



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA
Gallibacterium anatis 12656-12 MUTANTE Ω fur”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

IVÁN ENRIQUE YÁÑEZ AGUILAR



DIRECTOR DE TESIS:
DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. Méx. 2022



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.

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Genética de la UMF
de la Facultad de Estudios superiores Iztacala, UNAM
y fue financiado por
DGAPA-PAPIIT-UNAM IN219919

Si un perdedor hace muchos esfuerzos, puede que supere a una persona distinguida.

--Son Gokú--

Dedicatorias.

A mis padres, Blanca y Enrique y a mis hermanas, Estela y Lady (Q. E. P. D.) por sus esfuerzos para que yo pudiera terminar una carrera y por su paciencia, no fue fácil, pero lo logramos.

A mi madre, Blanca, por todo el apoyo y comprensión que me has dado y por haberme educado tan bien desde el día que nací hasta la fecha.

A mi padre, Enrique, por todo el esfuerzo y dedicación que diste durante mi educación desde que nací hasta el día de mi graduación.

A mis tíos, Guillermo, Francisco, Luis, Antonio, Rafael y Rubén por todo el apoyo que me dieron a mí y a mi familia, sin ustedes no lo habría logrado, muchas gracias.

A mi tío Guillermo, quien a pesar de no ser mi padre me dio muchos valiosos consejos y apoyo más allá de lo que debía dar.

A mi tío Luis, quien junto a su familia cuidó de mi padre cuando se recuperaba de la operación del corazón, estaré agradecido con ustedes hasta mi muerte.

A mi abuela, Guadalupe (Q. E. P. D.) quien fue como una segunda madre para mí y me cuidó hasta el último de sus días, no existen palabras para agradecerte.

A mi abuelo Modesto (Q. E. P. D.) quien me enseñó a ser un hombre honrado, honesto, trabajador y a nunca rendirme y quien también veló por mí hasta que su cuerpo pudo.

A los que ya no están aquí, les pido disculpas por no haber logrado esto antes de sus partidas, pero, por lo menos, sus esfuerzos no fueron en vano, vivo mi vida siguiendo sus ejemplos lo mejor que puedo.

A los que siguen aquí, gracias por seguir dándome todo su apoyo y confianza, sin cualquiera de ustedes, esto no habría sido posible.

Mi vida es de todos los que aportaron a esto, no la desperdiciaré.

Muchísimas gracias.

Agradecimientos

A mis amigos, Nancy, Adriana y Luis, por su eterna amistad, donde quiera que estemos siempre seremos amigos.

Agradezco a los mejores amigos que pude tener en el CCH; Paco, Luis (Fidoberto) y Oswaldo, con ustedes viví la mejor época de mi vida hasta ahora y gracias por su amistad y apoyo, viejos, son los mejores.

A mis compas del alma, Azucena, Cristina, Christian, Amauri, Sandy, Mabel y Cesar, no tienen una idea de lo importantes que son para mí, todo lo que hicieron por mí, desde sacar las kawasakis hasta impulsarme a superar mis límites día tras día, gracias por todo su cariño, bola de chingones, los quiero 1000 8000.

A los grandes compitas que hice en el lab, Francisco (francis), Pam y Dianita, son la cabula, amigos, y gracias por ayudarme siempre con mis experimentos porque estoy medio wey.

Y a muchos amigos más que también me trajeron hasta aquí, Jannis, Citlalli, Vianney, Rodrigo, Carlos (Oscar plantas), Daniel (Leónidas ó Dr. Muerte), July (la wera), Omar (el chino), Andrés (el Apu), Miriam (sopitas), Oscar (el porro), Emma, y Karla (pichi).

Al profesor que hizo que me interesara por las artes oscuras de la Biología, Gabriel Tejeda, gracias a usted soy Biólogo y espero ser el mejor para no fallarle, gracias por su apoyo.

A mis profesores de CCH, Ricardo, Goyo, Julio, Diego, Angélica y Dolores, quienes me enseñaron a no ser un niño tonto y de que trata la ciencia.

Y por último a mis profesores de la FES I quienes me enseñaron hasta que logré aprender todo lo que es necesario para ser un excelente profesionista, incluyendo a mi todo poderoso tutor de tesis, el Dr. Erasmo (Mr. Increíble), gracias doc, usted me vio fracasar miserablemente y me ayudó a corregir y a pulir mis técnicas hasta el máximo nivel. A la Dra. Alina, gracias por todos sus consejos de vida y de laboratorio. Al Maestro y dios de la ciencia Fernando, por tener un poquito de fe en mí y por enseñarme casi todo lo que se dé cómo trabajar en un laboratorio. Por último, al Dr. Sergio Vaca (Q. E. P. D.) por sus increíbles consejos, pláticas y enseñanzas, gracias por ayudarme a ver de lo que soy capaz.

Sin todos ustedes jamás lo habría conseguido

Índice

1.- Resumen	1
2.- Introducción	2
2.1.- Familia <i>Pasteurellaceae</i>	2
2.2.- Descripción del organismo	2
2.3.- Patogenia	4
2.4.- Factores de virulencia	4
2.4.1.- Movilidad	4
2.4.2.- Toxina RTX GtxA	4
2.4.3.- Metaloproteasa	5
2.4.4.- Biopelícula	6
2.4.5.- Hemaglutinación	6
2.4.6.- Adhesión	6
2.4.7.- Cápsula	6
2.4.8.- Vesícula de la membrana externa	7
2.5.- El hierro en las bacterias	7
2.6.- Gen <i>fur</i>	7
2.7.- Captación de hierro	8
2.8.- Sideróforos	9
2.9.- Quorum sensing	10
2.9.1.- Autoinductores	10
2.9.2.- Catecolaminas	11
2.10.- Lactoferrina	11
3.- Antecedentes	13

4.- Justificación -----	14
5.- Objetivos -----	14
5.1.- General -----	14
5.2.- Particulares -----	14
6.- Materiales y métodos -----	15
6.1.- Cepas -----	15
6.2.- Cinética de crecimiento -----	15
6.3.- Ensayo de recuperación del crecimiento -----	16
6.4.- Prueba de biofilm -----	16
6.5.- Electroforesis -----	16
7.- Resultados -----	18
7.1.-Cinética de crecimiento -----	18
7.2.- Ensayo de recuperación del crecimiento -----	20
7.3.- Prueba de biofilm -----	26
7.4.- Patrones de proteínas -----	27
8.- Discusión -----	30
9.- Conclusión -----	33
10.- Perspectivas -----	33
11.- Literatura citada -----	34

1.- Resumen

Las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* son bacterias Gram-negativas; los miembros de esta familia pueden ser patógenos primarios, potenciales u oportunistas. Estos últimos requieren una disminución en las defensas inmunológicas del hospedero. En esta categoría podemos encontrar a *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus seminis* y *Gallibacterium anatis*. *G. anatis* es una bacteria beta hemolítica, considerada parte de la microbiota de las aves, la cual es responsable de afectaciones como salpingitis, enteritis, septicemia, pericarditis y lesiones en el tracto digestivo de las aves, lo que ocasiona una baja en la producción de huevo y en ocasiones, la muerte. El hierro es un elemento muy importante, diferentes bacterias lo adquieren de su hospedero con proteínas que unen transferrinas o proteínas asociadas a grupos hemo; también producen o utilizan moléculas de bajo peso molecular llamados sideróforos. Una de las proteínas involucrada, más estudiadas en bacterias, en el control de la captación y almacenamiento de hierro, es la proteína Fur (ferric uptake regulator), cuya función es reprimir la transcripción de promotores regulados por hierro; el Fe^{+2} es su co-represor. En el presente estudio se evaluó el efecto del $FeCl_3$ (CF), 2'2', dipiridil (D), lactoferrina (LF) y ácido p-amino-benzoico (APAB) en el crecimiento, captación de hierro y la expresión de proteínas por las cepas silvestre y mutante en el gen *fur* de *G. anatis* 12656-12. Los resultados obtenidos indican que el D disminuye el crecimiento de ambas cepas, la cepa silvestre se ve más afectada (50%) con respecto a la mutante (43%). El CF permite una recuperación parcial del crecimiento de la cepa silvestre en presencia de D (20%), pero no de la mutante, indicando que los mecanismos de captación de hierro a través de CF están mediados por el gen *fur*. Este resultado se respalda al crecer ambas cepas con CF, el cual induce una disminución del crecimiento de la cepa silvestre (29%), pero no en la mutante. La adición de LF produce una disminución en el crecimiento de ambas cepas, sugiriendo que es tóxica para *G. anatis*. Un efecto similar al observado con el D, se da al adicionar APAB. La adición de Epinefrina (E) o Norepinefrina (NE), inducen una disminución de la cantidad de biopelícula producida por la cepa silvestre, sin afectar la cantidad producida por la mutante. Un efecto similar ocurre con la combinación de CF+E o CF+NE en la cepa silvestre, sin embargo, la cantidad de biopelícula formada por la mutante se incrementó más de dos veces con estas combinaciones. Se desconoce la razón de este incremento, ya que CF induce una disminución de biopelícula y se ha sugerido que E y NE actúan como sideróforos en cepas de la misma familia. Los resultados al adicionar D, CF, E, NE o combinaciones de E+CF, NE+CF a ambas cepas muestran una gran cantidad de cambios en la expresión de proteínas, indicando que el metabolismo de hierro es un proceso multifactorial en el que están involucrados una gran cantidad de genes de *G. anatis*.

2.- Introducción

2.1.- Familia *Pasteurellaceae*

Con 38 especies clasificadas y 24 sin clasificar, las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* son bacterias Gram-negativas, aeróbicas, micro anaerófilicas o anaerobias facultativas, parásitas de vertebrados como las aves de corral, que llegan a colonizar partes del aparato respiratorio así como algunas zonas del tracto digestivo o del tracto reproductivo (Christensen y Bisgaard, 2008).

Algunos miembros de esta familia pueden ser considerados patógenos primarios, los cuales infectan a sus hospederos sin necesidad de algún factor predisponente. Otros son considerados patógenos potenciales u oportunistas. Estos últimos requieren de una disminución en las defensas inmunológicas del hospedero, de la eliminación de alguna barrera física, por rasguños o mordidas, o la presencia de otros patógenos virales, bacterianos, o parasitarios. Incluidos en esta categoría podemos encontrar a *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*, *Actinobacillus seminis* y *Gallibacterium anatis*, organismos que también pueden llegar a causar afecciones crónicas, agudas o sub agudas (Montes-García et al., 2016).

2.2.- Descripción del organismo

G. anatis (Imagen 1) es una bacteria Gram-negativa, forma colonias de 1 a 2mm, de color grisáceo, puede o no presentar β -hemólisis, no forma endoesporas, presenta crecimiento anaerobio, aerobio facultativo o microaerófilico, sus colonias son transparentes con consistencia butirosa, lisas, brillantes, circulares y no requieren de NAD para su crecimiento (Christensen et al., 2003).



Imagen 1. *Gallibacterium anatis* 12656-12 y su mutante en *fur* cultivadas en agar sangre durante 24 h a 37° C.

En estudios *in vitro* se demostró que esta bacteria posee cierta movilidad por lo que se especula que también la posee *in vivo*. Esta movilidad depende de la temperatura, el pH y la presencia de dextrosa, cloruro de sodio y cloruro de calcio (Montes-García *et al.*, 2016).

G. anatis es considerada como parte de la microbiota normal de las aves, pero también es el agente causal de diversas afecciones como salpingitis (con o sin peritonitis), ooforitis, enteritis, septicemia, pericarditis, hepatitis y lesiones en el tracto digestivo de las gallinas, lo que ocasiona una disminución en la producción de huevo, baja conversión alimenticia y en ocasiones, mortalidad aviar (Christensen *et al.*, 2003). En la tabla 1 se muestran las pruebas bioquímicas que permiten diferenciar entre los diferentes biovares de *G. anatis*.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para identificar biovares de *G. anatis*.

