinobacillus pleuroneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleutotoxin and their genes". *J. Gen. Microbiol.* 139:1723-1728.
- Frey, J. 1995. "Virulence in *Actinobacillus pleuroneumoniae* and RTX toxins". *Trends Microbiol.* 3: 257-261.
- Frey, J. Kuhnert, P. 2002. "RTX Toxins in *Pasteurellaceae*". *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 149-158.
- García G. O., García R. M., Garza, de la, M., Vaca P. S., Paniagua, G. L. , Mejía, R., Tenorio, V. R., Negrete-Abascal, E. 2004. "*Actinobacillus pleuroneumoniae* metalloprotease: cloning and in vivo expresión". *FEMS Microbiol. Letters.* 234: 81-86.
- Gibson, B. W., Campagnari, A. A., Melaugh, W., Phillips, N. J., Apicella, M. A., Grass, S., Wang, J., Palmer, K. L. & Munson, R. S. 1997. "Characterization of a transposon Tn016-generated mutant of *Haemophilus ducreyi* 35000 defective in lipooligosaccharide biosynthesis". *J. Bacteriol.* 179: 5062-5071.
- González de Pedro, A., Saint Pierre, C., Latour, J., Michaud-Soret, I. & Forest, E. 2001. "Conformational changes of Ferric Uptake Regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor". *J. Mol. Biol.* 310: 83-91.
- González Pedrajo, B., Dreyfus, G. 2003. "Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram-negativas: Biogénesis flagelar y Translocación de

factores de virulencia. Mensaje Bioquímico". Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM, México, DF. 27:45-63.

- Grifantini, R., Shite, S., Frigimelica, E., Draghi, M., Bartolini, E., Muzzi, A., Rappuoli, R., Grandi, G. & Genco, A. C. 2003. "Identification of iron-activated and repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B". Proc Natl Acad Sci U S A. 100: 9542-9547.
- Gray-Owen, S. D. & Schryvers, A. B. 1996. "Bacterial transferrin and lactoferrin receptors". Trends Microbiol. 4: 185-192.
- Hantake, Klaus. 2001. "Iron and metal regulation in bacteria". Curr. Opin. Microbiol. 4: 172-177.
- Haraszthy, V. I., Rally E. T., Haraszthy, G. G. y Zambon J. 2002. "Molecular cloning of the *fur* gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*". Infect. Immun. 70: 3170-3179.
- Haraszthy, V. I., Jordan, S. F. & Zambon, J. J. 2006. "Identification of Fur-regulated genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*". Microbiology 156: 787-796.
- Hsu, Y. M., Chin, N., Chang, C. F., & Chang, Y. F. 2003. "Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuroneumoniae fur* gene and its role in regulation of Apxl and AfuABC expression. DNA Sequence". 14: 169-181.
- Idris U. E., Harmon, B. G., Udeze, F. A. & Kadis, S. 1993. "Pulmonary lesions in mice inoculated with *Actinobacillus pleuroneumoniae*. Hemolysin and lipopolysaccharide": Vet. Pathol. 30: 234-241.



- Inzana, T. J., Ma, J., Workman, T., Gogolewski R. P. & Anderson, P. 1988. "Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuroneumoniae* serotype 5". *Infect. Immun.* 56: 1880-1889.
- Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A. Hazemann, J. L., Latour, J. M., Michaud-Soret, I. 1998. "X-Ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the Fur protein for *Escherichia coli*". *Biochemistry.* 37: 2564-2571.
- Jeannotte, M. E., Slavic, D., Frey, J., Kuhnert, P. & MacInnes J. I. 2002. "Analysis of non-porcine isolates of *Actinobacillus suis*". *Vet. Microbiol.* 85: 83-93.
- Jiménez González, A. S. 2005. "Aislamiento de una clona de *Actinobacillus suis* con actividad proteolítica". Tesis de licenciatura, UNAM.
- Kaltrieder, H. B. 1976. "Initiation of immune responses in the lower respiratory tract with red cell antigens", in: Kirkpatrick, C. H., Reynolds, H. Y., (Eds). "Immunologic and infectious reactions in the lung". Marcel Dekker, Inc., New York. 73-97.
- Kim, B. H. & Phillips, J. E. 1976. "*Actinobacillus suis* in the horse". *Vet. Rec.* 98: 239.
- Kuhnert, P., Berthoud, H., Straub, R. & Frey, J. 2003. "Host cell specific activity of RTX toxins from haemolytic *Actinobacillus equuli* and *Actinobacillus suis*". *Vet. Microbiol.* 92: 161-167.
- Kvietys, P. R. & Sandig, M. 2001. "Neutrophil diapédesis: Paracellular or transcellular?". *News Phys. Scf.* 16: 15-19.

- Litwin, C. M. & Calderwood, S. B. 1993. "Role of iron in regulation of virulence genes". *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 137-149.
- Macfadyen, L. P., Dorocicz, I. R., Reizer, J., Saler M. H. Jr. & Redfield, R. J. 1996. "Regulation of competence development and sugar utilization in *Haemophilus influenzae* Rd by a phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase system". *Mol. Microbiol.* 21: 941-952.
- MacInnes J. I. & Borr J. D. 1990. "The family *Pasteurellaceae*: modern approaches to taxonomy". *Can. J. Vet. Res.* 54: 6-11.
- MacInnes, J. I. & Desrosiers, R. 1999. "Agents of the "Suis-ide Diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis*". *Can. Vet. Res.* 63: 83-89.
- Moller, K. & Kilian, M. 1990. "V Factor-Dependent members of the Family *Pasteurellaceae* in the porcine upper respiratory track". *J. Clin. Microbiol.* 28: 2711-2716.
- Monteiro, M. A., Slavic, Michael, F. St., Brisson, J. R., MacInnes, J. I., Perry, M. B. 2000. "The first description of a (1 → 6)-β-D-Glucan in prokariotes: (1 → 6)-β-D-Glucan is a common component of *Actinobacillus suis* and is the basis for a serotyping system". *Carbohidr. Res.* 329: 121-130.
- Negrete-Abascal, E., Vaca P. S., Paniagua, G. L., Pérez, M. A., Ibarra, C. J., Pérez, M. V. M. & Tenorio, V. R. 2004. "Metalloproteases secreted by *Actinobacillus suis*". *Curr. Microbiol.* 49: 55-58.

