



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

EFFECTO DE LA TESTOSTERONA SOBRE LOS FACTORES DE
VIRULENCIA EN *Actinobacillus seminis*.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A :

GERARDO ANTONIO RAMÍREZ PAZ Y PUENTE

TUTOR

DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL

COMITÉ TUTOR

DRA. MARTHA OFELIA SALCEDO ÁLVAREZ

DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

DR. ERIC MONROY PÉREZ

MTRO. JUAN FERNANDO MONTES GARCÍA

Los Reyes Iztacala, Edo. de Méx.; Septiembre, 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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-UNAM PAPIIT IN204122

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a cuatro grandes personas que a lo largo de toda mi carrera han estado conmigo en las buenas pero sobre todo en las malas, personas que me han enseñado muchísimo y que han marcado mi vida entera:

A Carlos Ignacio Chávez Flores: Mi más grande y mejor amigo, de quien aprendí muchísimo acerca de salir adelante frente a situaciones adversas, a no rendirme por más difícil que sea la situación en la que me encuentre y a sobreponerme a todas las dificultades que aparezcan en la vida. Gracias, amigo, por tantos consejos, tantas palabras de aliento y siempre apoyarme en todo.

A Oscar Antonio Rojano Ávila: Gran artista y compositor, quien me enseñó que la ciencia y el arte no están peleados, sino que siempre se pueden juntar para crear escenarios maravillosos. Gracias a tu apoyo, Maestro, jamás me rendí ni dejé que mis sueños se esfumaran. Gracias, Maestro, por estar siempre en los momentos más difíciles, por hacerme ver mis errores y ayudarme a corregirlos. Gracias por tanto y por todo.

A Eduardo Salif Luna Ávila: Quien me demostró que siempre hay oportunidades en esta vida para seguir adelante, que cada momento vivido es una nueva aventura y que no hay que desaprovechar aquellos momentos de felicidad y alegría. Salif, gracias por siempre apoyarme en mis loqueras, por estar siempre que más te necesito, pero sobre todo, gracias por tantos años de risas y proyectos juntos. Gracias por enorme amistad y confianza.

A Diego Francisco Cuevas Estrada: Excelente amigo que me demostró que por más eventualidades que ocurran, siempre una amistad verdadera vencerá todas las adversidades y que dicha amistad puede durar por más de una vida. Gracias, Dieguito, por demostrarme lo valioso que puedo llegar a ser para alguien, por tu amistad y sobre todo, tu cariño.

Y a mi amada Compañía Artística “Amor Paz y Puente”: Por haberme dado experiencias maravillosas, por ser mi medio de escape frente a grandes adversidades y, sobre todo, por ayudarme a ser quien soy hoy en día. Sin ti, probablemente no estaría el día de hoy donde me encuentro. Gracias por ocho años de trabajo, de amistades, de alegrías y experiencias que jamás olvidaré. Pero sobre todo, les agradezco de todo corazón a aquellos que me han ayudado a formar dicha Compañía y no dejar que se hunda.

AGRADECIMIENTOS

En primer término, quiero agradecer a todas las personas dentro de mi familia que me apoyaron para que hoy pueda estar en el lugar donde me encuentro: mi madre, Teresa Paz y Puente; mi abuela, Remedios Florido; mi hermano, Erick Ramírez; mis tíos José Paz y Puente y Liliana Ocotitla: Sin su apoyo y palabras de aliento hace mucho que no hubiera seguido adelante. En verdad, muchas gracias.

Aunado a ello, quiero agradecer de todo corazón a aquellos profesores que me mostraron lo maravilloso de la Biología, que me mostraron que existen profesores ejemplares y que la docencia es un arte ejemplar: Mtra. Irma Estrella Beatriz Manuell Cacheux, Mtra. María de los Ángeles García Gómez, Mtro. Uriel Ángel Sánchez Rivera, Mtro. Francisco López Martínez, Dra. Leonor Ana María Abúndiz Bonilla; pero sobre todo, quiero agradecerle al Dr. Ismael Herminio Pérez Hernández (Q.E.P.D.), a quien le debo mi amor por la bioquímica y quien más que un maestro, fue un amigo, gracias por todo, Isma.