Biovar	(+) Larabinosa	(+) Dxilosa	(-) minositol	(-) Dorbitol	Maltosa	Trehalosa	Dextrina
1	-	+/(+)	+/(+)	+	+	+/(+)	+/(+)
2	-	+	+	+	+	+	-
3	-	+	+/(+)	+	+	-	+
4	-	+	+/(+)	+	-	+/(+)	-/(+)
5	-	+	-	-	+	+	(+)
6	-	+	-	+	+	+	+
7	-	-	-	+	+	+	+
8	+	+	-	-	+	+	+
9	-	+	+/(+)	-	+	-	+
10	-	+	-	+	+	+	-
11	-	+	+	+	-	-	-/(+)
12	-	+	+/(+)	-	-	+/(+)	-/(+)
13	-	+	-	+	-	+	-
14	-	-	+	+	+	-	-
15	-	-	+	+	-	-	-
16	-	-	-	+	-	+	-
17	-	+	+/(+)	-	-	-	-
18	-	+	-	-	-	+/(+)	-/(+)
19	-	+	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	+	-
21	-	-	+	-	-	-	-
22	-	+	-	+	+	-	-
23	-	-	-	-	+	+	+
24	-	+/(+)	+/(+)	-	+	+	+/(+)

+: Positivo en 1-2 días; (+): Positivo en 3 a 14 días; -: Negativo dentro de 14 días. Fuente: Christensen *et al.* (2003).

2.3.- Patogenia

En el sector avícola, las enfermedades del sistema respiratorio representan uno de los mayores problemas de salud animal con niveles de morbilidad y mortalidad entre el 10 y 50% (León, 2009).

En aves comerciales, las enfermedades respiratorias se pueden clasificar en virales y bacterianas. Dentro de los agentes virales destacan *Paramoxovirus*, *Coronavirus*, *Herpesvirus*, *Metapneumovirus* y en las bacterianas se describen *Avibacterium paragallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Gallibacterium anatis* y *Escherichia coli* (Roh et al., 2013).

2.4.- Factores de virulencia

Los factores de virulencia de *G. anatis* que se han descrito hasta la fecha son; la secreción de metaloproteasas degradadoras de inmunoglobulinas tipo G (IgG) (García-Gómez et al., 2005), la capacidad de hemaglutinar glóbulos rojos de conejo (Zepeda et al., 2009; Montes García et al., 2016), la proteína secretada GtxA, del tipo RTX descrita por Kristensen et al. en 2010, la formación de biofilm (Vaca et al., 2011). Así como la expresión de fimbrias (Salgado Lucio et al., 2012; Persson y Bojesen, 2015) y la formación de un flagelo polar en la bacteria (Montes-García, 2012).

2.4.1.- Movilidad

La movilidad de una bacteria está dada por la capacidad de ésta para producir estructuras filamentosas llamados flagelos, los cuales le permiten desplazarse por el medio en el que se encuentran, esta es una ventaja evolutiva aunque representa un gran gasto energético para las bacterias. En 2012, Montes-García determinó las condiciones de movilidad para las cepas de *G. anatis* F149^T y 12656-12 *in vitro*. Usando microscopía electrónica de transmisión observó en ambas cepas un flagelo polar y obtuvo una proteína posiblemente flagelar de aproximadamente 60 KDa.

2.4.2.- Toxina RTX GtxA

Las proteínas tóxicas, más importantes, en la familia *Pasteurellaceae*, son la RTX y la CDT (repeats in toxin y Cytolethal distending toxin, respectivamente). La toxina reportada para *G. anatis* pertenece al grupo de toxinas RTX, estas son producidas por una gran cantidad de bacterias Gram-negativas y se consideran factores de virulencia importantes (Martínez-González, 2013).

Kachlany y Balashova en 2008 describen a las toxinas RTX como proteínas grandes, las cuales presentan en su región C-terminal repeticiones ricas en glicina, que le permiten unir calcio. Probablemente GtxA use un mecanismo donde el dominio RTX-hemolisina del extremo C-terminal sea el responsable de la unión a las células diana y de la translocación del dominio N-terminal o de la toxina completa al citoplasma (Martínez-González, 2013).

Este tipo de toxina es responsable de la leucotoxicidad y de la capacidad hemolítica de *G. anatis*, su dominio N-terminal está formado por 950 aminoácidos que no existen en otras toxinas (Figura 2).

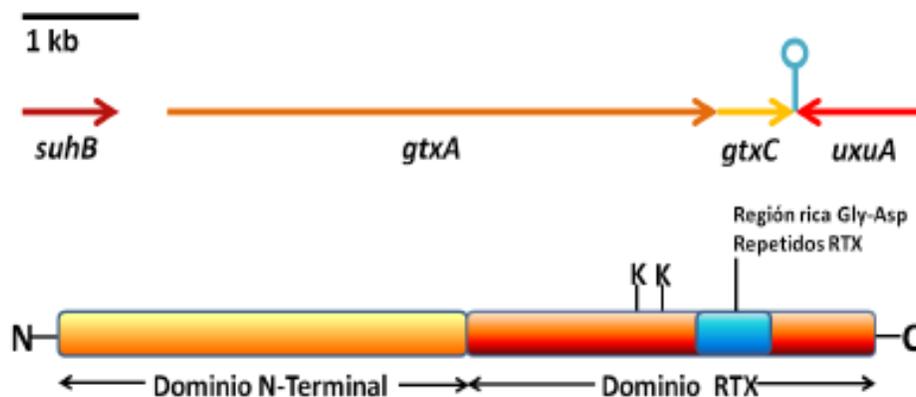


Figura 2. Organización y ubicación de la gtxA de *G. anatis*. En la parte superior se muestra la ubicación de los genes que la flanquean en el genoma de *G. anatis* 12656-12. Las flechas indican los marcos de lectura. La parte inferior muestra la región rica en glicina y aspartato (posición 1640-1830) (Kristensen *et al.*, 2010).

2.4.3.- Metaloproteasas

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas o péptidos. Estas proteínas son consideradas como importantes factores de virulencia debido a que participan en diversos procesos durante una infección. Incluidos en estos están: la colonización, la nutrición y/o evasión del sistema inmune del hospedero (Persson y Bojesen, 2015).

En 2005, García-Gómez y colaboradores describieron una proteína secretada por *G. anatis* de 100 KDa. Ésta presenta actividad proteolítica, la cual se vio en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con caseína bovina. Esta metaloproteasa es activa en un pH alcalino y se inhibe en presencia de EDTA. Su actividad es estable a los 50° C, y se inhibe a los 60° C o temperaturas superiores. Puede degradar IgG de pollo después de incubarse 24 h; con antisueros

policlónales presenta una reactividad cruzada contra una proteasa de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

2.4.4.- Biopelícula

Una biopelícula bacteriana es un conjunto de organismos asociados entre si y adheridos a una superficie viva o inerte, estos organismos se encuentran en una matriz extracelular producida por estos mismos y está formada principalmente por proteínas, polisacáridos, sales, minerales y DNA (Dickschat, 2010).

Debido a que el crecimiento en una biopelícula es considerado un crecimiento multicelular, ya que pueden existir organismos de la misma especie, o de diferente especie, así como organismos de diferentes géneros; en una biopelícula debe existir una comunicación entre los diferentes miembros de la misma. Esta comunicación, denominada quorum sensing (QS), permite controlar la expresión de diversos genes en conjunto y permitir una comunicación más eficiente entre ellas para permanecer y sobrevivir en el hospedero o en ambientes hostiles, y resistir varios tipos de estrés (Montes-García *et al.*, 2016).

2.4.5.- Hemaglutinación

Zepeda y colaboradores en 2009 trabajando con aislados de campo de *G. anatis* de México y Dinamarca mostraron que, en presencia de eritrocitos de aves y mamíferos, un grupo de cepas son capaces de aglutinar eritrocitos de pollo, gallina, codorniz, conejo y cerdo. En 2016 Montes-García *et al.*, identificaron una hemaglutinina de 65 KDa de las cepas de *G. anatis* 12656-12 y F149^T, la cual sugieren que puede constituir un factor de inmunidad y de virulencia común entre las cepas de *G. anatis*.

2.4.6.- Adhesión

Se ha demostrado que *G. anatis* es capaz de adherirse a vidrio y poliestireno, esto gracias a la expresión de fimbrias que le ayudan a la adhesión en células epiteliales orofaríngeas de pollo (Salgado-Lucio *et al.*, 2012).

2.4.7.- Cápsula

La cápsula bacteriana es una red de polímeros que cubre la superficie de la bacteria. Ésta está compuesta de polisacáridos, y protege a la bacteria de la respuesta inflamatoria del hospedero y de la fagocitosis. Persson y Bojesen en 2015 demostraron que la mutante (Δ *gexD*) de cápsula de *G. anatis* es más virulenta que la cepa silvestre. Aún se desconocen otras funciones de la cápsula en *G. anatis*.

2.4.8.- Vesícula de la membrana externa

Se ha demostrado que *G. anatis* puede producir vesículas de la membrana externa (OMV's) de un tamaño entre los 150 y 160 nm. Estas vesículas se producen en mayor cantidad durante la fase de crecimiento exponencial de la cepa en medio BHI. En medio RPMI, la cepa parece que produce una menor cantidad de vesículas. Cultivadas en BHI adicionado con EDTA las vesículas producidas son de >100 nm, además de que se encontraron restos de células lisadas, esto se debe a que el EDTA promueve a la lisis de las células (Ragnhild *et al.*, 2013).

2.5.- El hierro en las bacterias

El hierro es un elemento muy importante para todos los seres vivos excepto algunos *Lactobacillus*. Diferentes bacterias adquieren el hierro principalmente de su hospedero con la ayuda de proteínas que unen transferrinas o proteínas asociadas a grupos hemo; también producen o utilizan moléculas de bajo peso molecular, producidas por otros microorganismos, que unen hierro con una alta afinidad, llamados sideróforos (Chantes-Guerra *et al.*, en preparación). Sin embargo, la concentración del hierro debe ser controlada adecuadamente, pues su reacción con el oxígeno puede dar lugar a la generación de radicales libres, moléculas altamente reactivas que pueden dañar diversas macromoléculas (Pérez *et al.*, 2005).

Las bacterias requieren de una concentración de hierro entre 10^{-6} y 10^{-8} M. En condiciones anaerobias el hierro se encuentra en forma reducida (Fe^{+2}), esta forma es lo suficientemente soluble para que pueda ser asimilada por las bacterias sin la necesidad de recurrir a mecanismos complejos (Chantes-Guerra *et al.*, 2012).

2.6.- Gen *fur*

Una de las proteínas involucradas, y más estudiadas en bacterias, en el control de la captación y almacenamiento de hierro, es la proteína Fur (ferric uptake regulator). Esta proteína es un polipéptido cuya función es reprimir la transcripción de promotores regulados por hierro; el Fe^{+2} es su co-represor (Escolar *et al.*, 1999).

La regulación de la expresión del gen *fur* es muy compleja, ya que es autorregulable, con lo que se liga su expresión con el metabolismo celular. Esta

proteína también es regulada por la respuesta al estrés oxidativo (Echeverría-Ruiz *et al.*, 2010).

En condiciones donde el hierro abunda, Fur se une al ión divalente de hierro y forma el complejo llamado Fe^{2+} -Fur, adquiriendo una configuración capaz de unirse a secuencias blanco del DNA o cajas Fur, inhibiendo la transcripción de genes regulados por Fur downstream (río abajo). En situaciones contrarias, disminuye la concentración del complejo Fe^{2+} -Fur y se liberan regiones operadoras reguladas por el hierro, permitiendo que la RNA polimerasa acceda a los promotores de genes encargados de la síntesis de sideróforos y/u otras proteínas reguladas por el hierro, permitiendo la expresión de estos genes, favoreciendo su captación (Chantes-Guerra *et al.*, 2012).

