



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**



**CARACTERIZACION DE PROTEÍNAS**  
**DE MEMBRANA EXTERNA DE *Pasteurella multocida* QUE INTERACTÚAN CON**  
**LACTOFERRINA HUMANA**

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**OMAR GÓMEZ ARENAS**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL**

Los Reyes Iztacala, Estado de México Noviembre 2019



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.

**Revisores Asignados**

**Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras**

**M. en C. Alina Uribe García**

**Dr. Eric Monroy Pérez**

**El presente trabajo fue desarrollado con el apoyo del proyecto PAPIIT IN219919**

## Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a mis padres, por el apoyo que me han brindado en toda mi vida y por animarme a seguir mis anhelos de incursionar en el mundo de la ciencia. A mi madre, **Yazmin Arenas** por incentivar mi curiosidad y convencerme de que podía hacer todo lo que me proponga. A mi padre, **Juan Gómez**, por haberme enseñado el valor del trabajo y que con esfuerzo se puede lograr cualquier cosa.

Al **Doctor Sergio Vaca Pacheco** por aceptarme como su estudiante, por su apoyo incondicional, paciencia y consejos dados a lo largo de este tiempo que he pasado en su laboratorio. Fue un placer haber coincidido en esta vida con usted.

Al **Doctor Erasmo Negrete Abascal** por haberme dado una oportunidad para trabajar en el laboratorio de Genética, por tenerme paciencia y por el conocimiento que ha compartido conmigo en mi estancia en este laboratorio.

A mis amigos **Katya, Carlos, Tonatiuh y Yazmin** por haber estado conmigo en las buenas y en las malas, por todo el apoyo moral que me han dado y por todos los momentos inolvidables que he pasado con ellos. Les agradezco haber compartido sus vidas conmigo y sin importar que la vida nos separe, ha sido un placer coincidir con ustedes.

A mi hermano **Geovanny** por el apoyo y los consejos dados, por ser mi amigo y compañero a lo largo de todos estos años, aun nos esperan un sinfín de cosas en el porvenir.

Al **Maestro Fernando Montes** por los incontables conocimientos enseñados, por su amistad y las incontables experiencias de vida que ha compartido conmigo. Simplemente no hay manera de agradecerle por toda su ayuda en este tiempo.

A mis camaradas de trabajo **Edmundo y Angél** por el apoyo brindado y hacer que los continuos fracasos fueran más tolerables.

A las millones de personas que pagan impuestos, quienes a través de la UNAM han financiado parte de mi formación académica.

*“Más allá de la noche que me cubre,  
negra como el abismo insondable,  
doy gracias al dios que fuere  
por mi alma inconquistable.*

*En las garras de las circunstancias  
no he gemido ni llorado.  
Sometido a los golpes del destino  
mi cabeza sangra, pero está erguida.*

*Más allá de este lugar de ira y llantos  
donde yace el horror de la sombra,  
la amenaza de los años  
me halla, y me hallará sin temor.*

*No importa cuán estrecho sea el camino,  
ni cuán cargada de castigos la sentencia,  
soy el amo de mi destino,  
soy el capitán de mi alma.”*

*William Ernests Henley*

*“Si me hubieran los miedos sucedido  
como me sucedieron los deseos,  
los que son llantos hoy fueran trofeos:  
¡mirad el ciego error en que he vivido!*

*Con mis aumentos propios me he perdido;  
las ganancias me fueron devaneos;  
consulté a la Fortuna mis empleos,  
y en ellos adquirí pena y gemido.*

*Perdí, con el desprecio y la pobreza,  
la paz y el ocio; el sueño, amedrentado,  
se fue en esclavitud de la riqueza.*

*Quedé en poder del oro y del cuidado,  
sin ver cuán liberal Naturaleza  
da lo que basta al seso no turbado.”*

*Francisco de Quevedo*

## Resumen

*Pasteurella multocida* es un cocobacilo Gram-negativo anaerobio facultativo que puede causar enfermedades en diferentes animales produciendo pérdidas económicas a la industria pecuaria. Este microorganismo expresa diferentes factores de virulencia los cuales le otorgan la capacidad de infectar un amplio rango de hospederos. Una limitante para infectar un hospedero es la baja disponibilidad de hierro libre. Para manejar estas limitaciones las bacterias expresan proteínas en su superficie que pueden interactuar con moléculas asociadas al hierro como lo son las hemoproteínas, la lactoferrina o la transferrina o los sideróforos. Utilizando la técnica Far-western blot, se encontró que algunas cepas de *P. multocida* expresan una proteína de membrana de alrededor de 95kDa al crecer en un medio con baja concentración de hierro. Esta proteína puede unirse a la lactoferrina humana y su identidad por espectrometría de masas indica homología con una aldehído alcohol deshidrogenasa. La cepa de *P. multocida* ATCC 43020 demostró ser capaz de usar lactoferrina humana como fuente de hierro al crecerse en un medio con 2'2'-dipyridyl como agente quelante de hierro. La adición de lactoferrina humana permite la recuperación de un 60% del crecimiento de esta cepa con respecto a un medio en el cual no se adiciona esta proteína; esta recuperación no se observó en el aislado C-3 de *P. multocida* que no expresa esta proteína. La capacidad de usar lactoferrina humana como fuente de hierro por parte de algunas cepas de *P. multocida* podrían convertir a este microorganismo en un potencial agente zoonótico.

# Indice

Introducción.....	1
Descripción del organismo de estudio.....	1
Factores de Virulencia y su relación con la obtención del hierro.....	2
La respuesta inmune a los factores de virulencia.....	3
El papel del hierro en las bacterias.....	4
La lactoferrina como limitante de hierro.....	5
Objetivos.....	8
General.....	8
Particulares.....	8
Materiales y métodos.....	9
Bacteria y crecimiento.....	9
Identificación de cepas que interactúan con lactoferrina.....	9
Extracción de OMP's.....	10
Electroforesis.....	11
Far-Western-blot.....	11
Purificación de la proteína que une lactoferrina humana.....	12
Análisis mediante Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization(MALDI-TOF).....	12
Crecimiento de la bacteria en un medio con lactoferrina humana como fuente de hierro.....	12
Resultados.....	13
Efecto de 2,2' dypiridil en el crecimiento de <i>P. multocida</i> .....	13
Dot blot con lactoferrina humana.....	14
Obtención de patrones de OMP's.....	15
Far western blot con Lactoferrina humana y purificación.....	16
Identificación de la proteína mediante MALDI-TOF.....	17
Crecimiento de <i>P.multocida</i> con lactoferrina humana como fuente de hierro.....	17
Discusión.....	20
Conclusiones.....	22
Referencias.....	23

# Introducción

## Descripción del organismo de estudio

*Pasteurella multocida* es una bacteria que se encuentra como comensal en la oro-faringe y el tracto respiratorio superior de mamíferos y aves tanto domésticos como salvajes y que bajo ciertas circunstancias puede ser un patógeno oportunista (Wilson et al., 2013).

*P. multocida* es un coco bacilo Gram-negativo capsulado, no formador de esporas, presenta tinción bipolar con tinción de Gram, anaerobio facultativo, no móvil, produce H<sub>2</sub>S e indol, no es hemolítico en sangre de cordero, es sensible a penicilina, produce ácido sin gas a partir de glucosa, galactosa, fructuosa, manosa, y sacarosa; no crece en agar MacConkey. Puede ser clasificado por su cápsula en los serogrupos A, B, D, E y F, y por su lipopolisacárido en los serotipos 1-16. Cada serotipo puede afectar a diferentes hospederos y causarles diversas enfermedades. Un ejemplo, es el cólera aviar es producido principalmente por el serotipo A, mientras que los serotipos E y B causan septicemia hemorrágica en bovinos y búfalos. El serotipo D provoca rinitis atrófica en cerdos, mientras que el serotipo A:1 origina neumonía en bovinos, cerdos y borregos (Harper et al., 2006, Liu et al., 2003; Trigo, 1987, Boyce et al., 2010, Namioka, 1972).

La infección sintomática por *Pasteurella* es una enfermedad de alto impacto en la ganadería y en las poblaciones silvestres de algunos animales (como en la *Saiga tatarica* cuyas poblaciones se vieron afectadas en mayo del 2015 por este patógeno causando 152 336 animales muertos en un periodo de dos semanas). Debido al amplio rango de hospederos a los que puede afectar de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud Animal ([www.oie.int](http://www.oie.int)). Por otro lado, hay numerosos reportes de infecciones de distinta índole provocadas por *P. multocida* en humanos; sobre todo se ha notado que muchas de las infecciones provocadas por mordeduras/arañazos de perros y gatos son provocadas por esta bacteria; también se han reportado casos de infecciones por *P. multocida* que no están relacionados a mordeduras/arañazos de animales. En estos casos la mayoría de las

infecciones se presentan en el tracto respiratorio y en algunos casos, infecciones en el sistema gástrico, en las extremidades, el sistema nervioso central, en los ojos, en la boca y algunos reportes de septicemia. Pero debido a que muchas veces no se identifican los patógenos causantes de infecciones bacterianas, no se tienen estadísticas reales sobre la incidencia de infecciones causadas por *P. multocida* en las poblaciones humanas (Talan et al., 1999; Bailie et al., 1978; Dire, 1991; Peel, 1993; Talley et al., 2016; de los Santos et al., 1987, FAO, 2015, Koshemetov et al., 2014).