También quiero agradecer a mis sinodales por todo el apoyo que me dieron para poder el día de hoy titularme: Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras, Dr. Eric Monroy Pérez, Dr. Fernando Montes García y a la Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez. En verdad, muchísimas gracias por todo su apoyo, comprensión y grandes conocimientos.

A mis grandes compañeros de laboratorio, Pablo (de quien aprendí muchas técnicas en el laboratorio), Charlie (con quien compartí muchas experiencias, unas más divertidas que otras). Mich (quien me ha aguantado por casi seis años), Bucio, Luis, Valentina, Nora y Dani (los primeros chicos a quienes pude enseñarles lo poco que sé de lo mucho que trabajamos en el lab). Gracias por tantas experiencias, tantas risas y tantos momentos compartidos.

Pero sobre todo, quiero agradecerle al Dr. Erasmo Negrete Abascal: Excelente docente y gran ejemplo a seguir. Una persona a quien realmente admiro demasiado y quien me ha apoyado en muchas situaciones. Gracias por aceptarme en su laboratorio y por aguantar todas mis burradas. Gracias por siempre tener una sonrisa y una broma al alcance de la mano. Gracias por tanto y por todo.

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1 Epididimitis	6
2.2 <i>Actinobacillus seminis</i>	7
2.3 Factores de Virulencia	8
2.4 Adhesinas y su importancia durante la colonización y el desarrollo infeccioso	9
2.5 Proteínas Amiloides	10
2.6 Biopelículas	11
2.7 Hormonas Esteroideas Sexuales	12
2.8 Testosterona	14
3. ANTECEDENTES	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. HIPÓTESIS	17
6. OBJETIVOS	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.1 Crecimiento bacteriano	18
7.2 Cinética de Crecimiento	18
7.3 Obtención de Proteínas	18
7.4 Obtención de Proteínas de Membrana Externa	18
7.5 Obtención de Adhesinas	19
7.6 Cuantificación de Proteínas	19
7.7 Electroforesis	19
7.8 Western Blot	19
7.9 Far - Western Blot	19
7.10 Curva de calibración de Rojo Congo	20
7.11 Unión de Rojo Congo	20
7.12 Aislamiento de Proteínas Amiloides	20
7.13 Formación de Biopelículas	20
7.14 Dispersión de Biopelícula	21
8. RESULTADOS	22
9. DISCUSIÓN	34
10. CONCLUSIONES	37
11. PERSPECTIVAS	38
12. REFERENCIAS	39

1. RESUMEN

Actinobacillus seminis es una bacteria Gram negativa que por sus características pertenece a la Familia Pasteurellaceae, misma que habita de manera natural en el prepucio de bovinos, ovinos y caprinos. Esta bacteria es causante común de epididimitis ovina, infertilidad y esterilidad de carneros en todo el mundo, patología que se establece cuando los organismos alcanzan la madurez sexual y hay un incremento en las concentraciones hormonales, especialmente testosterona. Se ha reportado que las hormonas esteroideas sexuales participan en la comunicación entre microorganismos y sus hospedadores, lo cual puede ser ventajoso para microorganismos patógenos como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto que tiene la testosterona (a 1, 2, 3, 4 y 5 ng/ml) en el crecimiento y expresión de probables factores de virulencia en *A. seminis* cepa de referencia ATCC. Gracias a esta investigación se logró determinar que la adición de testosterona al medio de cultivo favorece, hasta en un 100%, el crecimiento de *A. seminis* con respecto al control. Aunado a ello, la presencia de dicha hormona favorece la expresión de cinco proteínas de 22, 27, 40, 50 y 65 KDa, las cuales podrían ser consideradas probables adhesinas, por su interacción con fibrinógeno. Asimismo, se favoreció la expresión de una proteína de 55 KDa que interactúa con fibronectina. En conjunto, las seis proteínas le podrían permitir a *A. seminis* interactuar con células del hospedero, favoreciendo la colonización de su hospedero. De manera similar, la presencia de testosterona favorece la expresión de dos proteínas (75 y 27 KDa) y la disminución de una de 15 KDa acorde a la concentración de hormona presente. *A. seminis* expresa tres proteínas tipo amiloides de 48, 37 y 30 KDa, y en presencia de testosterona, se modifica su expresión. Esta hormona no interviene en la formación de biopelícula, sin embargo, cuando la biopelícula ya se encuentra formada, a una concentración de 2ng/ml de testosterona, ésta favorece el desarrollo de la biopelícula. El efecto de la testosterona en el crecimiento y expresión de supuestos factores de virulencia de *A. seminis* podría ser importante en la patogenia de este microorganismo.