2.7.- Captación de hierro.

Las bacterias cuentan con diversos mecanismos para la captación de hierro y estas se engloban en dos formas: directas e indirectas. Los mecanismos directos son aquellos en los que los iones de Fe^{2+} interactúan directamente con los receptores de la membrana bacteriana. Ya que estos iones son altamente solubles en condiciones anaerobias y en pH ácidos logran una difusión pasiva a través de porinas de las bacterias Gram-negativas hacia el periplasma, de ahí son transportadas al citosol mediante un complejo de membrana ABC (ATP Binding Cassette).

El mecanismo indirecto se caracteriza por la implementación de compuestos secretados por la bacteria o por otras bacterias llamados sideróforos, los cuales forman complejos con el hierro para luego adherirse a las proteínas receptoras de la superficie de la bacteria (Martínez-González, 2010).

En muchas bacterias de las familias *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae* se han logrado describir dos proteínas conservadas y específicas que reconocen las transferrinas o lactoferrinas de su hospedero (Reyes-Malpica, 2018). Estas proteínas son receptores de membrana llamadas TbpA y TbpB para transferrina y LpbA y LpbB para la lactoferrina. La primera es dependiente de TonB y es muy afín a transferrinas cargadas de moléculas de hierro y a apotransferrinas.

La segunda es una lipoproteína que causa un incremento en la eficacia en la captación del hierro. Su mecanismo consiste en que primero, la proteína TbpB reconoce la transferrina cargada con hierro, la lleva a un dímero (la TbpA de la membrana y la TbpB proyectada al exterior), el hierro es extraído de la transferrina y la TbpA lleva el hierro al periplasma. Por último por medio de un sistema de

transporte tipo ABC, el hierro es acarreado al citoplasma (Schryvers y Stojjickovic, 1999).

2.8.- Sideróforos.

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular, menor a 1 kDa, afines al hierro. Su biosíntesis está regulada generalmente por los niveles de hierro (III) en el ambiente donde se encuentra la bacteria. La forma en la que la bacteria capta el hierro a través de los sideróforos es mediante un complejo hierro-sideróforo el cual acarrea el hierro a la membrana de la bacteria; esta es rica en polisacáridos y purinas, importantes para el transporte del hierro. Ya que el periplasma contiene 20% del agua de la célula aproximadamente y el complejo hierro-sideróforo es pesado, su capacidad para penetrar a la célula por las porinas es baja, por esto es necesaria la presencia de proteínas acarreadoras (Hider & Kong, 2010).

En la figura 1 se observan diferentes componentes de mecanismos de captación de hierro por medio de sideróforos.

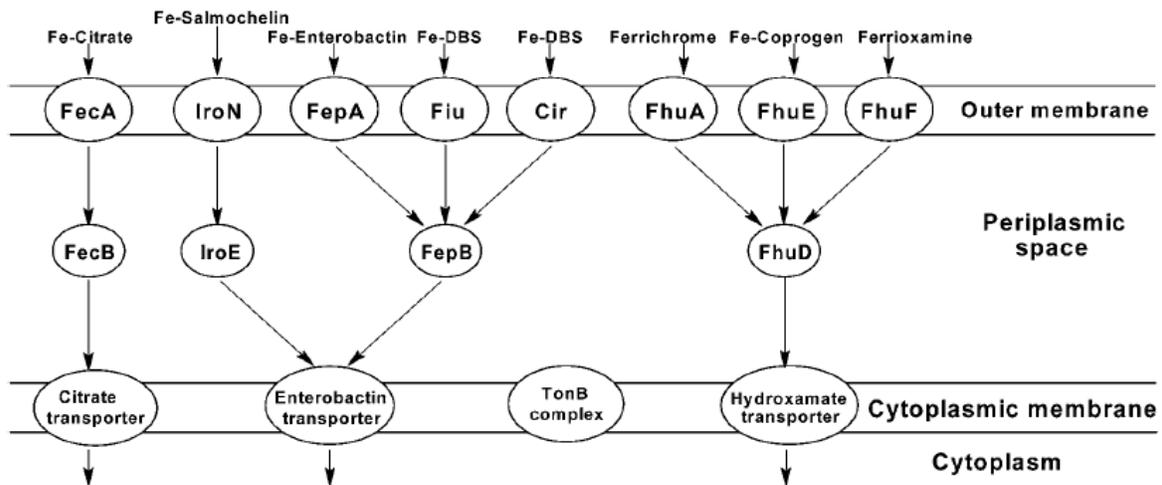


Figura 1. La donación del complejo hierro-sideróforo al periplasma.

El sideróforo es facilitado por la proteína citoplásmica TonB. Los transportadores citoplásmicos de sideróforos de hierro funcionan mediante un mecanismo de tipo ABC, que es impulsado por la hidrólisis de ATP. El transportador de hierro se encuentra principalmente en cepas de *E. coli* uropatógenas. Fe-DBS, complejo de hierro de dihidroxibenzoilserina (Garibaldi and Neilands, 1956).

Estas moléculas facilitan la solubilidad de los iones de Fe^{3+} a pH fisiológico así como también su remoción. La mayoría de los sideróforos son secretados aunque existen algunos que se encuentran anclados a la superficie celular con es el caso de la micobactina en *Mycobacterium tuberculosis* (Gobin y Horwitz, 1996).

2.9.- Quorum sensing

El quorum sensing (QS), una forma de comunicación bacteriana, participa en la regulación en la expresión de genes en respuesta a fluctuaciones en la densidad de la población celular. Esto produce y libera moléculas de señalización química llamados autoinductores (AI) que se incrementan en concentración dependiendo de la función requerida por la población bacteriana. La detección de una mínima concentración estimuladora de un AI lleva a la alteración en la expresión de genes. Las bacterias usan este mecanismo como comunicación para regular un diverso rango de actividades fisiológicas, estos procesos incluyen simbiosis, virulencia, competencia, conjugación, producción de antibióticos, motilidad, y formación de biofilm. Mientras que las bacterias Gram-positivas utilizan oligopéptidos, las bacterias Gram-negativas usan N-acil homoserina lactonas como AIs. Esta comunicación puede darse entre bacterias de la misma o diferente especie. La evolución del QS podría ser el inicio en el desarrollo de los organismos pluricelulares (Miller y Bassler, 2001).

2.9.1.- Autoinductores

Dependiendo del AI liberado al medio podemos hablar de un espectro de comunicación bacteriana que comprende desde la comunicación inter-especie, intra-especie o entre reinos, y son usados por las bacterias para regular la expresión de factores de virulencia. En *Aeromonas hydrophila*, los autoinductores estimulan la liberación de exoproteasas; en *Agrobacterium tumefaciens* la 3-oxo-octanoil-HSL da inicio a la conjugación, siendo estos autoinductores inter-especie. El género *Pseudomonas* libera butanoil-HSL, 3-oxo-dodecanoil-HSL, hexanoil-HSL y 3-oxo-hexanoil-HSL, involucradas en la formación de biopelículas, en la liberación de exoenzimas (proteasas), en la motilidad y en la producción de exopolisacáridos, respectivamente; pudiendo considerarlos como inductores intra-especie. En algunas bacterias como *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*, la simbiosis, la nodulación radicular y la transferencia plasmídica, son favorecidas por la 7-cis-tetradecanoil/ hexanoil-HSL, heptanoil/octanoil-HSL los cuales son AI inter reinos. Se ha demostrado que la N-3-oxo-decanoil-HSL de *P. aeruginosa* favorece la actividad pro-inflamatoria y acelera la apoptosis en varios tipos celulares como macrófagos, neutrófilos y carcinomas de seno (Flores-Encarnación, et al., 2011).

2.9.2.- Catecolaminas

Algunas hormonas como la Epinefrina (E) y la Norepinefrina (NE) poseen una similitud estructural con los AI entre especie, por ello, se ha sugerido que la NE puede actuar como promotor en el crecimiento y virulencia de enterobacterias, en particular, la quinasa Qsec del quórum sensing que se ha visto involucrada en la inducción por NE, en la expresión de genes asociados a la motilidad y adherencia de estas bacterias. La concentración más comúnmente empleada para la inducción de los genes que causan esto es de 50 μM y para que la bacteria pueda activar estos factores de virulencia debe viajar al epitelio intestinal, ya que ahí es donde se encuentra la NE en mayor concentración (Pasupuleti *et al*, 2018).

La E ha demostrado incrementar también la motilidad y la virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria Gram-negativa, sin embargo, con esta bacteria se han observado cambios a una concentración de 1 μM (Cambronel M., *et al*, 2019). En 2003, Sperandio y colaboradores sugieren que ocurre un cross-talks entre AI-3 y la E de mamíferos ya que una mutante en luxS restaura sus fenotipos de virulencia en presencia de estas moléculas y ambas señales son bloqueadas por antagonistas adrenérgicos, todo esto sugiere que existe una comunicación célula a célula entre la bacteria y su hospedero.

Se ha descrito que estas hormonas también pueden ser usadas como sideróforos transitoriamente, esto debido al grupo catecol, el cual puede capturar al hierro que se encuentra en las glicoproteínas de la transferrina y lactoferrina transitoriamente, lo que permite la adquisición bacteriana del hierro secuestrado normalmente inaccesible del anfitrión (Sandrini *et al.*, 2010)

2.10.- Lactoferrina

La lactoferrina (LF) es una glicoproteína de 80 KDa, pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de hierro denominadas transferrinas y presenta una alta homología entre especies. Se encuentra principalmente en fluidos como la leche, sin embargo puede encontrarse en pequeñas cantidades en el plasma sanguíneo. Esta molécula está integrada por una cadena polipeptídica simple, plegada en dos lóbulos globulares N y C, cada uno es capaz de unir Fe^{+2} o Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+3} , y Mn^{+2} . Recientemente se ha comprobado que tiene propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas, bacteriostáticas y antivirales (Rodríguez-Franco *et al.*, 2005).

La función bacteriostática se debe a la capacidad de la LF para unirse a iones de Fe, si está se encuentra en su forma de apo-lactoferrina (libre de hierro) tiene la

capacidad de secuestrar el hierro en las zonas de infección inhibiendo el crecimiento de las bacterias. La LF exhibe una interacción con la superficie de bacterias Gram-negativas, seguida de una liberación de lipopolisacáridos, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana y la liberación del citoplasma al medio extracelular (Rodríguez-Franco *et al.*, 2005).

3.- Antecedentes.

Previamente Rea (2011), trabajando con la respuesta al estrés por hierro en *G. anatis* reportó que este microorganismo induce la expresión diferencial de proteínas implicadas en la captación de hierro cuando crece bajo condiciones de bajo hierro, incluida la expresión de un probable receptor de sideróforos. También, se sugirió la posible producción de sideróforos por este microorganismo, por medio de un análisis espectrofotométrico.

Continuando con éste trabajo, se encontró que *G. anatis* presentaba la expresión diferencial de una proteína que une hemoglobina, una proteína que parecía no encontrarse bajo control de Fur, además, se corroboró que la producción de sideróforos por *G. anatis* no se lleva a cabo, esto mediante crecimiento de esta bacteria en medio con cromo azurol (Chantes-Guerra, *et al.*, en preparación)

En éste mismo trabajo también se reporta la generación de una mutante de *G. anatis* 12656-12 en el gen *fur* mediante su interrupción por la inserción de un cassette que codifica para resistencia a estreptomycin, obtenido de un plásmido aislado de una cepa de *Pasteurella multocida* de cerdo (López-Ochoa *et al.*, 2019). Con la interrupción del gen *fur* se pudo demostrar que el probable receptor de sideróforos de *G. anatis* se encontraba bajo control de Fur, pero no así la proteína que une hemoglobina (Chantes-Guerra *et al.*, en preparación). Una caracterización de esta mutante no fue realizada.