## **Factores de Virulencia y su relación con la obtención del hierro**

Los factores de virulencia son todos aquellos mecanismos que le permiten a un ser vivo colonizar y permanecer en un hospedero con el fin de beneficiarse de esa estancia. A lo largo de la historia evolutiva, las bacterias han desarrollado una serie de características que les permiten sobrevivir en el hospedero como son los receptores especializados para la adhesión, mecanismos para la evasión del sistema inmune, para la captación de los nutrientes transportados por algunas proteínas o para causar daño tisular y con esto liberar los nutrientes necesarios para su crecimiento (Tortora et al., 2007).

Los diferentes factores de virulencia que posee *P. multocida* podrían causar enfermedades en varios hospederos. Entre estos factores se han descrito lipopolisacáridos, cápsula, adhesinas, toxinas y proteínas de adquisición y regulación del hierro que se encuentran en su membrana externa (OMP's), Las OMP's resultan interesantes porque entre el 20-30% de los genes de una bacteria codifican para proteínas de membrana, el 50% de la membrana externa está constituida por proteínas y algunas de éstas tienen capacidad de interactuar con proteínas hémicas del hospedero (Koebnik et al., 2000; Hatfaludi et al., 2010).

En miembros de las familias *Moraxellaceae*, *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae* se ha detectado la expresión de proteínas de membrana externa involucradas directamente en la asimilación de hierro a partir de glicoproteínas del hospedero como la transferrina y la

lactoferrina y otras proteínas hémicas. En miembros de la familia *Pasteurellaceae* se han reportado receptores para lactoferrina, transferrina, haptoglobina, grupos hemo libres, hemopexina y hemo-albumina en los siguientes miembros de la familia: *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Manheimia haemolytica*, *A. suis*, *H. parasuis*, *H. ducreyi* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. (Kuhnert y Christensen, 2008., Bosse et al., 2002., Pogoutse y Moraes, 2017., Ogunnariwo y Schyvers, 2001.).

Otro factor importante es la interacción con proteínas de la matriz celular (ECM por sus siglas en inglés) ya que las bacterias deben adherirse a las células del hospedero antes de poder crecer y subsecuentemente invadir al hospedero. Estos componentes (como la fibronectina, el colágeno y los proteoglicanos) se encuentran en todas las células de los tejidos de los eucariotas y están asociados a la membrana celular, lo que los vuelven objetivos ideales de los mecanismos de adhesión celular que poseen los patógenos, incluidos los miembros de la familia *Pasteurellaceae*, para la colonización de hospederos (junto con otros factores relacionados con la obtención de nutrientes, como el hierro por ejemplo). En el caso de *P. multocida* en algunos estudios se ha demostrado su habilidad para unirse a proteínas de la matriz extracelular del hospedero como la fibronectina, el colágeno tipo IX y la heparina, mediante proteínas que unen a fibronectina, siendo una de estas Tbp (Transferrin Binding Protein) (Dabo et al., 2005).

## **La respuesta inmune a los factores de virulencia**

El cuerpo tiene diversas maneras de reaccionar ante un patógeno, ya sea mediante la respuesta inmune innata o adaptativa, atacando agentes extraños por medio de macrófagos, o por medio de anticuerpos, que impiden la propagación del microorganismo. La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa del cuerpo contra los microorganismos invasores y consiste en una serie de barreras físicas, químicas y biológicas cuyo propósito es impedir que los microorganismos o materiales dañinos ingresen en el cuerpo ya sea evitando el establecimiento de dichos microorganismos, atrapándolos en sustancias como el

moco, para después expulsarlos, o limitando los nutrientes que son indispensables para su crecimiento como es el caso del hierro, el zinc y el cobre. (Castellanos et al., 2000).

## **El papel del hierro en las bacterias**

El hierro es un factor de crecimiento esencial para prácticamente todos los seres vivos, incluidas las bacterias, debido a sus características óxido-reductoras funcionando como cofactor de diversas enzimas y proteínas, en la vía pentosa fosfato, en la replicación de DNA y en la transcripción. Posiblemente por su abundancia en la corteza terrestre, fue que los organismos superiores desarrollaron mecanismos para mantener bajos los niveles de hierro libre, esto se debe a la reacción de Fenton, que resulta de catalizar el  $H_2O_2$  con metales de transición, generando radicales hidroxilo (OH) . Por lo general el hierro se encuentra en mayor concentración en tejidos específicos como el hígado o la sangre; el resto se encuentra en proteínas transportadoras como la transferrina y la lactoferrina, o proteínas de almacenaje como la ferritina, con las que forma complejos muy estables que solo ceden el hierro a los tejidos demandantes como los antes mencionados (Wilks y Burkhard 2016, Rubio-Clemente et al., 2014).

En las mucosas y tejidos existe una concentración de hierro libre baja, de alrededor de  $10^{-18}$  M, debido a que el organismo produce proteínas que secuestran los iones de hierro. Esta limitación del hierro disponible constituye una de las primeras líneas de defensa del huésped, frente a las infecciones bacterianas, junto con la reducción de nutrientes no-metálicos como los aminoácidos. Por otro lado el desarrollo de estos procesos por parte de los hospederos obliga a los patógenos a desarrollar respuestas de evasión de estos sistemas de protección del hospedero, haciendo con esto que los microorganismos muestren especificidad por sus huéspedes con base a sus sistemas de captación de hierro (Bosch, 2003, Palmer et al., 2016).

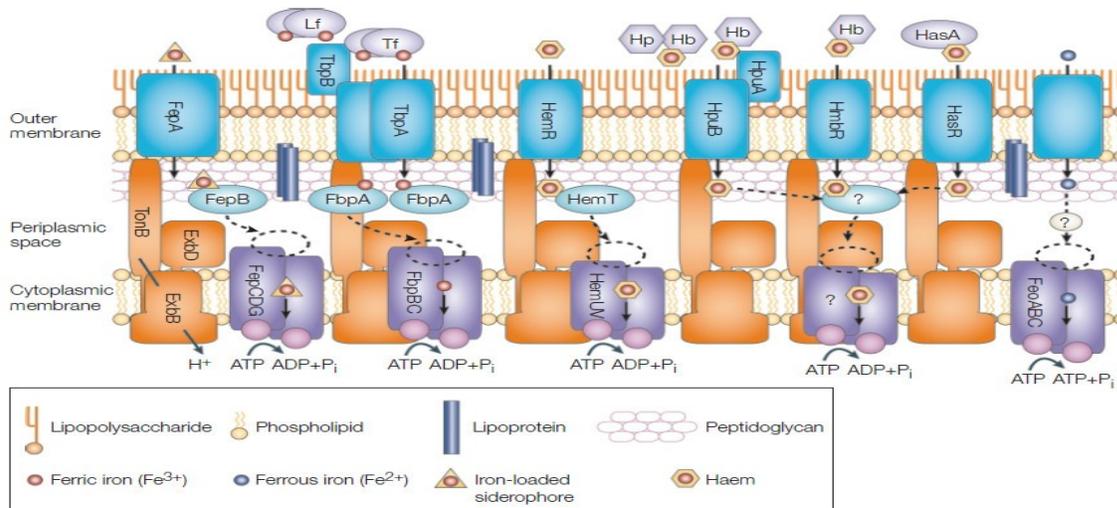


Figura 1: Esquema de la disposición hipotética de las proteínas que intervienen en la captación de hierro en las bacterias Gram negativas (tomado de Faraldo y Sansom 2003)

La homeostasis del hierro cambia durante una infección bacteriana, esto incluye el aumento en la producción de proteínas quelantes de hierro como la transferrina, lactoferrina, hemoglobina, hemopexina, ferritina y albúmina. Varias de estas proteínas se encuentran en el plasma y el líquido linfático (Ganz y Nemeth, 2015).

## La lactoferrina como limitante de hierro

La lactoferrina es una glicoproteína de 80 kDa, monomérica, hémica, está formada por 703 aminoácidos, pertenece a la familia de las transferrinas, y es producida por distintas especies de mamíferos. Tiene diversas funciones, entre ellas la captación de hierro libre, aunque también se ha reportado que es capaz de unir cobre, zinc, manganeso, galio y vanadio. En el cuerpo puede encontrarse en 3 formas, monoférrica, diférrica y libre de hierro. Debido a la similitud en el peso y forma con la transferrina es que están en el mismo grupo. Funciona como un factor humoral no específico que cumple un papel importante en los mecanismos de protección innata de los mamíferos: Se distribuye en secreciones diseminadas en las superficies mucosas que recubren glándulas exocrinas y algunos conductos como el tracto respiratorio, el intestinal y el genitourinario (Ferenc et al., 1995., Drago, 2006).