Palabras clave: *Actinobacillus seminis*, epididimitis, testosterona, adhesinas, biopelícula, proteínas amiloides.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Epididimitis

La epididimitis infecciosa en los carneros es considerada una enfermedad importante en regiones ganaderas, generando grandes pérdidas económicas debido a los efectos negativos sobre la fertilidad del rebaño, ya que es una enfermedad caracterizada principalmente por la inflamación del epidídimo y la degeneración de los testículos en aquellos organismos que infecta (Gutiérrez *et al.*, 2015). Entre los agentes relacionados con esta enfermedad, además de *Actinobacillus seminis*, se encuentran bacterias como *Brucella ovis*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*, la mayoría de ellas pertenecientes a la Familia Pasteurellaceae (Genetzky, 1995).

Esta patología se establece cuando los borregos alcanzan la madurez sexual, pero al ser una condición irreversible, también se diagnostica en carneros adultos (Low *et al.*, 1995). La epididimitis es una enfermedad que afecta al conducto que está adherido a la cara posterior lateral del testículo, este padecimiento causa inflamación, ya sea aguda o crónica, aumento en la temperatura del testículo, abundancia de tejido fibroso, presencia de granulomas espermáticos, así como atrofia testicular y lesiones en la cola del epidídimo que se asocian con espermatocitos. Debido a que este órgano es un conducto enrollado, cualquier lesión a lo largo de su longitud genera la obstrucción del flujo y afecta directamente en la formación de espermatozoides (Foster, 2017).

La patogenia de la epididimitis es incierta. Se sugiere que *A. seminis* es un microorganismo oportunista presente en la cavidad prepucial, formando parte de la microbiota de bovinos, ovinos y caprinos, capaz de colonizar las partes profundas del tracto genital, provocando epididimitis en los animales jóvenes más vigorosos y de rápido crecimiento. La lesión traumática del epidídimo, la subsiguiente liberación de histamina y la colección de pequeñas cantidades de fluidos ricos en proteínas, favorece la colonización por estos microorganismos (Jansen, 1983; Bulgin *et al.*, 1990). Asimismo, factores predisponentes como el estrés, que induce cambios hormonales, así como las deficiencias nutricionales, pueden causar desarrollo de orquitis y epididimitis, particularmente en ovejas jóvenes (Dibarrat *et al.*, 2006).

La epididimitis por *A. seminis* también conocida como de los “corderos vírgenes”, afecta carneros de 6 a 15 meses de edad y, como se ha dicho previamente, tiene alto impacto económico en productores de pie de cría que producen carneros con fines reproductivos, ya que los corderos infectados que desarrollan la enfermedad primero reducen su fertilidad y finalmente resultan estériles (Hwang *et al.*, 1989).

2.2 *Actinobacillus seminis*

Actinobacillus seminis es un cocobacilo pleomórfico, Gram negativo, inmóvil no esporulado, con un tamaño que oscila los 4 µm de largo, no fermenta azúcares, ureasa negativa y catalasa positiva, perteneciente a la Familia Pasteurellaceae (Figura 1). Sus colonias presentan un color gris claro a blanco, lisas y con margen entero cuando son incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas en agar BHI suplementado con sangre de oveja al 5% (Al-Katib y Dennis, 2009; Appuhamy *et al.*, 2020). Además, *A. seminis* es una bacteria formadora de biopelículas que contienen una matriz extracelular compuesta principalmente de material fibrilar (Montes-García *et al.*, 2020).