4.- Justificación.

La caracterización de la mutante en *fur* servirá para tener un mayor conocimiento de la fisiología de *G. anatis* y de sus mecanismos regulatorios

5.- Objetivos.

5.1.- General

Caracterización parcial de la cepa *G. anatis* 12656-12 y su mutante en Ω *fur*

5.2.- Particulares.

- ❖ Describir el efecto de las moléculas FeCl_3 y del agente quelante de hierro 2,2 dipiridil en el crecimiento de *G. anatis* 12656-12 y su mutante en Ω *fur*.
- ❖ Determinar las posibles diferencias en la expresión de proteínas entre la cepa silvestre y su mutante en Ω *fur* en presencia de las moléculas; E, NE, FeCl_3 y del agente quelante de hierro 2,2 dipiridil.
- ❖ Conocer si existen diferencias en la capacidad de producir biopelícula entre la cepa silvestre y su mutante en Ω *fur* en presencia de las moléculas; E, NE, FeCl_3 y del agente quelante de hierro 2,2 dipiridil.
- ❖ Determinar la posible utilización de las moléculas; ácido 3-aminobenzoico y LF por la cepa silvestre de *G. anatis* y su mutante en Ω *fur* como posibles sideróforos, como molécula transportadora de hierro, así como molécula bacteriostática, en presencia de FeCl_3 y 2,2 dipiridil.

6.- Materiales y métodos.

6.1.- Cepas.

Las cepas de *G. anatis* 12656-12 y su cepa mutante Ω fur fueron sembradas en agar sangre de carnero al 5% e incubadas durante 24h a 37°C. Para su conservación se mantuvieron en refrigeración y se resembraban cada semana.

6.2.- Cinética de crecimiento.

Para determinar el efecto de los suplementos en el crecimiento de 12656-12 y su mutante fur, estas fueron cultivadas en tubos de ensaye con tres ml de medio de soya triptocaseína (TSB) y se incubaron durante 24 h a 37° C. Este pre cultivo sirvió para inocular al 1% medios de cultivos conteniendo diferentes suplementaciones, un tubo sin suplementos se usó como control. Los cultivos se incubaron hasta una $\lambda^{600}=0.1$ para posteriormente aplicar los suplementos de la tabla 2. Por último, los cultivos se mantuvieron en incubación y agitación, la densidad óptica (DO) fue determinada a 600 nm cada hora durante 8 h hasta alcanzar la fase estacionaria.

Tabla 2. Suplementos utilizados durante el estudio.

Tratamiento	Dosis
Dipiridil (D)	0.25mM
FeCl ₃ (CF)	100 μ M
Ácido 3 amino-benzoico (APAB)	100 μ M
Dipiridil + FeCl ₃	0.25 mM + 100 μ M
Ácido 3 amino-benzoico + FeCl ₃	100 μ M + 100 μ M
Ácido 3 amino-benzoico + FeCl ₃ + Dipiridil	100 μ M + 100 μ M + 0.25 mM
Control(C)	Sin adiciones

6.3.- Ensayo de recuperación del crecimiento.

Para conocer si es que alguno de los suplementos utilizados funcionaban como sideróforos o como fuente de hierro para las bacterias, estas se cultivaron en tubos de ensaye con tres ml de medio de soya triptocaseína (TSB) y se incubaron durante 24 h a 37°C en agitación. Siete tubos de ensaye con tres ml TSB se inocularon al 1% con un pre-cultivo y se dejaron crecer hasta una $\lambda^{600}=0.01$. Primero se aplicó el dipiridil a sus correspondientes tubos, este se dejó actuar durante tres horas y posteriormente se aplicaron los suplementos APAB, CF o una combinación de ambos para poder observar si la bacteria mostraba una recuperación en su crecimiento. Se determinó el crecimiento de las cepas a las 24 h (DO=600nm).

6.4.- Producción de biopelícula

Se prepararon cultivos con inóculos al 10% en tubos de ensaye con tres ml de medio TSB. Para determinar la formación de la biopelícula se usó una placa de poliestireno de 96 pozos. Se colocaron 200µl de cada cepa por triplicado para cada tratamiento con los suplementos aplicados y se dejó incubar a 37°C durante 24 h. Posteriormente a la incubación, se le retiró el sobrenadante sin desprender la biopelícula del fondo del pozo y se fijó con metanol durante 15 min, se retiró el metanol y se aplicó cristal violeta al 0.01% durante 15 min, se recuperó el colorante y se lavó con agua corriente, se secó y se colocó ácido acético al 30% para extraer el colorante retenido para posteriormente realizar una disolución 1:5 y se midió con un lector ELISA a 630nm (Sánchez-Espinoza, 2010).

6.5.- Electroforesis.

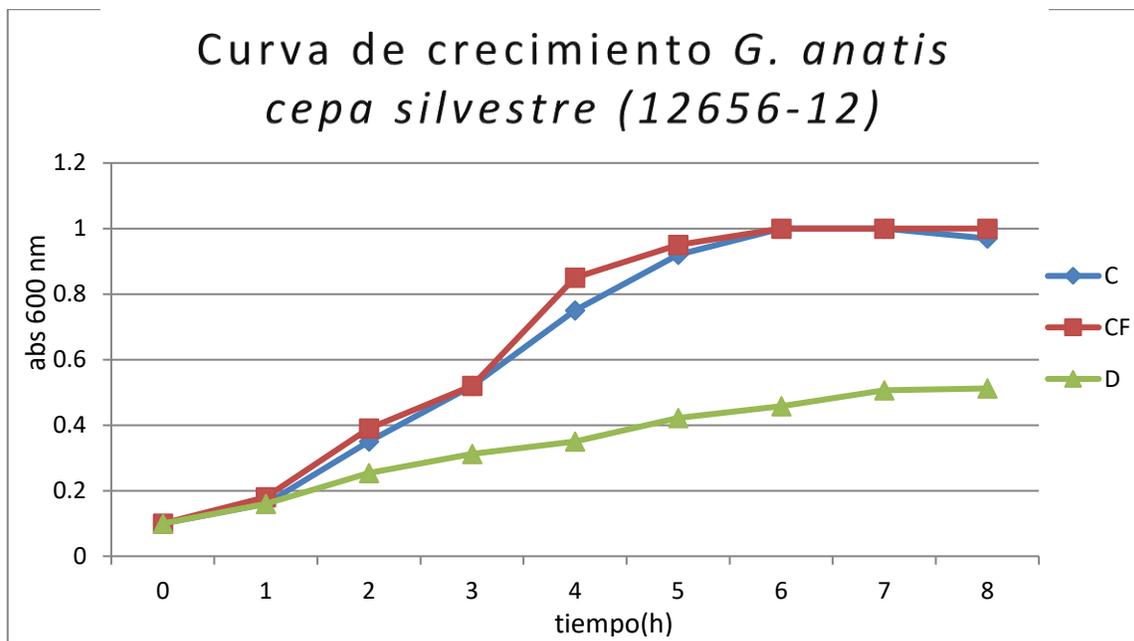
Para poder determinar si las hormonas Epinefrina o Norepinefrina pudiesen funcionar como posibles sideróforos al estar en presencia de FeCl₃ y esta presencia afectaba el patrón de proteínas, ambas cepas se crecieron en presencia o no de estos suplementos durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se obtuvieron proteínas secretadas y OMP's conforme a lo descrito por Martínez-González (2013), estas se cuantificaron por el método de Bradford, y de ambas se tomaron 20 µg a los cuales se agregó buffer de muestra 6X y β-mercaptoetanol al 5% y se colocaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Las muestras se separaron electroforéticamente a 95 V durante 120 min, al terminar, los geles se

tiñeron con una solución de azul de Coomassie durante 1 h y se destiñeron con ácido acético al 10%. Los geles fueron fotografiados en un transiluminador.

7.- Resultados.

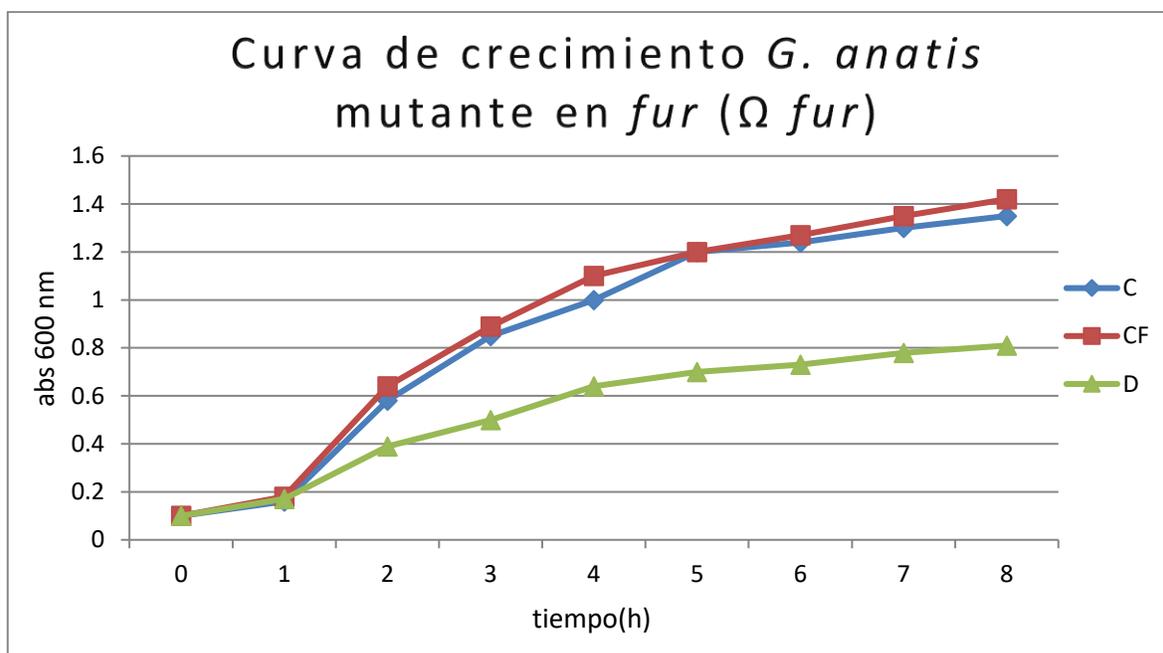
7.1.- Cinética de crecimiento.

La cepa silvestre muestra una disminución en su crecimiento de aproximadamente el 50% comparada con el control cuando se le adiciona únicamente D. El cultivo adicionado solo con CF no presenta cambios significativos en el crecimiento comparado con el control. Los tres cultivos se midieron a 600nm durante ocho horas (Gráfica 1).



Gráfica 1. Curva de crecimiento de *G. anatis* en presencia o no de 2,2, dipiridil (D) o FeCl_3 (CF).