En el plasma los niveles de lactoferrina son relativamente bajos (0.122-0.040  $\mu\text{g/ml}$ ) en comparación con los niveles encontrados en el calostro (5-7 mg/ml), la leche humana (1-2 mg/ml) y el líquido seminal (1.18-0.74 mg/ml). También se encuentra en niveles altos en la sangre del cordón umbilical (25.8-28  $\mu\text{g/ml}$ ), las lágrimas (2.2 mg/ml) y la mucosa vaginal (62.9-218 $\mu\text{g/ml}$ ). La lactoferrina es producida principalmente por los neutrófilos, aunque se ha reportado que se produce en pequeñas cantidades en otros tipos celulares. La principal función de la lactoferrina en el cuerpo humano aún no ha sido determinada, sin embargo su papel en el metabolismo del hierro está muy bien estudiado así como su regulación en el crecimiento de algunos tipos celulares y posiblemente en la modulación de la adhesión celular. Su rol en los mecanismos de defensa del hospedero va más allá de ser un simple agente bacteriostático. También se ha demostrado que tiene propiedades bactericidas y que puede frenar la proliferación de diversos microbios como los hongos, los virus y algunas bacterias como en las infecciones causadas por *Salmonella enterica* y la septicemia experimental causada por *Escherichia coli* (Ferenc et al., 1995., Barreto et al., 2016., Machniki 1991., Zagulski et al.,1989).

Su efecto bactericida se debe a la lactoferricina B, un péptido proteolítico derivado de la región N-terminal de la lactoferrina. Esto es debido a su acción sobre la membrana externa de las bacterias, afectando su permeabilidad. El daño a la membrana incluye la incorporación de la lactoferrina a la membrana externa y la subsecuente dispersión de los lipopolisacáridos a través de un proceso modulado por cationes ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$  o  $\text{Mg}^{++}$ ) (Bellami et al., 1993, Bellami et al., 1992).

Los microorganismos patógenos no pueden desarrollarse en las mucosas debido a la carencia de hierro, por lo que han desarrollado una serie de estrategias para evadir los ataques de los distintos componentes del sistema inmune y poseen mecanismos para captar el hierro del huésped a partir de las moléculas hemo o de las proteínas transportadoras de hierro y de esta manera tienen una fuente permanente de este metal dentro del hospedero (Bosch, 2003).

Estos mecanismos suelen estar mediados por sustancias muy afines a las moléculas de hierro como los sideróforos (moléculas de bajo peso molecular secretadas por los organismos para captar hierro) con una alta afinidad por el  $\text{Fe}^{+3}$ , o los receptores de hemoglobina y transferrina, los cuales se unen a dichas proteínas y les permiten robar el hierro que contienen. Por su papel en la defensa del hospedero, es importante determinar si los agentes patógenos como *P. multocida* pueden evadir la acción de la lactoferrina y si es posible que pueda ser utilizada como fuente de hierro (Palmer et al., 2015).

Este proyecto pretende determinar y comprender los diversos mecanismos mediante los cuales esta bacteria puede causar infecciones en seres humanos ayudara en un futuro a realizar mejores tratamientos a las personas que se vean afectadas por dicho microorganismo. La gran variedad de hospederos que *P. multocida* puede infectar (se ha aislado de ovejas, búfalos, bueyes, gatos, perros, cerdos, gallinas, pavos, cabras, jilgueros, vacas, gaviotas y humanos entre otros), sus diversos factores de virulencia y la presencia en su superficie celular proteínas que actúen como receptores de lactoferrina humana, hacen que este sea un patógeno a tomarse en cuenta, sobre todo en personas que están constantemente expuestas a los animales antes mencionados (Liu et al., 2003, Ewers et al., 2006).

# Objetivos

## General

- Identificar las proteínas de membrana externa de *P. multocida* capaces de unir lactoferrina humana.

## Particulares

- Identificar y aislar las proteínas de membrana externa capaces de unir lactoferrina humana.
- Comprobar que *P. multocida* puede utilizar lactoferrina humana como fuente de hierro.

# **Materiales y métodos**

## **Bacteria y crecimiento**

Se utilizaron seis cepas de *Pasteurella multocida*: cuatro son aislados de campo, C-18, OV, Cerdo Puebla ,C-3, y las cepas de referencia ATCC 43017 y ATCC 43020 del cepario del laboratorio de Genética de la Unidad de Morfología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. El material de vidrio utilizado se trató con una solución de EDTA al 0.5% durante toda la noche para eliminar el exceso de hierro (este proceso se realizó antes de cada experimento para reducir las fuentes de hierro disponible). Las bacterias se resuspendieron en tubos de ensayo con caldo de Soya Trypticaseína (TSB) donde se dejaron crecer durante un periodo de 5 horas y posteriormente se usó para inocular matraces con 300 mL de caldo TSB (1%), usando un matraz para crecer las bacterias en condiciones de crecimiento normales y otro para las condiciones de estrés por falta de hierro, incubándolas durante un periodo de 16 horas antes de comenzar con el proceso de recolección de las células y la subsecuente extracción de proteínas. Posteriormente para determinar la capacidad de estas cepas de utilizar lactoferrina humana como fuente de hierro, se utilizó un medio mínimo hecho con Casaminoácidos 10 g/L y peptona 1 g/L, derivado del medio YESCA (Hammar et al., 1996). Se inocularon con las bacterias a trabajar. Estos cultivos se realizaron agregando o no dipyrídyil en diferentes concentraciones (0.25, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 y 1.1 mM) para determinar la concentración a usar. Luego se probaron estos medios adicionados con dipyrídyil con distintas concentraciones de FeCl<sub>3</sub> (20µM, 40µM, 60µM, 80µM 100µM) y lactoferrina humana biotinilada y saturada con hierro al 90% (20µg/mL, 40µg/mL, 60µg/mL, 80µg/mL y 100µg/mL). Finalmente se incubaron a 37°C durante 18 horas en agitación constante.

## **Identificación de cepas que interactúan con lactoferrina**

Los cultivos fueron ajustados a una densidad de 1.0 utilizando una absorbancia de 600 nm. Una vez terminado el periodo de crecimiento de la bacteria se realizó un Dot Blot (Abcam 2019) tomando 10 µL de cada cultivo en condición normal o de baja concentración de hierro y se colocaron en una membrana de nitrocelulosa con la ayuda de una micropipeta y se

esperó a que se secase. La membrana se bloqueó con PBS-Tween-leche al 5% y se incubó con lactoferrina humana la cual fue biotinilada de acuerdo al método descrito por Leera et al en 1998; el cual consistió en disolver 1 mg de lactoferrina humana saturada al 90% de hierro en 1 mL de PBS 0.15 M pH7.2 y luego la mezcla fue clarificada mediante centrifugación a 300 rpm x 10 minutos. Después fue dializada con una solución de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 8.2 a 4°C durante toda la noche, fue clarificada de nuevo y mezclada con 1 mg/mL de N-hidroxi succinimidobiotina en dimetilsulfoxido, tras lo cual fue puesta en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Posteriormente fue dializada de nuevo con PBS 0.15 M. pH7.2 y clarificada de nuevo. A la mezcla final se le adiciono un volumen igual de glicerol y se almaceno a -20°C. Esta lactoferrina biotinilada fue usada en una concentración de 1:1000 durante dos horas tras lo cual se lavó con PBS-Tween durante media hora y se incubo con avidina peroxidasa (concentración 1:1000) por otras dos horas; el revelado de la membrana se realizó con diaminobencidinana y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **Extracción de OMP's**

Una vez identificadas las cepas capaces de unir lactoferrina éstas se cultivaron en medio TSB y el medio mínimo Casaminoácidos-peptona para determinar los tiempos óptimos de expresión de la proteína de interés, tanto en presencia como en ausencia de un agente quelante de hierro (Dipyridyl). Las OMP's de las células fueron obtenidas mediante la técnica propuesta por Blackall et al., (1990). Se colectaron las células del cultivo por centrifugación (10500 rpm x 30 minutos), se incubaron por 1 hora con HEPES-Lisozima y se sonicaron en frío con ciclos de 10 segundos de sonicación por 10 de descanso por 3 minutos. Una vez terminada la sonicación, las muestras se centrifugaron (10500 rpm x 2 minutos) para separar las células no rotas. Posteriormente se centrifugo el sobrenadante (10500 rpm x 30 minutos) y la pastilla obtenida se incubo con 200 µL de HEPES 10 mM (pH 7.4) y 200 µL de HEPES (pH 7.4) con 2% (vol/vol) Tritón X100 durante 1-2 h en agitación. La suspensión se centrifugo nuevamente (10500 rpm x 30 minutos) para obtener OMP's insolubles y solubles en Tritón X100.

## **Electroforesis**

Las OMP's extraídas fueron separadas electroforéticamente en gel de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturalizantes. La electroforesis se realizó cargando 20 µg de muestra en cada pozo y 1 de β-mercaptoetanol en una cámara vertical a 95 volts durante aproximadamente dos horas.