A. seminis es una bacteria que habita naturalmente en el tracto reproductor de ovejas y cabras, aislada en individuos de tres meses de edad hasta los 4.5 años, transmisible por medio de la membrana mucosa de todas las cavidades (poco común en las vías respiratorias, donde se han reportado pocos casos) o por contacto directo (Al-Katib y Dennis, 2009; Montes-García *et al.*, 2018). Esta bacteria es causante común de epididimitis ovina e infertilidad y esterilidad de carneros en todo el mundo (Appuhamy *et al.* 2020; Moustacas *et al.*, 2014), esta patología se establece cuando los borregos alcanzan la madurez sexual, pero por ser una condición irreversible, también se ha diagnosticado en carneros adultos (Acosta *et al.* 2006). *A. seminis* ha sido aislado en casos de epididimitis a partir de muestras de semen en Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos de Norte América, México, Reino Unido y España (Dibarrat *et al.*, 2006).

Se sabe que *A. seminis*, es un patógeno oportunista de la población microbiana en tejidos prepuciales de ovinos jóvenes, el cual asciende de la punta prepucial al epidídimo cuando las hormonas luteinizantes y estimulantes foliculares incrementan su concentración (Montes-García *et al.*, 2019). El conocimiento acerca de los factores de virulencia expresados por *A. seminis* es escaso, sin embargo, se ha reportado que esta bacteria se une a diversos tipos celulares, especialmente aquellas que forman parte del epitelio renal ovino, y caprino considerándose esta unión como un primer paso en un proceso de patogenicidad (Montes-García *et al.*, 2018). Este evento está mediado por diferentes componentes celulares en el cual se ven involucradas estructuras fimbriales o afimbriales.

La transmisión del microorganismo ocurre por vía venérea; sin embargo, debido a que *A. seminis* ha sido aislado de borregos sin apareamientos previos, la transmisión puede darse de forma no venérea. Es importante considerar que *A. seminis* ha sido aislado hasta en el 13.8% de carneros que no presentaban lesiones clínicas en el epidídimo, el testículo o alteraciones seminales, por lo que los animales infectados pueden ser considerados portadores asintomáticos (Acosta y Tórtora, 2002). El mecanismo más aceptado, que explica una vía alterna de transmisión, sugiere que las ovejas infectadas actúan como intermediarias al contaminar a los corderos durante el parto (Burgess, 1982; Al-Katib y Dennis, 2009).

Catalasa	+	Hidrólisis de la esculina	+ (-8)
Oxidasa	+	Satelitismo (<i>S. aureus</i>)	-
O/F	Fermentativa	Ribitol	-
Indol	-	Arabinosa	+
Ureasa	-	Dulcitol	-
Nitrato	+	Fructosa	+ (-1)
H₂S (TSI)	-	Galactosa	+ (-5)
H₂S (Acetato de plomo)	+	Glucosa	+
Rojo de Metilo	-	Inulina	-
Voges-Poskauser	-	Lactosa	-
Ornitina descarboxilasa	+	Maltosa	+ (-1)
Lisina descarboxilasa	-	Manitol	+ (-8)
Arginina dihidrolasa	-	Manosa	-
Fenilalanina desaminasa	-	Rafinosa	-
Triptófano daminasa	-	Sorbitol	- (+6)
Fosfatasa	-	Sacarosa	-
Beta-galactosidasa (ONGP)	-	Trehalosa	-
Citrato	-	Xilosa	+

Figura 1. Características bioquímicas de *Actinobacillus seminis* (Modificado de Hajtós *et al.*, 1987).

2.3 Factores de Virulencia

A lo largo de la evolución de los diferentes organismos que habitan en el planeta, ha habido convivencia entre ambos grupos celulares (procariotas y eucariotas), con lo cual, la interacción entre ellos ha favorecido una coevolución entre ambos, generando relaciones de mutualismo, simbiosis, depredación, entre otros. Sin embargo, también se han desarrollado organismos que en lugar de favorecer la convivencia entre huésped - hospedero, éste último resulta afectado de manera directa por el primero, llevándolo incluso hasta su muerte. Pero para ello, los microorganismos que generan este daño (también llamados patógenos) deben desarrollar una gran gama de mecanismos por los cuales evitar la respuesta inmune de su hospedero: Factores de Virulencia (Diacovich y Gorvel, 2010).