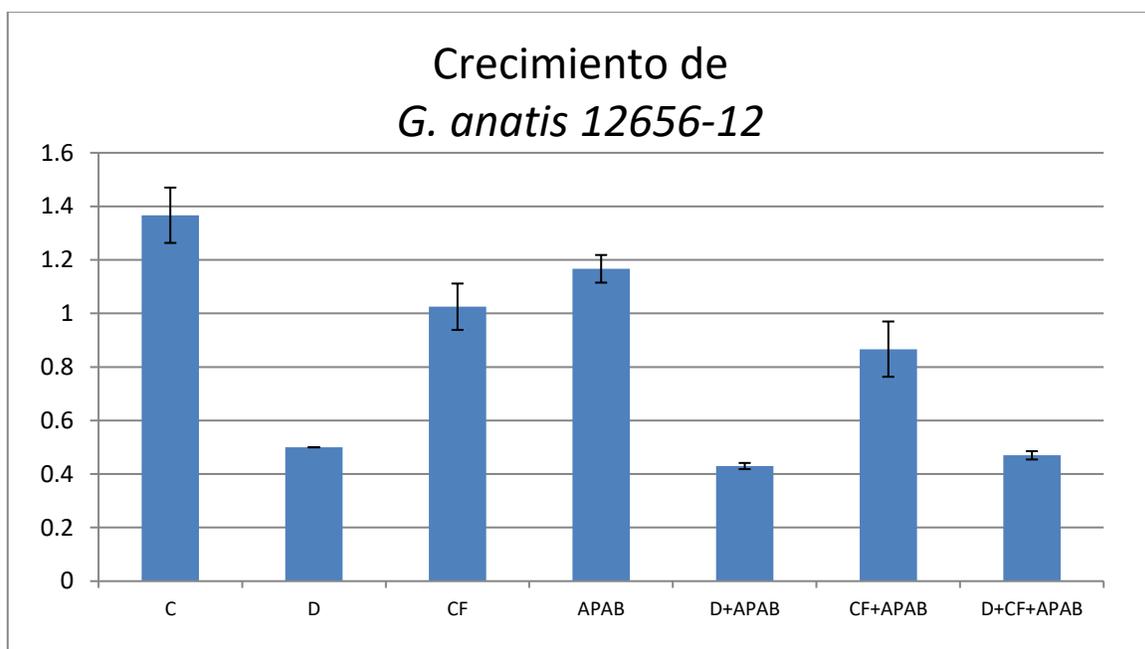
La cepa mutante muestra una disminución en su crecimiento cuando se le adiciona únicamente D, sin embargo, esta disminución es menor que la observada en el crecimiento de la cepa silvestre (Gráfica 1), de aproximadamente el 43% comparada con el control. El cultivo de la mutante en *fur*, adicionado solo con CF, no presenta cambios significativos en el crecimiento comparado con su control. (Gráfica 2). Comparando ambas cepas se observa que la cepa mutante tiene un mayor crecimiento (aprox. 20%) que la cepa silvestre.



Gráfica 2. Curva de crecimiento de *G. anatis* mutante en *fur* en presencia o no de 2,2, dipiridil (D) o FeCl_3 (CF)

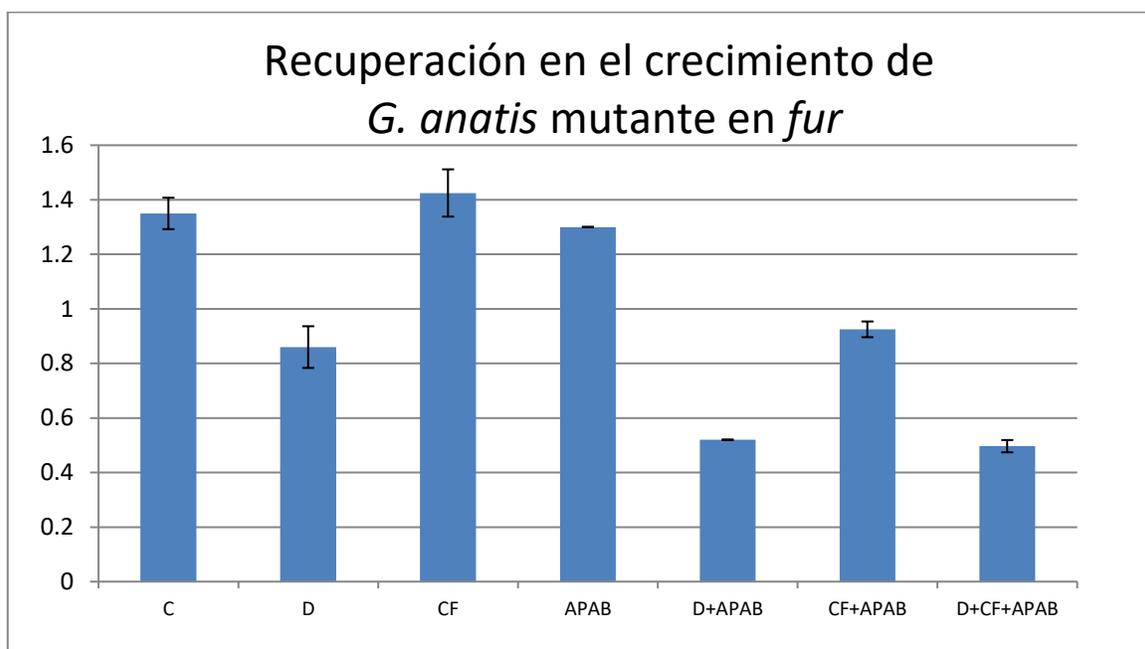
7.2.- Ensayo de recuperación del crecimiento

La adición de D al cultivo de *G. anatis* silvestre, induce una disminución del 65% del crecimiento con respecto al cultivo control (Grafica 3). Este efecto se mantiene en la combinación de D + APAB y D + CF + APAB ya que el crecimiento disminuye en un 25 y 30% respectivamente. La adición de CF + APAB disminuye el crecimiento en aprox. un 40% y el APAB sólo lo disminuye un 10%, mientras que el CF disminuye 25% aprox.



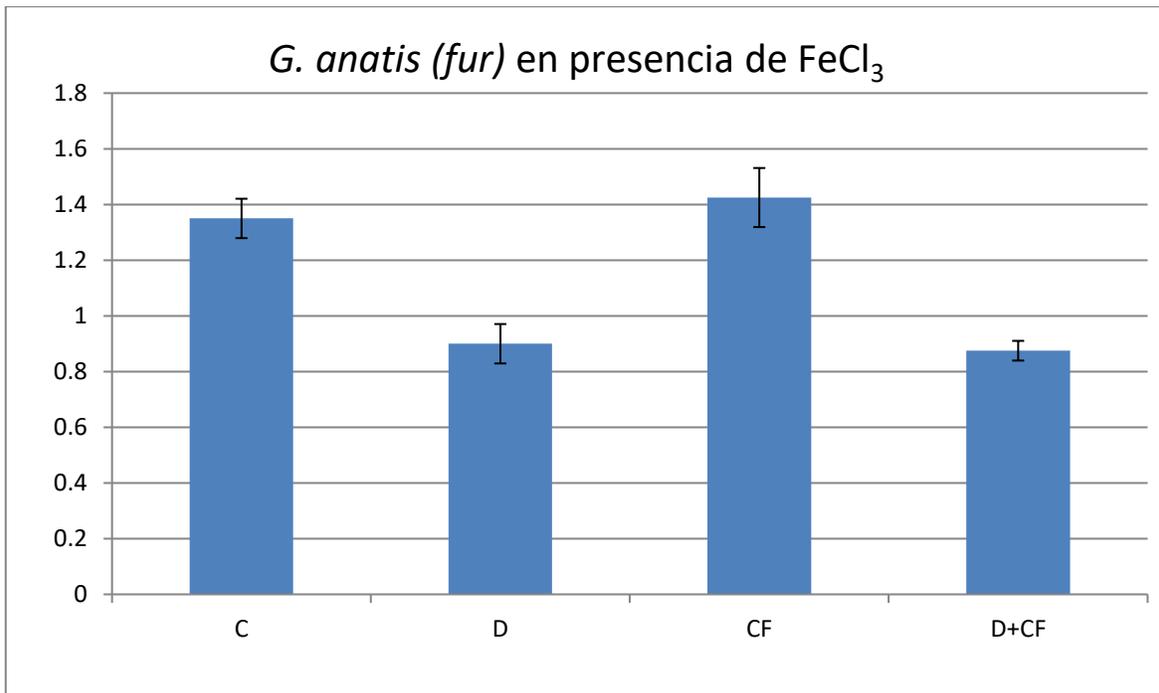
Grafica 3. Crecimiento de la cepa silvestre en presencia o no de 2,2'dipiridil (D), FeCl₃ (CF), y/o APAB.

La cepa mutante en el gen *fur*, presenta un comportamiento diferente con respecto a la cepa silvestre (Grafica 4). La adición de D produce una disminución del crecimiento en 35% aprox., pero en menor proporción con respecto a la cepa silvestre (65% aprox.). La combinación de D+APAB o D+APAB+CF producen el mismo efecto inhibitorio en el crecimiento que se observó en la cepa silvestre, aunque en comparación con el crecimiento en presencia únicamente de D se ve menos afectada. La adición de CF o APAB, de manera independiente, no parecen afectar el crecimiento de la cepa mutante, pero la combinación de ambos compuestos presenta un efecto similar al observado cuando se adiciona D.



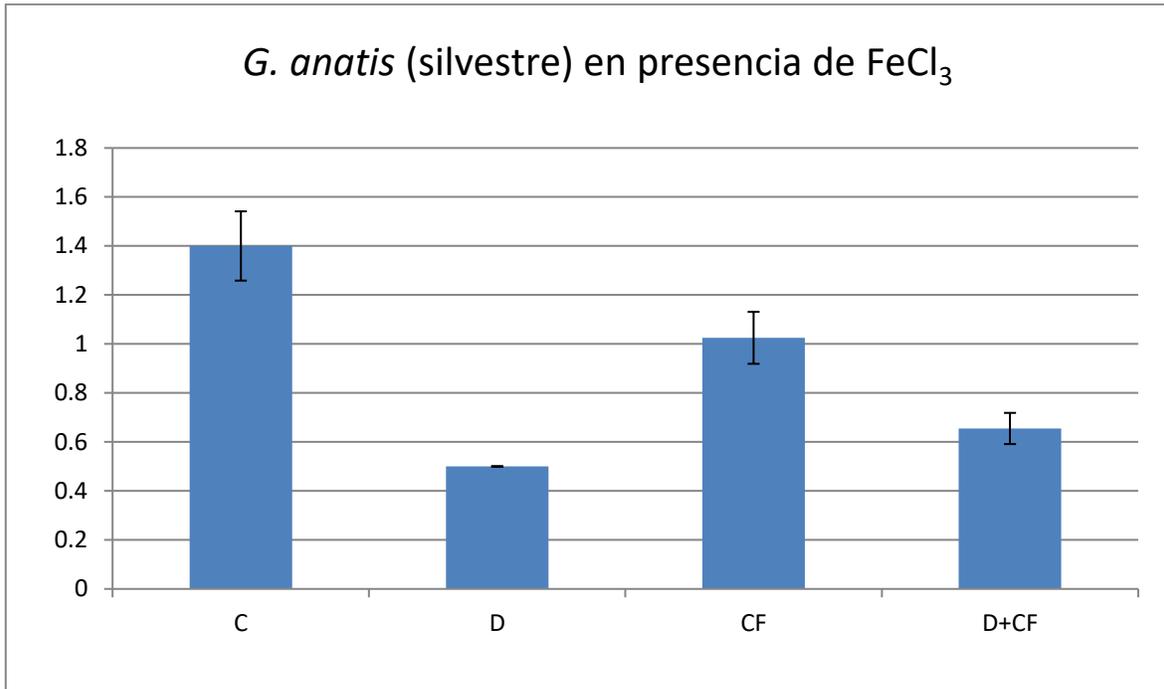
Grafica 4. Crecimiento de la cepa mutante en presencia o no de 2,2'dipiridil (D), FeCl₃ (CF), y/o APAB.

El crecimiento de la cepa de *G. anatis* 12656-12 mutante en el gen *fur* no es afectado por la adición de CF (Grafica 5), en comparación a la cepa silvestre (Grafica 3), en que se observa una disminución de 30% en su crecimiento, sin embargo, la adición de D + CF no mejoran el crecimiento de esta cepa. Esto sugiere que esta mutante no tiene la capacidad de incorporar CF de una manera directa.