Para poder visualizar el patrón de proteínas una vez terminada la electroforesis, el gel fue teñido con una solución de azul de Coomassie (R250) 0.1%, metanol 40% y ácido acético 10% durante 20 minutos. Posteriormente se puso a destefir con una solución de ácido acético al 10% durante 24 horas.

## **Far-Western-blot**

Se realizó una separación electroforética de las OMP's en geles de acrilamida al 10%, corriendo a 95 volts durante un periodo de dos horas. Una vez terminada la electroforesis un gel se tiño con azul de Coomassie durante 20 minutos y otro gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, a 300 mAmp durante 70 minutos.

Una vez terminada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó en PBS-Tween con leche descremada al 5% durante dos horas a temperatura ambiente y en constante agitación, posteriormente se lavó la membrana con PBS-Tween 3 veces durante 10 minutos cada una.

Enseguida, la membrana se incubó con lactoferrina humana biotinilada en proporción 1:1000 durante un periodo de 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. Nuevamente se lavó con PBS-Tween 3 veces durante 10 minutos cada una para retirar el exceso de lactoferrina humana.

Por último se incubó con avidina peroxidasa en proporción 1:1000 con las mismas condiciones. Después de los lavados, la interacción de la lactoferina con las OMPs fue

evidenciada utilizando una solución reveladora hecha con ácido fosfórico, cloruro de níquel y cobalto, diaminobenzidina y agua oxigenada.

## **Purificación de la proteína que une lactoferrina humana**

Una vez identificada esta proteína, se procedió a purificarla mediante electro elución de proteínas. La técnica original descrita por Rosemberg (1996) fue modificada para ajustarse a las necesidades de este trabajo. Las OMP's de la bacteria se separaron en geles de acrilamida al 10%, terminada la corrida electroforética los geles se sumergieron en una solución de KCl 0.3 M fría por 5 minutos, una vez identificada la banda de interés, se cortó con un bisturí y las bandas seleccionadas se electroeluyeron durante una hora a 100 V. El buffer usado para la electro elución, conteniendo la proteína eluida, se recuperó y precipito con dos volúmenes de metanol. La pureza de la proteína se corrobora por corrimiento electroforético.

## **Análisis mediante Matrix-Assisted Laser Desroption/Ionization(MALDI-TOF)**

Con el fin de identificar la proteína de *P. multocida* que tuvo interacción con lactoferrina humana, se realizaron geles de poliacrilamida al 10% usando las muestras de OMP's de cultivos adicionados con quelante. La banda de interés fue cortada y electroeluida, posteriormente se realizó una digestión con tripsina, los péptidos fueron sometidos a análisis MALDI-TOF en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (Montes-Garcia et al., 2016).

## **Crecimiento de la bacteria en un medio con lactoferrina humana como fuente de hierro**

Para comprobar que *P. multocida* puede usar lactoferrina como fuente de hierro primero se determinó la concentración máxima de dypyridyl a la que *P. multocida* puede crecer. Para esto se usó un medio mínimo con la menor cantidad de hierro posible, para lo cual se

preparó medio Casaminoácidos-peptona disueltos en agua desionizada (10 g Casaminoácidos por litro, 1 g de peptona por litro) y se puso en tubos de 3 mL, previamente tratados con EDTA al 0.5% durante una noche, en los que se probaron concentraciones de dipyridyl de 0.25, 0.3 0.5, 0.7, 0.9 y 1.1 mM y se incubaron a 37°C en agitación durante 18 horas. Se midió la absorbancia del cultivo a 600 nm a las 18 horas.

Una vez determinada la concentración de dipyridyl en la que se generaba una baja concentración de hierro, se probaron concentraciones de FeCl<sub>3</sub> (20, 40, 60, 80, 100, µM) en el medio antes mencionado para encontrar una concentración en la que el crecimiento fuera similar al del control sin agente quelante y se demostrara que la reducción de crecimiento era provocada por la ausencia de hierro y se incubaron a 37°C en agitación durante 18 horas. Una vez alcanzadas las 18 horas se midió la absorbancia a 600nm.

Posteriormente se probaron distintas concentraciones de lactoferrina humana (20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL) para determinar si la bacteria es capaz de obtener hierro a partir de esta proteína. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación durante 18 horas, al término de las cuales se midió la absorbancia a 600nm.

## **Resultados**

### **Efecto de 2,2' dipyridil en el crecimiento de *P. multocida***

El crecimiento de la cepa *P. multocida* 43020 en medio TSB en presencia de 2,2' dipyridyl 0.3 mM durante 9 horas indujo una reducción en el crecimiento de aproximadamente el 30% a respecto al control sin adición del quelante esto puede observarse en la Figura 2.

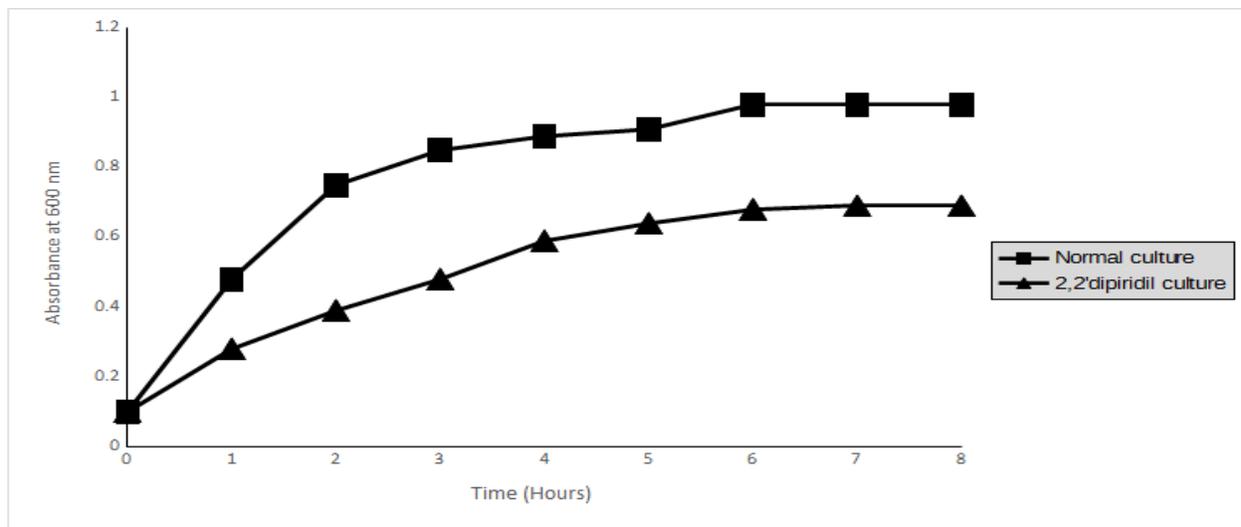


Figura 2: Crecimiento de *P. multocida* ATCC 43020 en medio TSB en ausencia y presencia de 2,2'dipiridil

## Dot blot con lactoferrina humana

Una vez determinada la reducción del crecimiento de la bacteria en condiciones de estrés por hierro se realizó el dot blot a partir de cultivos en medio TSB donde se observó que de las 6 cepas utilizadas en el estudio, solo las 43020 y 43017 mostraron afinidad por lactoferrina, como se puede observar en la Figura 3.

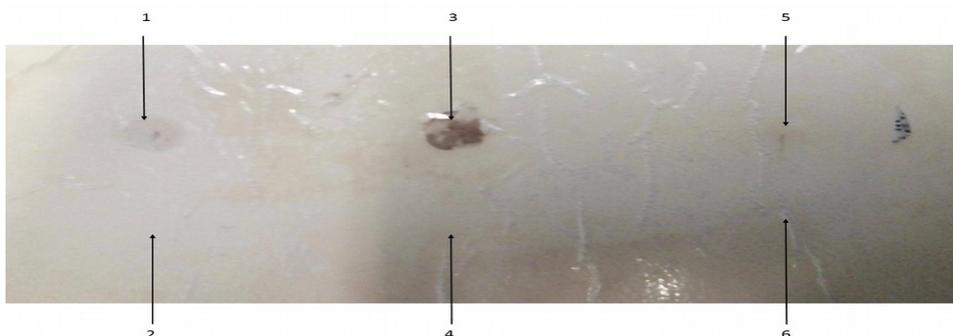
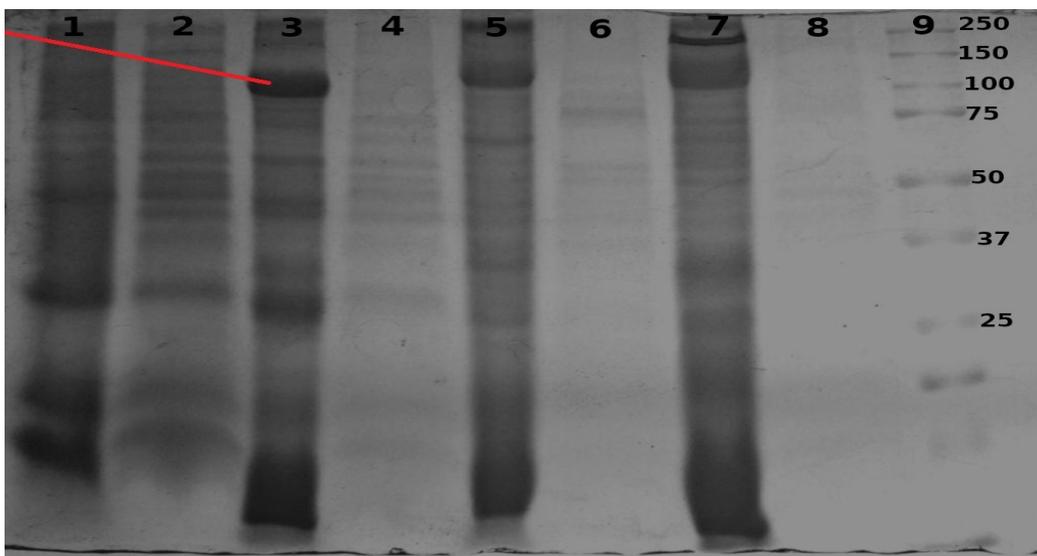