Estos denominados factores de virulencia les permiten a los microorganismos invadir al hospedero, expresar receptores superficiales especializados para su adhesión, permanecer en estos sitios a través de procesos de colonización, evadir al sistema inmune, y finalmente causar daño tisular con el fin de lograr acceso a fuentes de nutrientes necesarios para su crecimiento y reproducción (Meylan *et al.*, 2006) (Figura 2). Aunado a ello, estos microorganismos también son capaces de secretar diferentes tipos de toxinas y moléculas que evitan la interacción de otras

bacterias u hongos, favoreciendo de esta manera su permanencia en el hospedero (Wu *et al.*, 2008).

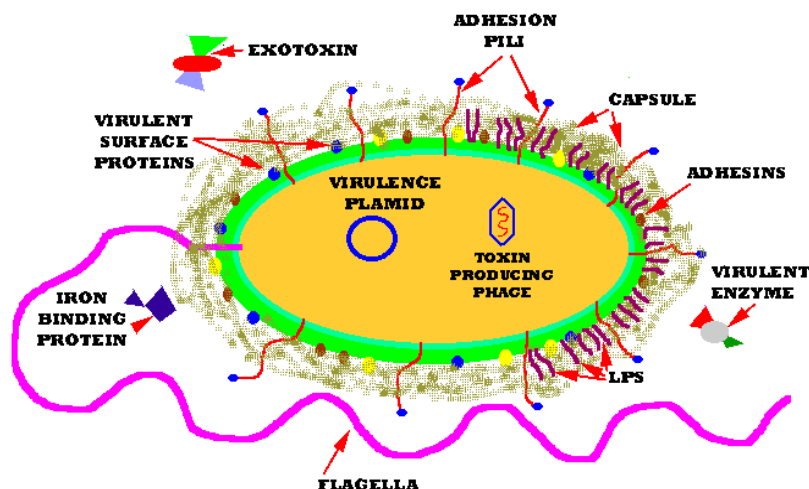


Figura 2. Factores de virulencia expresados por bacterias. (Tomado de Rivas-Muñoz, 2013).

Así pues, aunque existe poco conocimiento acerca de los factores de virulencia expresados por *A. seminis*, en el 2006, Núñez del arco y colaboradores identificaron una proteína con una masa molecular de 75 KDa en el sobrenadante, misma que sólo es expresada por este organismo y que podría ser usada por el microorganismo para causar daño tisular irreparable o irreversible. Posteriormente, en el año 2015 De la Cruz caracterizó una proteína del tipo metaloproteasa que puede degradar Inmunoglobulina G y fibrinógeno de ovino, evitando de esta manera la respuesta inmune del hospedero. Reyes en el 2018 sometió una cepa de *A. seminis* a un estrés férrico con lo cual logró identificar tres proteínas con pesos moleculares de 75, 50 y 25 KDa, las cuales están relacionadas en la síntesis de sideróforos y otras funciones como el aprovechamiento del hierro. Montes-García y colaboradores en el 2019 identificaron y purificaron una proteína de 63 KDa misma que fue identificada como hemaglutinina por ensayos de aglutinación de eritrocitos de conejo y caracterizada como una proteína homóloga a Gro-EL por espectrometría de masas, sin embargo, los autores señalaron que esta proteína podría ser una subunidad de una proteína de aproximadamente 150 KDa.

Además, en el 2018 Montes-García y colaboradores identificaron dos proteínas en *A. seminis* con pesos moleculares de 25 y 40 KDa, por medio de espectrofotometría de masas, como fosfoglicerato mutasa y factor de elongación termoinestable (EF-Tu) con función de adhesinas.