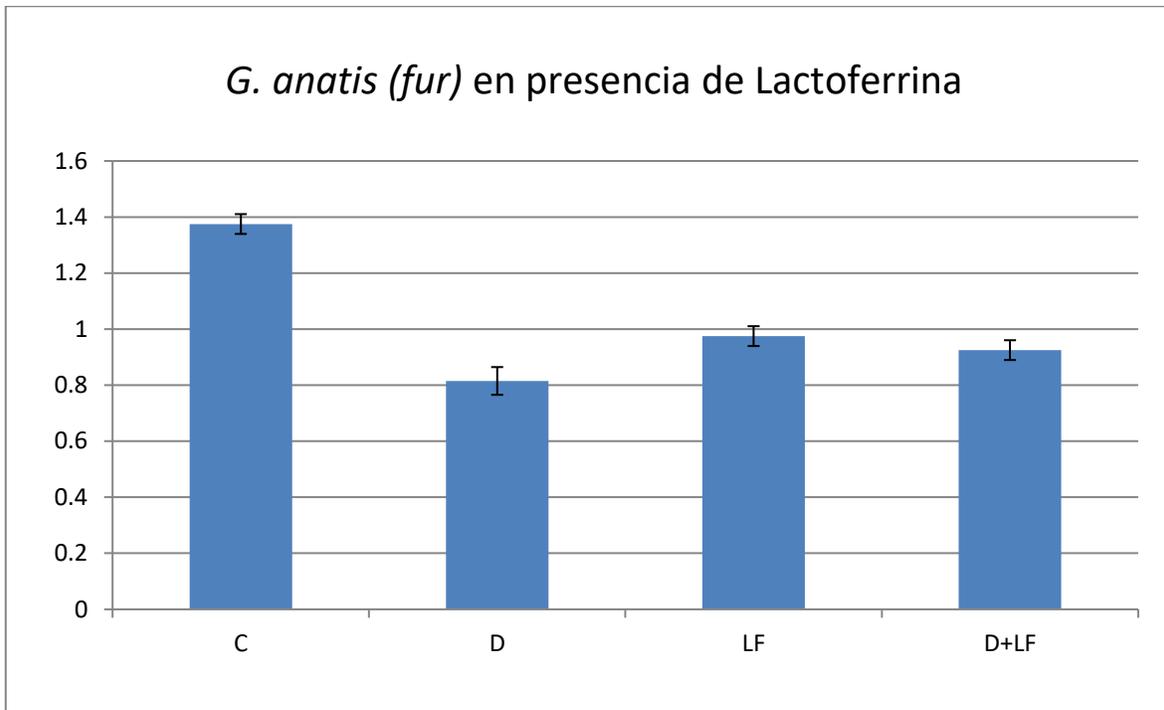
Gráfica 5. Crecimiento de la cepa mutante en presencia o no de CF o D con o sin CF.

Por el contrario, en la cepa silvestre, la adición de CF produce una disminución del crecimiento de aprox. 70%, además, la adición de este, permiten la recuperación del crecimiento en un 20% a pesar de estar en presencia de D (Gráfica 6). Este resultado sugiere que a diferencia de la cepa mutante, la cepa silvestre posee un mecanismo de captación de CF funcional.



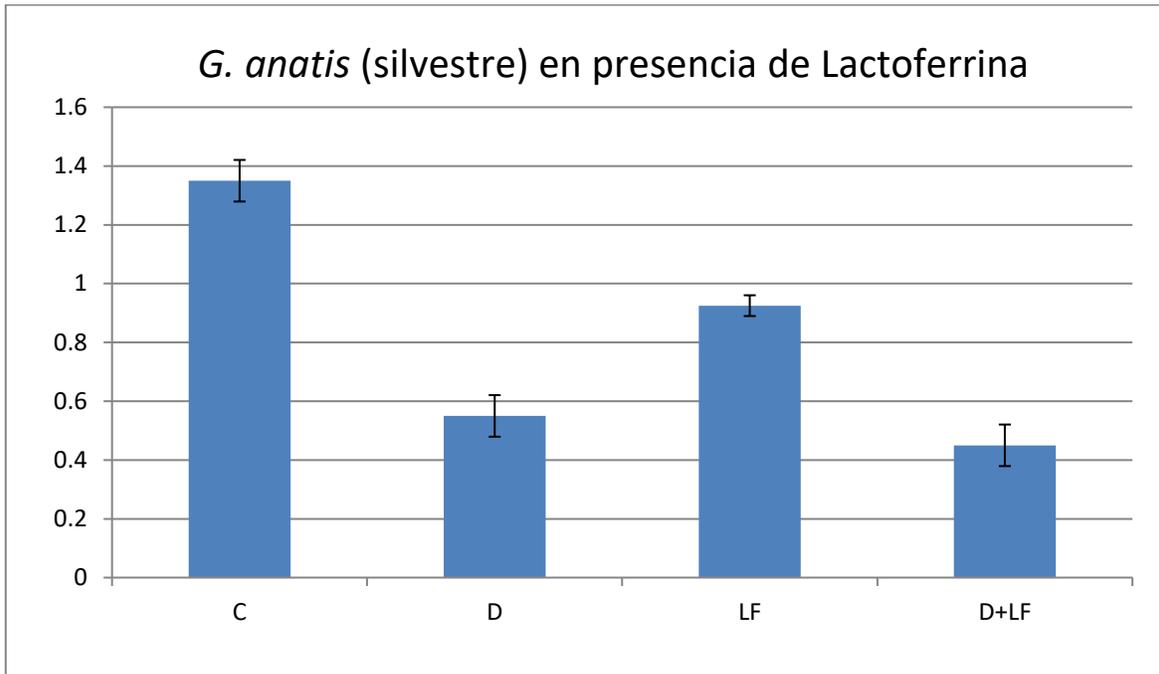
Gráfica 6. Crecimiento de la cepa silvestre en presencia o no de CF o D con o sin CF.

Como una forma de determinar si esta bacteria podría adquirir hierro de otras fuentes, se utilizó lactoferrina adicionada a los medios de cultivo. De lo que puede observarse en la gráfica 7, se aprecia que esta molécula disminuye el crecimiento de *G. anatis* cepa mutante en 29% con respecto al control sin adiciones. Esto sugiere que la lactoferrina podría ser toxica para *G. anatis*. Además, cuando la lactoferrina se agrega en presencia de dipiridil, no permite una recuperación del crecimiento bacteriano, sugiriendo su incapacidad para adquirir hierro de esta molécula.



Gráfica 7. Crecimiento de la cepa mutante en presencia o no de LF o D con o sin LF.

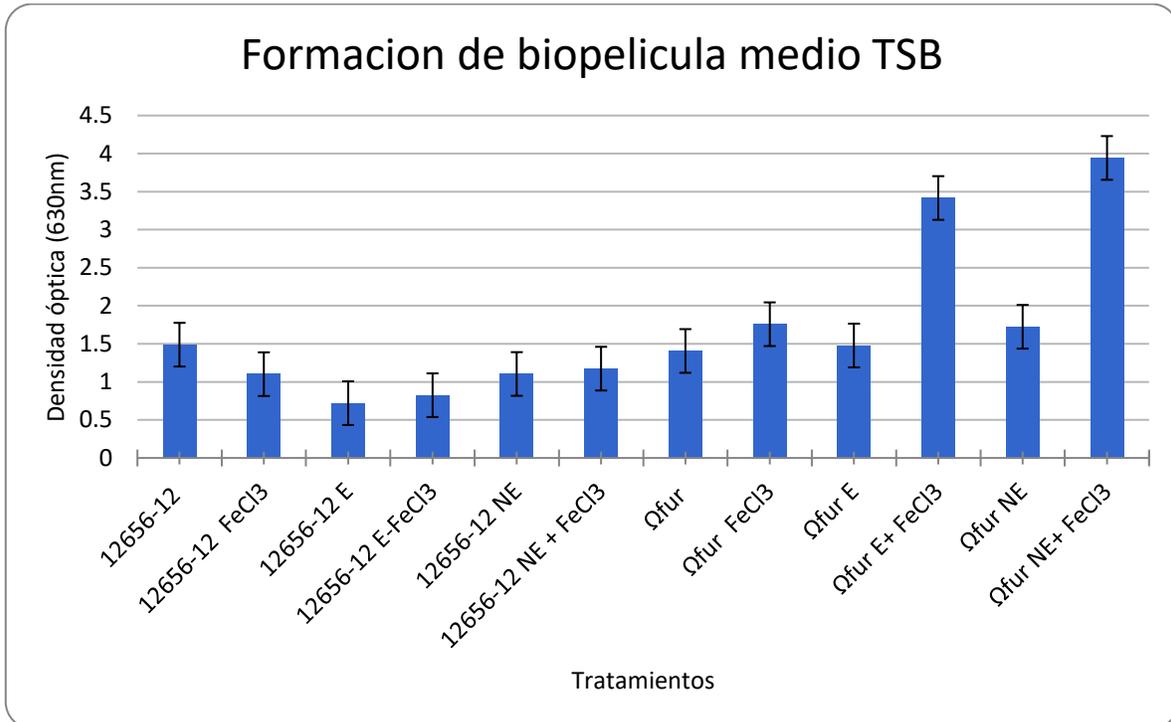
De manera similar a lo observado en la cepa mutante de *fur*, la cepa silvestre de *G. anatis* presenta una disminución en su crecimiento cuando ésta se crece en presencia de 100 μ M de LF pero, cuando la cepa silvestre se crece en presencia de LF y de D, no existe una recuperación del crecimiento como el observado con la mutante en *fur*. Por el contrario, pareciera haber un efecto sinérgico entre D y LF (Gráfica 8), solo apoyando el posible efecto tóxico de la lactoferrina.



Gráfica 8. Crecimiento de la cepa silvestre en presencia o no de LF o D con o sin LF.

7.3.- Formación de biofilm

Con el fin de determinar si existía diferencia en la capacidad de formar biopelícula entre la cepa silvestre de *G. anatis* y su mutante, éstas se crecieron en presencia o no de diferentes suplementos: hormonas (E y NE), FeCl₃ o combinaciones de hormona y FeCl₃. Los resultados obtenidos indican que la cepa silvestre forma menos biopelícula si se crece en presencia de hierro sólo o en combinación de E (50 µl) o NE (50 µl) (Grafica 9). Por otro lado, aunque la cepa mutante en el gen *fur* produce una cantidad similar de biopelícula cuando ésta se induce sin suplementos. En presencia de 100 µl de FeCl₃, se observa un incremento del 25% con respecto al cultivo sin suplementos, pero en presencia de E + FeCl₃ o NE + FeCl₃, se observa un incremento en la formación de la biopelícula del 243% y del 286%, respectivamente (grafica 9).



Gráfica 9. Formación de biopelícula de ambas cepas en presencia o no de los aditamentos Epinefrina (E), Norepinefrina (NE) y/o FeCl₃ (CF).

7.4.- Patrones de proteínas

Con el fin de determinar si existían diferencias en los patrones de proteínas entre la cepa silvestre y la cepa mutante, los extractos totales (20µg/carril) de bacterias crecidas en presencia de D, E, NE, CF o combinaciones de E+CF, NE+CF se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10%. De aquí se puede apreciar que el patrón de proteínas de la cepa mutante crecida en presencia de D es bastante diferente con respecto al control sin D en el rango de 15 a 200 kDa. En presencia de E, las diferencias se aprecian en proteínas de 150, 40, 30 y 20 kDa. La combinación de E+CF muestran disminución en una banda de 70 kDa y aparición de una de 15 kDa. En presencia de NE se aprecia la disminución de bandas de 25, 20 y 18 kDa. La mezcla de NE+CF induce la expresión de bandas de 15, 39 y 45 kDa. CF induce la expresión de dos bandas, una de 20 y otra de 23 KDa aproximadamente (Imagen 3).