Figura 3: Dot blot en que se muestra la interacción de *P. multocida* con lactoferrina humana biotinilada. Carriles 1 y 2 *Pm* 43017; 3 y 4 *Pm* 43020; 5 y 6 *Pm* C-3. Carriles 1, 3 y 5 *Pms* crecidas en presencia de 2,2' dipiridyl; 2, 4 y 6 sin 2,2'dipiridyl.

## Obtención de patrones de OMP's

Para poder visualizar la posible proteína que interaccionaba con lactoferrina biotinilada, se realizaron cultivos en el medio mínimo de Casaminoácidos y peptona, en el cual se agregó una concentración de 0.3 mM de 2,2' dipiridyl para generar un estrés por la escases de hierro e inducir la sobre expresión de proteínas relacionadas con la captación de este elemento.

Posteriormente se extrajeron OMP's de las cepas 43020 y 43017 y se realizó una electroforesis en un gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 10% para observar el patrón de proteínas y las diferencias entre la condición de crecimiento normal y la de estrés por hierro con 0.3 mM de dipiridyl. Los patrones de proteínas se pueden observar en la Figura 4.



*Figura 4: Patrones de proteínas De Pm C-3, 43020, 43017 y C-18 En los carriles impares patrones obtenidos en presencia de dipiridyl; En carriles pares patrones obtenidos en condiciones normales. La linea roja marca la banda de interes.*

Como se puede observar, en la condición de estrés por hierro se expresan proteínas que no se encontraban en la condición normal. En los carriles correspondientes a las proteínas de la cepa 43020 se observa una banda de alrededor de 100 kDa. Dicha proteína también puede observarse en los carriles que pertenecen a la cepa 43017. Posteriormente se realizó

una cinética de crecimiento de la cepa 43020 con el fin de determinar en qué momento se comienza a sobre expresar la proteína de interés y se observó que la sobre expresión comienza en la segunda hora del cultivo y se mantiene a lo largo del tiempo.

## Far western blot con Lactoferrina humana y purificación.

Debido a la diferencia más marcada entre las dos condiciones se decidió trabajar con la cepa 43020, a cuyas OMP's se les realizó un Far-Western blot para ver si esta proteína y algunas otras presentes en la muestra eran afines a lactoferrina humana y como puede observarse, hay una notoria interacción de la proteína sobre expresada en la condición de estrés por hierro con la lactoferrina humana. También se puede observar una ligera interacción con una proteína de al rededor 50 kDa (Figura 5) Posteriormente se purificó la proteína de interés mediante la técnica de electroelución, utilizando OMP's de la cepa 43020, como se puede observar en la Figura 6 donde se muestra como la proteína de interés fue aislada.

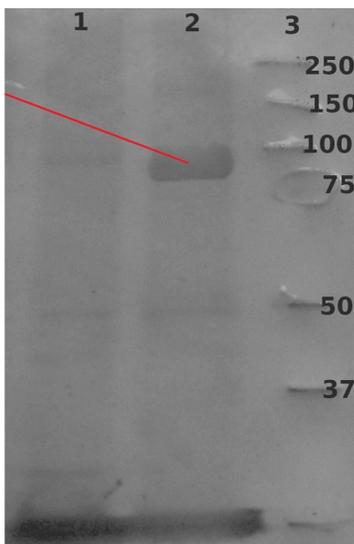


Figura 5: Far-Western blot de OMP's de *P. multocida* 43020 en presencia de lactoferrina. 1. OMP's insolubles en condiciones normales, 2. OMP's insolubles en condiciones de estrés por hierro, 3. Marcador de peso molecular. La línea roja muestra la banda de interés

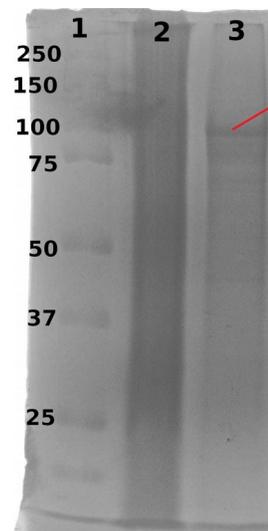


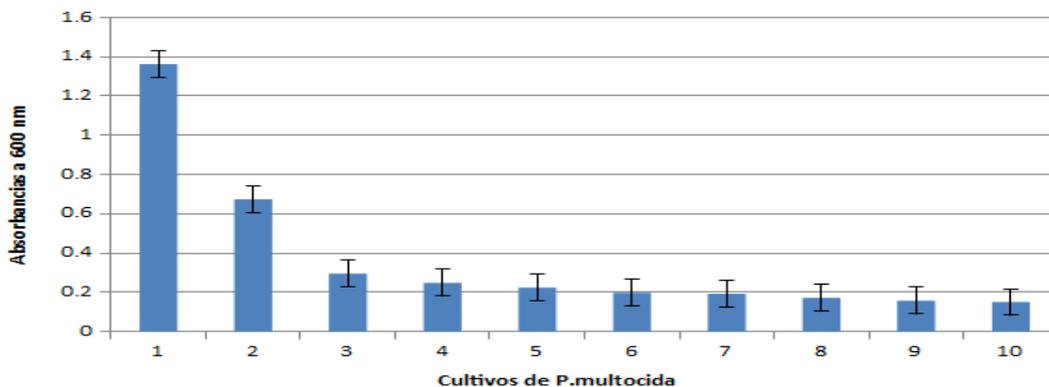
Figura 6: Purificación de la proteína de interés. 1) Marcador de Peso molecular 2) OMP's sin purificar 3) Proteína de interés purificada. La línea roja marca la proteína de interés

## Identificación de la proteína mediante MALDI-TOF

De acuerdo con el análisis realizado mediante la técnica MALDI-TOF a la proteína que se sobre expone en condiciones de crecimiento en baja concentración de hierro, se obtuvo que la proteína de la bacteria *P. multocida* ATCC 43020 de 96.127 kDa presenta homología con una Aldehído-alcohol deshidrogenasa de *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica con un porcentaje de confianza de 66% y un índice de cobertura de 43.3%. Su código de acceso es ADHE\_ECOLI (P17547).

## Crecimiento de *P. multocida* con lactoferrina humana como fuente de hierro

Primero se realizó una cinética de crecimiento en el que se usó el medio mínimo Casaminoácidos y peptona, en el cual se agregaron distintas concentraciones de 2,2' dipiridyl y que como puede observarse en la Figura 7 el crecimiento de la bacteria se reduce de manera importante a partir del tratamiento con 0.25 mM del quelante mencionado.



*Figura 7: Crecimiento de P. multocida en presencia de 2'2' dipiridyl en medio mínimo casaminoácidos-peptona (carriles 3 a 10) o en medio TSB o Cas-Pep sin 2'2' dipiridyl (carril 1 y 2, respectivamente). Carriles 3 a 10 contienen 2'2' dipiridyl en concentraciones de 0.25 (3), 0.3 (4), 0.4 (5), 0.5 (6), 0.6 (7), 0.7 (8), 0.8 (9) o 0.9 mM (10).*

Luego se realizaron dos cinéticas de crecimiento para las cepas ATCC 43020 y el aislado C3 donde se utilizó un medio mínimo adicionado con 0.3 mM 2,2'dipiridyl y la cristalería utilizada fue tratada con EDTA para eliminar el hierro presente en ella. Por un lado se utilizó

FeCl<sub>3</sub> para determinar que la adición de este hace que el crecimiento de la bacteria se recupere como se observa en la Figura 8 y 9.