- Oglesby, A. G., Murphy E. R., Iyer V. R. y Payne S. M. 2005. "Fur regulates acid resistance in *Shigella flexneri* via *RyhB* and *ydeP*". *Mol. Microbial.* 58: 1354-1367.
- Ojha, S., Lacouture, S., Gottschalk, M. & MacInness, J. I. 2010. "Characterization of colonization-deficient mutants of *Actinobacillus suis*". *Vet. Microbiol.* 140: 122-130.
- Opdenakker, G., Fibbe, W. E. & Van Damme. 1998. "The molecular basis of leukocytosis". *Immunol. Tod.* 19: 182-189.
- Ostaainjen, J. V., Frey, J., Rosendal, S., MacInness, J. I. 1997. "*Actinobacillus suis* strains isolated from healthy and diseased swine are clonal and carry *ApxICABD* var. suis and *ApxIICABD* var. suis toxin genes". *J. Clin. Microbiol.* 35:1131-1136.
- Pabst, R. 1996. "The respiratory immune system of pig. *Vet. Immunol. Immunopathol*". 54: 151-195.
- Panina, E. M., Mirinov, A. A. & Gelfand, M. S. 2001. "Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria". *Nucleic Acid Res.* 29: 5195-5206.
- Paradis, S. E., Dubreuil, D., Rioux, S., Gottschalk, M. & Jacques, M. 1994. "High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuroneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells": *Infect. Immun.* 62: 3311-3319.
- Rao, M. B., Aparna, M., Tanksale, Mohín, S., Ghatge, Vasanti, V., Deshpande. 1998. "Molecular and biotechnological aspects of Microbial proteases". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597-635.

- Ratledge, C. & Dover, L. G. 2000. "Iron metabolism in pathogenic bacteria". *Ann. Rev. Microbiol.* 54: 881-941.
- Rhodes R. E., Tomaras P. A. McGillivray G., Connerly L. P. y Actis A. L. 2005. "Genetic and functional analyses of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* AfeABCD siderophore-independent iron acquisition system". *Infect. Immun.* 73: 3758-3763.
- Rivero-García PC, Cruz CV, Alonso PS, Vaca S, Negrete-Abascal E. 2005. "*Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases". *Can J Microbiol.* 51: 893-896.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Laboratory Press.
- Schryvers, A. B. & González, G. C. 1990. "Receptors for transferrin in pathogenic bacteria are specific for the host's protein". *Can. J. Microbiol.* 36: 145-147.
- Shite, S., Sarika, A., Murphy, J. R. & Genco, C. A. 2002. "The gonococcal Fur regulon. Identification of additional genes involved in major catabolic, recombination and secretory pathways". *J. Bacteriol.* 184: 3965-3974.
- Sibille, Y. & Revnolds, H. B. 1990. "Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury". *Am. Rev. Resp. Dis.* 141: 471-501.
- Slavic, D., J Delay, J., Hayes, M. A., MacInnes, J. I. 2000. "Comparative pathogenicity of different *Actinobacillus suis* O/K serotypes". *Can. J. Vet. Res.* 64: 81-87.

- Star, A. E., Dan, T., Minhas, K., Shewen, P. E. & Coomber, B. L. 2004. "Potential involvement of gelatinases and their inhibitors in *Mannheimia haemolytica pneumonia* in cattle". *Infect. Immun.* 72: 4393-4400.
- Stojiljkovic, I. & Hantake, K. 1995. "Functional domains of *Escherichia Coli* Ferric Uptake Regulator protein (Fur)". *Mol. Gen. Genet.* 247: 199-205.
- Terzolo, H. R. 2000. "Revisión sobre coriza infecciosa: propuestas de investigación para su diagnóstico y control". *Rev. Med. Vet. (BS. As.)*. 81: 262-269.
- Wackett, L. P., Orme-Jhonson W. H. & Walsh, C. T. 1989. "Transition metal enzyme in bacterial metabolism". In Beveridge, T. J., Doyle, R. J. (ed.), "Metal ions and bacteria". Jhon Wiley & Sons, Inc. New York, N. Y. 1989. Pp. 165-206.
- Ward, C. K., Lawrence, M. L. & Inzana, T. J. 1998. "Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA región involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuroneumoniae* serotype 5a: recombinant expresión of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. Pleuroneumoniae* serotype 1". *Infect. Immun.* 66: 3326-3336.

## BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET

- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>
- [www.affrc.go.jp/AVEM/english/em\\_en/bacteria/actinobac/actinoba2.jpg](http://www.affrc.go.jp/AVEM/english/em_en/bacteria/actinobac/actinoba2.jpg)
- [www.expasy.ch/tools/dna.html](http://www.expasy.ch/tools/dna.html)
- [www.expasy.ch/tools/protparam.html](http://www.expasy.ch/tools/protparam.html)
- [www.genomasur.com/lecturas/Guia01.htm](http://www.genomasur.com/lecturas/Guia01.htm)
- [www.uni-marburg.de/fb15/ag-oberthuer/research](http://www.uni-marburg.de/fb15/ag-oberthuer/research)