Con respecto a la cepa silvestre, el crecimiento en presencia de D induce la expresión de 4 bandas de entre 100 y 150 KDa, tres entre 37 y 50, una de 30 aprox. y un par de 17 y 18 KDa aprox. Las diferencias en presencia de E se dan en proteínas de 250, 150, 55, 60 y 18 KDa aproximadamente. E+CF produce cambios en proteínas de 250, 150, 55 y 18 KDa. NE en 250, 150, 53, 50, 45 y 18 KDa. CF en 250, 150, 30, 21, 20, 16 y 15 KDa aproximadamente

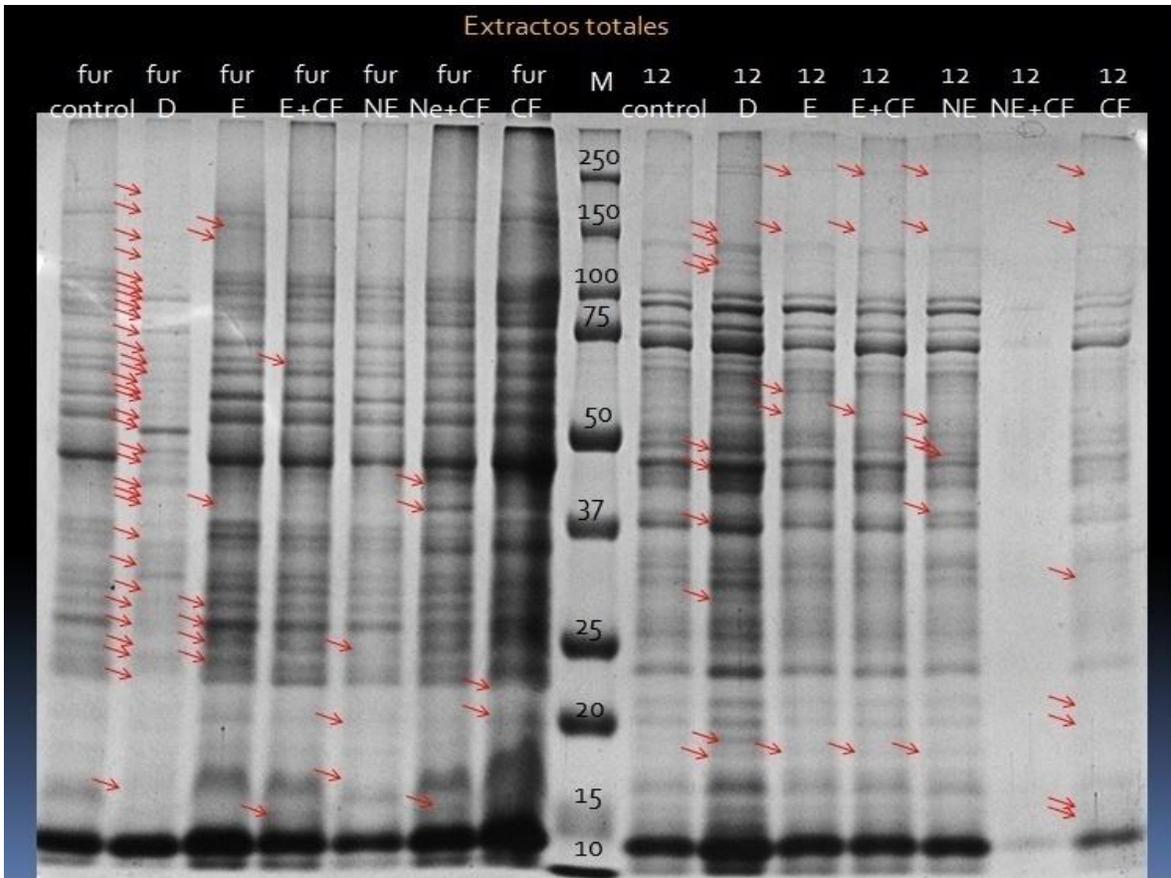


Imagen 3. Patrón de proteínas en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie donde se observan diferencias en intensidad, presencia o ausencia de bandas expresadas por crecimiento en presencia de D, CF, E, NE o combinaciones de estos. Las flechas rojas señalan las diferencias de los tratamientos con el control.

El sobrenadante libre de bacterias se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70% durante 24 h en refrigeración para obtener las proteínas secretadas. La cepa mutante no presenta diferencias en la expresión proteica en presencia de D. Cuando se añade E, disminuye la expresión de bandas de 37 y 40 kDa y se induce la expresión de una proteína de 14 KDa, en presencia de E+CF solo se aprecia la expresión de una de 14KDa. En presencia de NE se induce la expresión de proteínas de 43, 25 28 y 16 KDa aprox. NE+CF no presenta diferencias y CF expresa una proteína de 15 KDa. La cepa silvestre presenta diferencias al añadir E+CF en una banda de 15 KDa, NE de 250 100, 75, 60, 40 y 15 KDa aprox. y en CF de 60, 40, 21 y 18 KDa.

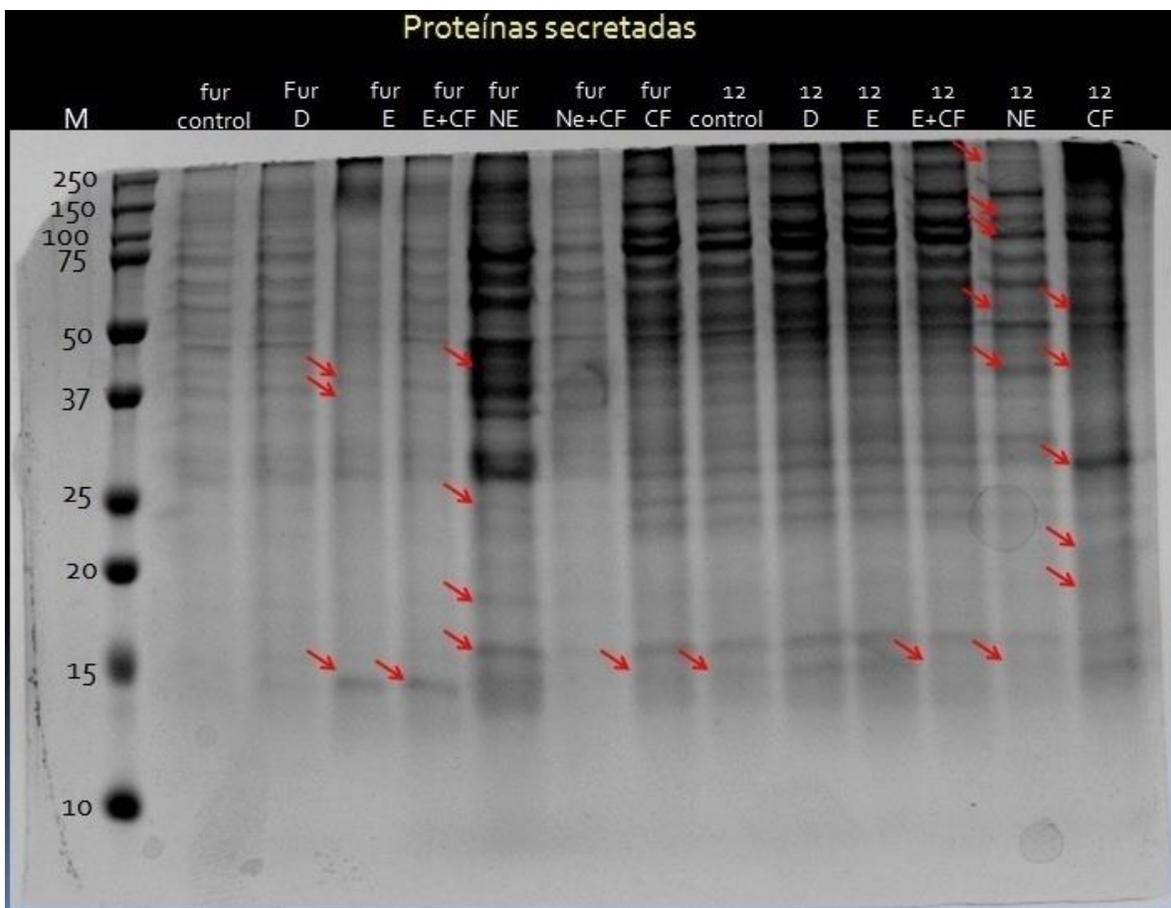


Imagen 4. Patrón de proteínas en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie donde se observan diferencias en intensidad, presencia o ausencia de bandas expresadas por crecimiento en presencia de D, CF, E, NE o combinaciones de estos. Las flechas rojas señalan las diferencias de los tratamientos con el control.

8.- Discusión

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de D, CF, LF y APAB en el crecimiento, expresión de proteínas y formación de biopelícula en la cepa de *G. anatis* 12656-12 y su mutante en *fur*. Se encontró que la mutante es menos sensible al efecto del D ya que su crecimiento, aunque disminuye, esta disminución es menor en comparación con el de la cepa silvestre, sugiriendo una capacidad más efectiva para la captación de hierro, aún en presencia de D ya que el hierro es un regulador en *G. anatis* (Chantes-Guerra *et al*, 2012).

El hierro es un nutriente esencial para el metabolismo bacteriano ya que este actúa como cofactor en enzimas involucradas en procesos metabólicos como la respiración, síntesis de DNA y la protección ante las especies reactivas de oxígeno (ROS). A pesar de ser un elemento abundante, el estado en que se encuentra en la naturaleza es un problema por su difícil adquisición por los organismos ya que factores como la humedad, la presencia de oxígeno y pH neutro, el Fe(II) se oxida a Fe(III) formando hidróxidos insolubles, lo que provoca una disminución en su disponibilidad (Chantes-Guerra, 2012). Existen dos estrategias principales por las cuales las bacterias adquieren el hierro del medio. Una es a través de moléculas específicas de alta afinidad por el hierro que facilitan el transporte de éste al interior de la célula y la segunda ocurre por medio de transportadores específicos de tipo ABC, los cuales interactúan con receptores de alta afinidad que se encuentran en la membrana externa de la bacteria, los cuales transfieren los complejos de hierro o hierro libre al interior de la célula bacteriana (Núñez-López, 2021).

Diferentes bacterias adquieren el hierro principalmente de su hospedero con la ayuda de moléculas con una alta afinidad por el hierro, las cuales producen o utilizan de otros microorganismos (Chantes-Guerra *et al.*, en preparación).

G. anatis, una bacteria Gram-negativa, ha sido considerada como parte de la microbiota del tracto respiratorio y genital de aves y es asociada a patologías como salpingitis, peritonitis, septicemia, pericarditis, hepatitis, enteritis y lesiones en el tracto respiratorio del hospedero, es por esto que ha sido clasificada como patógena oportunista, ya que puede infectar a su hospedero cuando este se encuentra en un estado de bajas defensas. Lo anterior puede provocar una baja en la producción de huevos y daña severamente el aparato reproductor de las gallinas (López-Ochoa *et al*, 2019).

Un exceso en la concentración de hierro puede estimular la formación de ROS, generando radicales de hidroxilo, lo que puede ser tóxico para las bacterias. El

gen *fur* es el encargado de regular la expresión de proteínas implicadas en la captación y almacenamiento del hierro, dependiendo de la concentración extracelular del metal (Bosch-Gallego, 2003).

Para conocer si el CF es un compuesto que las cepas puedan utilizar del medio se evaluó la recuperación en el crecimiento de ambas. Por lo mostrado en la grafica 4 el CF por si solo permite a la cepa mutante aumentar su crecimiento, por otro lado, al agregar D, el CF no es aprovechado por la bacteria, siendo así, es posible que la cepa mutante no produzca sideróforos y solo cuente con proteínas de membrana a la cual se adhiere el hierro. Al contrario, la gráfica 3 muestra a la cepa silvestre, la cual es afectada tanto por D, CF y sus combinaciones en su crecimiento disminuyéndolo, por lo que se sugiere un efecto tóxico del CF en la cepa silvestre pero no para la mutante, esto posiblemente debido a un mecanismo alterno regulado por *fur*.