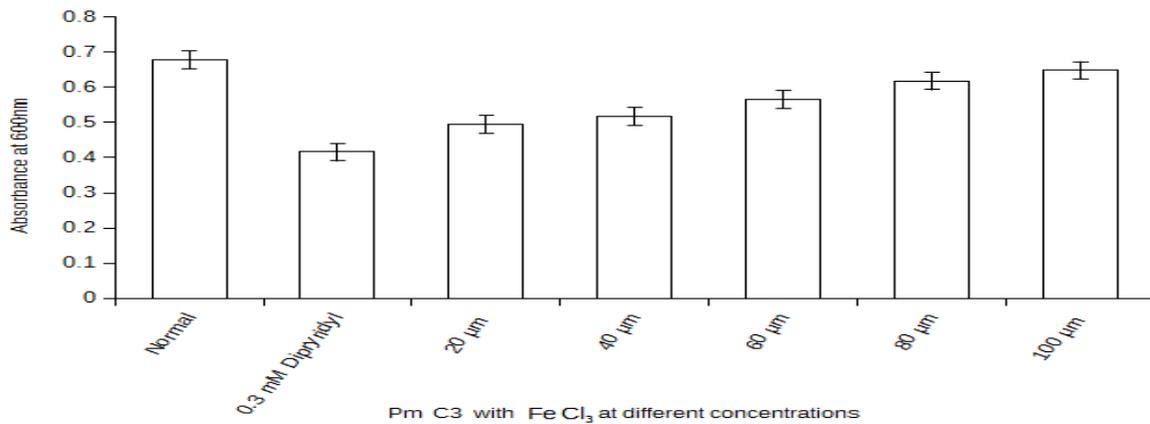


Figura 8: Crecimiento de *P. multocida* C3 con distintas concentraciones de cloruro de hierro. 1) Control sin adiciones 2) Control + 0.3 mM 2,2' dypiridil 3) 0.3 mM 2,2' dypiridil +20 µM de FeCl<sub>3</sub> 4) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 40 µM de FeCl<sub>3</sub> 5) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 60 µM de FeCl<sub>3</sub> 6) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 80 µM de FeCl<sub>3</sub> 7) 0.3 mM 2,2' dypiridil +100 µM de FeCl<sub>3</sub>

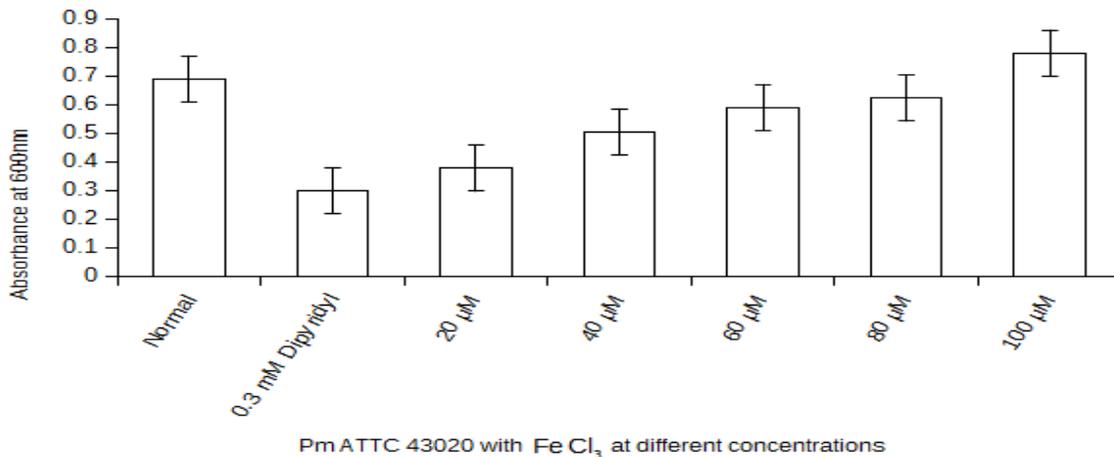


Figura 9: Crecimiento de *P. multocida* 43020 con distintas concentraciones de cloruro de hierro. 1) Control sin adiciones 2) Control + 0.3 mM 2,2' dypiridil 3) 0.3 mM 2,2' dypiridil +20 µM de FeCl<sub>3</sub> 4) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 40 µM de FeCl<sub>3</sub> 5) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 60 µM de FeCl<sub>3</sub> 6) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 80 µM de FeCl<sub>3</sub> 7) 0.3 mM 2,2' dypiridil +100 µM de FeCl<sub>3</sub>

Como se puede observar, en ambas cepas el crecimiento de la bacteria se recupera gradualmente conforme aumenta la cantidad de cloruro de hierro. Para averiguar si *P. multocida* puede obtener hierro a partir de lactoferrina se crecieron ambas cepas en medios de cultivo con distintas concentraciones de lactoferrina saturada al 90% con hierro, como única fuente de este metal, obteniéndose los resultados de la Figura 11 y 12.

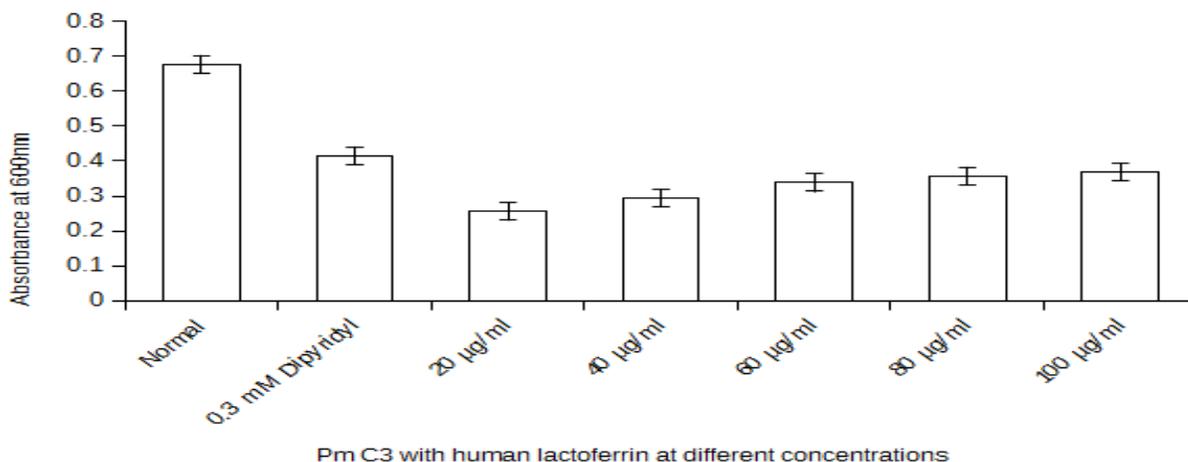


Figura 10: Crecimiento de *P. multocida* C3 con distintas concentraciones de lactoferrina saturada al 90% con hierro. 1) Control sin adiciones 2) Control + 0.3 mM 2,2' dypiridil 3) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 20 µg/mL de lactoferrina 4) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 40 µg/mL de lactoferrina 5) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 60 µg/mL de lactoferrina 6) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 80 µg/mL de lactoferrina 7) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 100 µg/mL de lactoferrina.

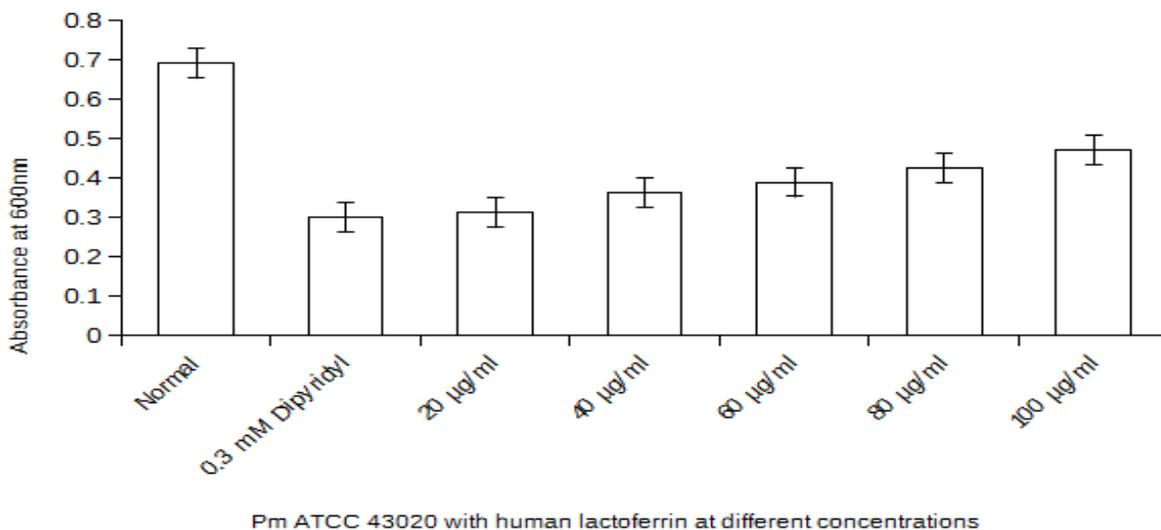


Figura 11: Crecimiento de *P. multocida* 43020 con distintas concentraciones de lactoferrina saturada al 90% con hierro. 1) Control sin adiciones 2) Control + 0.3 mM 2,2' dypiridil 3) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 20 µg/mL de lactoferrina 4) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 40 µg/mL de lactoferrina 5) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 60 µg/mL de lactoferrina 6) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 80 µg/mL de lactoferrina 7) 0.3 mM 2,2' dypiridil + 100 µg/mL de lactoferrina.

Como puede observarse, en la cepa ATCC 43020 a partir del segundo tratamiento (40 µg/mL de lactoferrina) se puede ver un aumento en el crecimiento del cultivo, comparado con el control con 2,2'-dipyridyl hasta recuperar aproximadamente el 69% de su crecimiento respecto a los cultivos en condiciones normales.

En el caso del aislado C3 puede observarse que en ninguna de las concentraciones de lactoferrina humana añadidas el crecimiento de la bacteria se recuperó por encima del crecimiento del control con 2,2'-dipyridyl, incluso se observó que el crecimiento de la bacteria disminuyó con la adición del primer tratamiento con lactoferrina humana.

## Discusión

Como ya se mencionó, *P. multocida* es un patógeno oportunista capaz de infectar una gran cantidad de hospederos como ovejas, búfalos, bueyes, gatos, perros, cerdos, gallinas, pavos, cabras, jilgueros, vacas, gaviotas y humanos entre otros. El que una bacteria sea capaz de infectar a un hospedero depende de su capacidad para evadir los mecanismos específicos que regulan los niveles de hierro desarrollados por el hospedero y obtener este elemento (Wooldridge et al., 1993, Ganz et al., 2015, Ratledge et al., 2000).

Debido a esto, los microorganismos han desarrollado una gran cantidad de mecanismos de captación de hierro, siendo de los más comunes las proteínas de unión a lactoferrina o transferrina (LBP's y TBP's por sus siglas en inglés). Los miembros de la familia *Pasteurellaceae* se incluyen entre estos microorganismos. Sin embargo, en diferentes microorganismos se ha observado la participación de proteínas expresadas en la superficie bacteriana que no pertenecen a las LBP ni a las TBP. En *E. coli* enteropatógena y otros entero-patógenos se ha observado la participación de porinas como OmpA y OmpC en los procesos de obtención de hierro a través de transferrina, lo cual indica que estas proteínas pueden realizar múltiples funciones. (Sandrini et al., 2013)

La presencia de este tipo de proteínas ha sido descrita en varios organismos y se ha observado que tienen una variedad de funciones muy amplia, pero estas funciones dependen de la localización de la proteína (Ebner y Götz 2019)

Los mecanismos de captación de hierro desarrollados por una bacteria son también una limitante, ya que generalmente le permite infectar un solo tipo de hospedero. Algunos casos son el de *Staphylococcus aureus* el cual ha mostrado que puede obtener hierro de la hemoglobina humana de una forma muy eficiente en comparación con la hemoglobina de otros animales. En *M. haemolytica*, que es uno de los agentes causales del síndrome respiratorio bovino, es capaz de utilizar transferrina bovina como fuente de hierro, pero incapaz de utilizar otras transferrinas, como la humana, porcina o equina. De forma similar sucede con *A. pleuropneumoniae*, agente causal de la pleuroneumonía porcina contagiosa, el cual puede utilizar transferrina porcina como fuente de hierro, pero no otros tipos de transferrina (Pishchani et al., 2010, Ogunnariwo y Schryvers, 1990, Bossé et al., 2002).

Las proteínas moonlight o multifuncionales son aquellas capaces de realizar más de una función en la célula en la que se encuentran. Suelen ser proteínas que originalmente solo tenían funciones enzimáticas, pero que por distintas razones han adoptado otras funciones entre las que se encuentran las de señalizador transduccional, regulador transcripcional, motilidad y estructurales (Jeffery 1999).

En este trabajo se demostró la capacidad de *P. multocida* para interactuar con lactoferrina humana y usarla como fuente de hierro. Esta actividad está relacionada con la presencia de la enzima Aldehído-alcohol deshidrogenasa (ALD por sus siglas en inglés) en su citoplasma y se tiene constancia de que esta proteína participa en el metabolismo del alcohol. Sin embargo existen evidencias de que en otros organismos tiene distintas funciones; en *Listeria monocitogenes* se reportada su función como adhesina debido a su sobreexpresión y acumulación en la superficie celular de dicho organismo. En *E. coli* enterohemorrágica parece tener una función reguladora, ya que la delección del gen que codifica esta proteína induce una concentración extra celular elevada de acetato en la superficie bacteriana y un fenotipo en el cual se observa un sistema de secreción tipo 3 y la sobreexpresión de un flagelo no funcional. En el parásito *Entamoeba histolytica* también se observa una proteína homóloga que funciona como adhesina mediante la interacción con los elementos de la matriz extra celular. En la homóloga de *Streptococcus pneumoniae* se observó que su actividad está relacionada con la supervivencia en la sangre, mediante la actividad en contra

del estrés por ácido nítrico (Stroeher et al., 2007, Yang et al., 1994, Beckham et al., 2014, Jagadeesan et al., 2010).

Con la realización del dot-blot con lactoferrina humana saturada al 90% con hierro se observó que la cepa ATCC 43020 de *P. multocida* interactuaba con esta proteína. Por otro lado, se observó que el aislado C3 no interactuaba con dicha proteína. En estos cultivos, en los que se usó el medio Casaminoácidos-peptona y el agente quelante 2,2' dipiridyl, también se observó una reducción en el crecimiento de las bacterias. También se encontró que en las condiciones de estrés por hierro se sobre expresaba una proteína de 96.127 kDa.

Con la realización del Far-western blot, se observó que una proteína de 96.127 KDa era la responsable de la interacción con lactoferrina la cual fue identificada como una aldehído-alcohol deshidrogenasa que posiblemente pertenezca a la familia de alcoholes deshidrogenasas con hierro como cofactor, muy afín por este metal y con la capacidad de unir 2 átomos del mismo en el caso específico de esta proteína.

Por último, al crecer la cepa ATCC 43020 en un medio con baja concentración de hierro, cuya única fuente de este metal fue lactoferrina humana, se observó que dicha cepa es capaz de recuperar su crecimiento hasta llegar a un 68.01% con respecto a los cultivos donde no hubo deficiencia de hierro. Si bien no recuperó completamente el crecimiento, el organismo en cuestión es capaz de usar lactoferrina humana como fuente de hierro, proteína que se encuentra en la mayoría de las mucosas de los seres humanos por lo que, tomando en cuenta que la mayoría de los procesos infecciosos causados por esta bacteria en seres humanos están relacionadas con heridas causadas por animales domésticos, exposición a fluidos nasales y personas con sistemas inmunes comprometidos, es posible que esta ALd pueda tener un papel importante en los procesos infecciosos causados en humanos y sería prudente seguir investigando para determinar si esta proteína pueda tener más funciones dentro de los procesos de infección en seres humanos .

## • Conclusiones

- Se encontraron dos cepas de *P. multocida* (ATCC 43020 y ATCC 43017) capaces de interactuar con lactoferrina humana.

- Mediante un Far-western-blot se determinó que una proteína de alrededor de 100 KDa era la responsable de la interacción con lactoferrina.
- Se purificó una proteína de 96.127 KDa de la cepa ATCC 43020 que resultó ser una aldehído-alcohol deshidrogenasa con hierro como cofactor.
- La lactoferrina humana saturada con hierro en una concentración de 40 µg/ml induce la recuperación del crecimiento de *P. multocida* 43020 en un medio con escasas de hierro.
- Se demostró que la cepa ATCC 43020 de *P. multocida* es capaz de usar la lactoferrina humana como fuente de hierro.

## • Referencias

Abcam Dot Blot Protocol: <https://www.abcam.com/protocols/dot-blot-protocol>

Arnold, R.R., Cole, M.F., McGhee, A., (1977); Bactericidal effect for human lactoferrin. Science(197): 263-5.

Baillie, W.E., Stowe, E.C., Schmitt, A.M., (1978); Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. Journal of Clinical Microbiology(7): 223-231

Beckham, K.S., Connolly, J.P., Ritchie, J.M., Wang, D., Gawthorne, J.A., Tahoun, A. Beatson, S.A., (2014); The metabolic enzyme AdhE controls the virulence of E scherichia coli O 157: H 7. Molecular microbiology, 93(1): 199-211

Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawaze, K., Tomita, M., (1992); Antibacterium spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. Journal of Applied Bacteriology(73): 472-9.

Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S., Tomita, M., (1993); Killing of *Candida albicans* by lactoferrin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med. Microbiol Immunol*(182): 97-105.

Blackall, P., J., Rogers, D., G., and Yamamoto, R., (1990); Outer-Membrane Proteins of *Haemophilus paragallinarum*, *Avian diseases*(34): 871-877

Bosch, M., (2003). Caracterización de los mecanismos de captación de hierro de *Pasteurella multocida*. Tesis de doctorado. Departamento de genética y microbiología. Universidad de Barcelona. 110 pág.

Bossé, T., J., Janson, H., Sheehan B., J., Bedek A., J., Rycroft N., A., Kroll J. S., (2002); *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and infection*(4): 225-235.