El crecimiento de la cepa silvestre en presencia de D se ve muy reducido, esto debido a que el agente quelante de hierro no permite que la cepa silvestre aproveche el hierro disponible. Esto indica que la cepa silvestre cuenta con mecanismos de captación de hierro pero es incapaz de competir con el agente quelante D. Estos resultados concuerdan con los descritos por Chantes-Guerra *et al.* (en preparación) donde el crecimiento de *G. anatis* se ve reducido en un 40% en presencia de D en comparación con el control.

Ramírez-Rico en 2018 describió el efecto de la apo-lactotransferrina (apo-Lfb) en *Mannheimia haemolytica* A2. En este estudio demostró que apo-Lfb inhibe la actividad proteolítica de *M. haemolytica* y genera un efecto bactericida sobre la misma.

Tanto la cepa mutante como la silvestre, en presencia de LF no presentan cambios significativos en su crecimiento por lo que se intuye que la bacteria no solo no es capaz de usar la LF sino que también limita el crecimiento de esta por lo que se especula que esta molécula no funge como donadora de hierro para la cepa mutante ni para la silvestre, además es posible que la LF también actúe como bactericida para ambas cepas.

Las hormonas E y NE, así como el CF limitan la formación de biopelícula de la cepa silvestre, considerablemente, mientras que la cepa mutante fue capaz de producir una mayor cantidad de esta en presencia de estas moléculas, por lo que la interrupción del gen *fur* podría ser un factor que le otorgue una ventaja sobre su hospedero durante la infección.

La cepa silvestre crecida en presencia de NE y E, y en combinación con D mostró una disminución en la formación de biopelícula, lo que sugiere una dispersión de ésta al aplicarles estas hormonas. Este resultado se aprecia de igual forma en el trabajo de Gutiérrez Urbano del 2019, donde aplica NE y E a *G. anatis* 12656-12 y a su mutante en Ω *luxS*, sin embargo, la aplicación a la cepa mutante en *fur* la NE y E solas y en conjunto con CF producen un incremento muy marcado de la biopelícula, lo que indica que la mutante activa un mecanismo de captación de hierro muy eficiente en presencia de las hormonas, confiriéndole una posible ventaja sobre sus hospederos.

Las abundantes diferencias en los patrones de proteínas de la mutante en presencia o no de D indican la gran importancia que tiene la regulación de *fur*, ya que el metabolismo de esta se observa muy cambiado. En cuanto la aplicación de hormonas, las diferencias en los patrones indican un posible control en la expresión de factores de virulencia.

Estos resultados preliminares indican cambios importantes en la fisiología y probable nivel de patogenicidad de esta mutante por lo que se sugiere continuar el estudio de esta mutante.

9.- Conclusiones

- Cepa mutante crece más que la silvestre
- D afecta menos a la cepa mutante que a la silvestre
- Cepa silvestre puede obtener hierro de CF, pero no la mutante
- Cepa mutante no es afectada por CF pero si la silvestre
- Lactoferrina inhibe crecimiento de ambas cepas silvestre y mutante
- Producción de biopelícula es menor por presencia de CF y sus combinaciones
- Presencia de CF o sus combinaciones con hormonas favorecen la producción de biopelícula en la cepa mutante
- La mutación del gen *fur* afecta el patrón de proteínas.

10.- Perspectivas

- Continuar caracterizando esta cepa mutante
- Determinar si existen otros mecanismos de control de captación/almacenamiento de hierro
- Identificar alguna de estas proteínas expresadas diferencialmente

11.- Literatura citada.

Bisgaard, M., Kozack D. M., Busse, H., Kunhert, P., Bojensen, A. M. And Christensen, H. (2005). Clasificación de the taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard withing *Gallibacterium* and description of *Gallibacterium melopsittaci* sp. nov., *Gallibacterium trehalosifementans* sp. nov. And *Gallibacterium salpingitis* sp. nov. Int. J. Syst. Evo. Microbiol. 59:735-744.

Bosch-Gallego M. (2003). Caracterización de los mecanismos de captación de hierro de *Pasteurella multocida*. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Cambronel M., Tortuel D., Biaggini K., Maillot O., Taupin L., Réhel K., Rincé I., Muller C., Hardouin J., Feuilloley M., Rodrigues S. and Connil N. (2019). Epinephrine affects motility, and increases adhesion, biofilm and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* H103. Sci Rep. 9(1):20203.

Chantes-Guerra, A., Negrete Abascal, E., Vaca Pacheco, S., Sánchez Alonso, M. P. y Vázquez Cruz, C. (2012). El hierro, elemento metálico importante en la vida y en los procesos infecciosos. Elementos 85, 41-48.

Chantes-Guerra, A., López-Ochoa, J., Rea, I., Montes-García, J. F., Vaca, S., Vázquez-Cruz, C., Sánchez-Alonso, P. and Negrete-Abascal, E. *Gallibacterium anatis* putative siderophore receptor is under control of Fur but not a hemoglobin binding protein (manuscrito en preparación).

Christensen, H. and Bisgaard, M. (2008). Taxonomy and biodiversity of members of *pasteurellaceae*. *Pasteurellaceae* Biology, genomics and molecular aspects. Norfolk, UK: Caister academic press. 1-26.

Christensen, H., Bisgaard M, Bojesen, A. M., Mutters, R. Olsen J. E. (2003). Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, '*Actinobacillus salpingitidis*' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 275–287.

Dickschat J. S. (2010). Quorum sensing and bacterial biofilms. Nat. Prod. Rep. 27(3):343-369.

Echeverri-Ruíz, N. P., and Mockus-Sivickas, I. (2010). Mecanismos celulares en respuesta al estrés: sirutinas. Rev. Fac. Med, 58(3): 221-232.

Escolar, L., Pérez-Martín, J., and De Lorenzo, V. (1999). Opening their iron box: Transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181: 6223-66229.

Flores-Encarnación M., Aguilar-Gutiérrez G. R., Cabrera-Maldonado C., Guzmán-Flores J. E., Flores-Encarnación M. S. (2011). El impacto biológico de los autoinductores bacterianos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 31(2): 104-111.

García- Gómez E., Vaca S., Pérez-Méndez A., Ibarra-Caballero J., Pérez-Márquez V., Tenorio V R., Negrete-Abascal E. (2005). *Gallibacterium anatis*-secreted metalloproteases degrade chicken IgG. *Avianpathol.* 35(5): 426-429.

Gobin J. and M.A. Horwitz. (1996). Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *J Exp. Med.* 183:1527-1532.

Garibaldi, J. Neilands, J. (1956). Formation of Iron-binding Compounds by Microorganisms. *Nature* 177, 526–527

Gutiérrez Urbano Diana Itzel. (2019). Caracterización de la cepa de *Gallibacterium anatis* 12656-12 mutante en *luxS*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.*, 27(5), 637-657.

Kristensen B. M., Frees D., Bojesen A. M. (2010). GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organization. *Vet. Res.* 41 (3):1-25.

Kachlany S. C., Balashova N. V. (2008). Protein secretion in *Pasteurellaceae*. Biology, genomics and molecular aspects. Norfolk, UK: Caister Academic Press. 113-131.

Leon K. P. 2009. *Gallibacterium anatis*. *Avic. Prof.* 27(6): 24-26.

López-Ochoa A. J., Sánchez-Alonso M. P. G., Vázquez-Cruz, C., Horta-Valerdi, G., Vaca, S., Mejía R, Pérez-Márquez V. M. Negrete-Abascal E. (2019). Molecular and genetic characterization of pOV plasmid and construction of an integration vector for *Gallibacterium anatis*. *Plasmid* 103, 45-52

Martínez-González, K. K., (2010). Identificación de proteínas inmunogénicas secretadas por *Avivacterium paragallinarum* bajo estrés por hierro (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.

Martínez-González, K. K., (2013). Análisis de la expresión de factores de virulencia regulados por *Quorum sensing* en *Gallibacterium anatis*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.

Miller M. B., Bassler B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev. Microbiol.*; 55:165-99.

Montes-García Juan Fernando. (2012). Determinación de condiciones de movilidad *in vitro* de *Gallibacterium anatis*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

Montes-García J. F., Vaca S., Vázquez-Cruz C., Soriano-Vargas E., Aguilar-Romero F., Blackall P. J., Negrete-Abascal E. (2016). Identification of a hemagglutinin from *Gallibacterium anatis*. *Curr. Microbiol.* 72(4):450-456.

Núñez-López L. (2021). Genómica comparativa de la adquisición de hierro por sideróforos en bacterias (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de ciencias, México.

Pasupuleti S., Sule N., Manson M. D., Jayaramana A. (2018). Conversion of norepinephrine to 3,4-dihoxymandelic acid in *Escherichia coli* requires the QsecBC quorum-sensing system and the fear transcriptional factor. *J. Bacteriol.* 200(1):1-9.

Pérez, G., Vittori, D., Pregi, N., Garbossa, G., Nesse, A. (2005). Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta Bioquím. Clín. LatAm.*, vol. 39(3):301-314.

Persson G., Bojesen A. M. (2015). Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry. *Vet Res.* 46(19):1-11.

Ragnhild J. B., Persson G., Nesta B., Soriani M., Serino L., Jeppsson M., Tine K. Nielsen., Bojesen A. M. (2013). Outer membrane vesicles reflect environmental cues in *Gallibacterium anatis*. *Vet. Microbiol.* 167 565–572

Ramírez-Rico G. A., (2018). Estudio *in vitro* del efecto de la lactoferrina en la secreción de proteasas de *Mannheimia haemolytica* A2. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Cuautitlan, México.

Rea-Hernández, J. I. (2011). Respuesta a estrés por hierro en *Gallibacterium anatis*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Iztacala, México.

Reyes-Malpica, E. (2018). Respuesta al estrés por hierro de *Actinobacillus seminis*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Iztacala, México.

Rodríguez-Franco D. A., Vázquez-Moreno L. y Ramos-Clamont M. (2005). Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Rev. LatAm microbiol.*, 47 (3-4) 102-11

Roh, H.-J., Hilt, D. A. & Jackwood, M. W. (2013). Simultaneous detection of five major serotypes of Avian coronavirus by a multiplex microsphere-based assay. *J. Vet. Dia. Inv.*, 25(4), 458–466.

Salgado L. M. L., Vaca S., Vázquez C., Zenteno E., Rea L., Pérez-Márquez V. M., Negrete-Abascal E. (2012). Adhesion of *Gallibacterium anatis* to chicken oropharyngeal epithelial cells and the identification of putative fimbriae. *Adv. Microbiol.* 2(4):205-510.

Sánchez-Espinoza C. A. (2010). Adherencia de *Gallibacterium anatis* sobre superficies inertes. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Iztacala, México.

Sandrini S. M., Shergill R., Woodward J., Muralikuttan R., Haigh R. D., Lyte M. and Freestone P. P. (2010). Elucidation of the mechanism by which catecholamine stress hormones liberate iron from the innate immune defense proteins transferrin and lactoferrin. *J. Bacteriol.* 192(2):587-594.

Schryvers A.B., Stojiljkovic I. (1999). Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *MolMicrobiol.* 32(6):1117-23.

Sperandio V., Torres A. G., Jarvis B., Nataro J. P. and Kaper J. B. (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proceedings of the National Ac. of Sci. of the U.S.A.*, 100(15), 8951-8956.

Vaca S., Monroy E., Rojas L., Vázquez C., Sánchez P., Sariano-Vargas E., Bojesen A. M., Negrete-Abascal E. (2011). Adherence of *Gallibacterium anatis* to inert surfaces. *J Anim. Vet Adv.* 10(13):1688-1693.

Zepeda A., Ramírez S., Vega S., Morales V., Talavera M., Salgado Miranda C., Simón-Martínez J., Bojesen A. M., Soriano-Vargas E. (2009). Hemagglutinating activity of *Gallibacterium anatis* strains. *Avian Dis.* 53(1):115-118.

La parte más difícil de terminar es volver a empezar.

--Chester Bennington--