Boyce, J.D., Harper, M., Wilkie, I. W., Adler, B., (2010); *Pasteurella*. En Prescott, J.F.(Ed) *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Blackwell Publishing, IA, USA.

Burabaev, A., Yessirkepov. M.(2014); Studying on pasteurellosis agent isolated from died saiga antelope. *Life Science Journal*, (11):400-407

Castellanos, R., Guevara, M., Robinson R., L. (2000); Respuestas inmunes innata y adaptativa. *MEDISAN* (4): 64-74.

Dabo, S., M., Confer A., W., Hartson S., D., (2005); Adherence of *Pasteurella multocida* to fibronectin. *Veterinary Microbiology*. (110): 265–275.

De los Santos, S., Gonzales, A., Capote, F., Lopez-Mejias, J., Fernandez, P., (1987); Neumonía por *Pasteurella multocida*. *Archivos de Bronconeumología*. (23): 35-36

Dire, D., J.,(1991); Cat Bite Wounds: Risk Factors for Infection. *Annals of emergency medicine.* (20): 973-979

Drago, M., (2006); Actividades antibacterianas de lactoferrina. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología.* (26): 58-63.

Ebner P, Götz F (2019); Bacterial excretion of cytoplasmic proteins (ECP): Occurrence, mechanism, and function. *Trends Microbiol* (27): 176-187.

Ewers, C., Lübke-Becker, A., Bethe, A., Kießling, A., Filter, M., Wieler, H., L., (2006); Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strain isolated from different hosts with different disease status. *Veterinary Microbiology* (114): 304-317

Faraldo, J., D., y Sansom, M., S., (2003); Acquisition of siderophores in Gram- negative bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* (4): 105-116

Fernec, L., P., Vilijoen, M., (1995); Lactoferrin: A general review. *Hematologica,* (80): 252-267

Food and Agriculture Organization of the united Nations (2015); Global Animal Disease Intelligence Report No.2, Rome, Italy.

Ganz, T., Nemeth, E., (2015); Iron homeostasis in host defence. *Nature Reviews Immunology.* Publicado en linea.

Harper M., Boyce J. D., Adler B.,(2006); *Pasteurella multocida* pathogenesis:125 years after Pasteur. *Federation of European Microbiological Society Microbiology Letters* (265):1–10

Hátfaludi, T., Al-Hasani, K., Boyce, J., D., Adler, B., (2010); Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology.* (144): 1-17

Jagadeesan B., Koo O.K., Kim K.P., Burkholder K.M., Mishra K.K., Aroonual A., Bhunia A.K., (2010); LAP, an alcohol acetaldehyde dehydrogenase enzyme in *Listeria*, promotes

bacterial adhesion to enterocyte-like Caco-2 cells only in pathogenic species. *Microbiology* (156): 2782-2795.

Jeffery, C.J., (1999); Moonlighting proteins. *Trends in biochemical sciences*, (24): 8-11.

Kobenik, R., Locher K.P., Van Gelder, P., (2000); Structure and function of bacterial outer membrane proteins: Barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*. (37): 239-253

Koshemetov, Z., Sandybayev, N., Sansyzybay, A, Orynbayev, M., Khairullin, B., Nurabayev, S., Matveyeva, V., Bogdanova, V., Sugirbaeva, G., Seisenbayeva, M.,

Kuhnert P., Christensen H., (2008); *Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects*. Horizon Scientific Press.

Liu, W., Chemaly, R., Tuohy, M., LaSalvia, M., Procop, G. (2003); *Pasteurella multocida* Urinary tract Infection with molecular evidence of zoonotic transmission. *CID* 36: 58-60.

Machnicki, M.,(1991); Biological properties of lactoferrin. *Folia Biologica*. (37):65-76.

Mateos F., Brock J. H., Pérez-Arellano J. L. (1998); Iron metabolism in the lower respiratory tract. *Thorax*. (53) :594–600

Meylan E., Tschopp J., Karin M.,(2006); Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* (7098): 39-44.

Montes-Garcia J.F., Vaca P.S., Vazquez C.C., Soriano V.E., Aguilar R.F., Blackall P.J., Negrete A.E., (2016); Identification of hemagglutinin from *Gallibacterium anatis*. *Current Microbiology*. (72): 450-456

Namioka, S. (1978); *Methods in Microbiology*, Sapporo, Japon, Elsevier.

Organización Mundial de la Salud Animal. [www.oie.int](http://www.oie.int)

Ogunnariwo J.A., Schryvers A.B., (1990); Iron acquisition in *Pasteurella haemolytica*: expression and identification of a bovine-specific transferrin receptor. *Infection and Immunity* (58): 2091-2097.

Ogunnariwo J.A., Schryvers A.B., (2001); Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. *Journal of Bacteriology* (183): 890–6.

Ogunniyi A.D., LeMessurier K.S., Graham R.M., Watt J.M., Briles D.E., Stroehrer U.H., Paton J.C. (2007), Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), and PspC to pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a mouse model. *Infection and immunity*, (75), 1843-1858

Peel, M.M.,(1993); Dog-associated bacterial infections in humans: isolates submitted to an Australian reference. *Pathology*. (25): 379-384

Pishchany G., McCoy A.L., Torres V.J., Krause J.C., Crowe Jr J.E., Fabry, Skaar E.P. (2010); Specificity for human hemoglobin enhances *Staphylococcus aureus* infection. *Cell Host & Microbe* (8): 544-550

Pogoutse A.K., Moraes T.F., (2017); Iron acquisition through the bacterial transferrin receptor, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. Publicado en línea

Raphael G.,D., Davis J.,L., Fox, P.,C., (1989); Glandular secretion of lactoferrin in a patient with neutrophil lactoferrin deficiency. *J Allergy Clin Immunol*; 84:914-9.

Ratledge C and Dover L.G. (2000); Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Ann Rev Microbio*. 54: 881-941.

Rosenberg, M. I. (1996); *Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques*, Birkhäuser Boston, 520 pp

Rubio-Clemente, A., Chica, L., E., Peñuela, G., A., (2014); Aplicacion del proceso Fenton en el tratamiento de aguas residuales de origen petroquimico. *Ingenieria y competitividad*. 16(2): 211-223

Sandrini S, Masania R, Zia F, Haigh R, Freestone P (2013); Role of porin proteins in acquisition of transferrin iron by enteropathogens. *Microbiology* 159: 2639–2650

Stroeher, U. H., Kidd, S. P., Stafford, S. L., Jennings, M. P., Paton, J. C., & McEwan, A. G. (2007); A pneumococcal MerR-like regulator and S-nitrosoglutathione reductase are required for systemic virulence. *Journal of Infectious Diseases*, 196(12), 1820-1826.

Talan, D. A., Citron, D. M., Abrahamian, F. M., Moran, G. J., Goldstein, E. J. C.,(1999); Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. *The New England Journal of Medicine*. 340: 85-92

Talley, P., Snippes-Vagnone, P., Smith, K., (2016); Invasive *Pasteurella multocida* Infections – Report of Five Cases at a Minnesota Hospital, 2014. *Zoonoses and Public Health*. 63: 431-435

Tortora G.,J., Berdell R., Funke B.,R., yCase C.,L.,(2007); Mecanismos de patogenicidadbacteriana. *Introducción a la microbiología*. 9a. Ed. Editorial Panamericana.

Trigo, F. (1987); El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Ciencia Veterinaria*. 4:1-35

Vilde JL, Breton Gorius J, Hakim J, Buriot D, Griscelli C.(1982); Congenital and acquired lactoferrin deficiencies in neutrophils. *Adv Exp Med Biol*; 141:611-20.

Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison RT(1993); Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun*. 61: 719-28.

Yang, W., Li, E., Kairong, T., & Stanley Jr, S. L. (1994); *Entamoeba histolytica* has an alcohol dehydrogenase homologous to the multifunctional adhE gene product of *Escherichia coli*. *Molecular and biochemical parasitology*, 64(2), 253-260

Wilson B.A., Ho M. (2013); *Pasteurella multocida*: from Zoonosis to Cellular Microbiology, *Clinical Microbiology Reviews* (26): 631– 655

Wilks, A., Burkhard, A.K., (2016); Heme and virulence: how bacterial pathogens regulate, transport and utilize heme, *Natural Products Reports* (24): 511-522

Wooldridge, G., K., Williams, P., H.,(1993); Iron uptake mechanisms in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 325-348

Zagulski T, Lipinski P, Zagulska A, Broniek S, Jarzabek Z.(1989); Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection *in vivo*. *Br J Exp Pathol*. 70: 697-704.

## Apéndice 1

### Preparación de gel de acrilamida al 10%

Gel separador 10%	mL
Agua destilada	4
Acrilamida	3.3
Tris pH 8.8	2.5
SDS 20%	0.1
NaCl 20%	0.2
PSA 10%	0.04
TEMED	0.008

Gel concentrador	mL
Agua destilada	1.4
Acrilamida	0.33
Tris pH 6.8	0.25
SDS 10%	0.02
PSA 10%	0.02
TEMED	0.001