2.4 Adhesinas y su importancia durante la colonización y desarrollo infeccioso

Al igual que otras moléculas que expresan las bacterias para favorecer su colonización, existen aquellas proteínas que son utilizadas para adherirse de manera efectiva a células del hospedero en el cual inician su proceso de infección, mismas que reciben el nombre generalizado de

adhesinas. Cabe recalcar que estas adhesinas le permiten a un microorganismo, patógeno o no, interactuar con diferentes tipos celulares o tejidos y con ello, colonizar a su hospedero o interactuar con diferentes superficies, gracias a lo cual son consideradas un factor de virulencia importante en el estudio y caracterización de los microorganismos (Coutte *et al.*, 2003). Especialmente, las adhesinas son responsables del reconocimiento y unión específica a los receptores del hospedero (Gerlach y Hensel, 2007). La mayoría de los patógenos bacterianos tiene la capacidad de expresar múltiples adhesinas de forma diferencial durante las etapas del proceso infeccioso (Klemm y Schembri, 2000). Asimismo, es sabido que las adhesinas pueden participar en la evasión del sistema inmune, dirigiendo la entrada a células fagocíticas por la interacción de la célula con adhesinas bacterianas, como la hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* o los pili hemaglutinantes de *Haemophilus influenzae* (Ishibashi *et al.*, 1994). Como se ha mencionado anteriormente, las bacterias han mejorado y adaptado los mecanismos por medio de los cuales evitan la acción degradadora de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (principales participantes en la respuesta inmune innata), por lo que la fagocitosis no siempre conduce a la muerte bacteriana, sino que puede convertirse en un factor de virulencia más, permitiendo a la bacteria diseminarse a otros sitios y ocultarse de la acción del sistema inmune o de antibióticos (Kline *et al.*, 2009).

Por otro lado, aquellos patógenos que infectan de manera intracelular también pueden utilizar este tipo de proteínas y moléculas de adhesión como mecanismos invasivos (llamadas invasinas) y entrar a células no fagocíticas; permitiéndole a un microorganismo evadir los sistemas defensivos del hospedero y confiriéndole la capacidad de traspasar barreras celulares, como el epitelio intestinal o la barrera hematoencefálica, generando daños mayores en el hospedero (Finlay y Cossart, 1997).

La matriz extracelular, al estar compuesta por proteínas fibrosas (colágeno y elastina) y glucoproteínas (como fibrinógeno, fibronectina, y laminina), con complejas interacciones entre sí, y que a su vez participan en la señalización celular y la comunicación con células adyacentes (Kim *et al.*, 2011), puede servir como sitio de anclaje o adhesión para diferentes microorganismos. Esta interacción con proteínas bacterianas puede modificar la respuesta del hospedero y favorecer la invasión a la célula (Westerlund y Korhonen, 1993).

2.5 Proteínas Amiloides

Las proteínas amiloides bacterianas presentan las propiedades estructurales y bioquímicas de las proteínas amiloides descritas en eucariontes; es decir, unen colorantes tales como el Rojo Congo (RC) y la tioflavina T. El análisis estructural de las proteínas amiloides bacterianas muestra unas fibras ricas en láminas β en su estructura secundaria (Zhou *et al.*, 2012). El colorante rojo Congo es un compuesto hidrofóbico que se une a proteínas amiloides. Las fibras amiloides son agregados de proteínas resistentes a la desnaturalización química, a la digestión ácida y a

tratamientos físicos como la ebullición; asimismo resisten la desnaturalización con SDS o digestión por proteinasa K (Kimizuka *et al.*, 2009). También se ha descrito que los monómeros de estas fibras son altamente auto-agregables (Collinson *et al.*, 1999).

Recientemente se describió una clase de proteínas amiloides "funcionales" en bacterias, lo que indica que el pliegue amiloide, que en enfermedades neurodegenerativas se describe como un defecto de ensamble, puede ser funcional en procariotas (Barnhart *et al.*, 2006). Hasta ahora, se sabe que la mayoría de las proteínas amiloides funcionales en bacterias, realizan tareas fisiológicas en la superficie celular, incluyendo la formación de biofilm, en el que recientemente se ha demostrado que conforman hasta el 40% de la biomasa (Zhou *et al.*, 2012).

Existe actualmente un conocimiento amplio acerca de la proteína amiloide denominada curli, expresada por *Escherichia coli* o *Salmonella* spp. (Collinson, *et al.*, 1991, Chapman *et al.*, 2002) y fibras TasA producidas por *Bacillus subtilis* (Romero *et al.*, 2010); estas son proteínas amiloides funcionales por medio de las cuales estos microbios establecen interacciones inter-bacterianas. Las fibras curli tienen capacidad adherente e interaccionan con moléculas del hospedero como laminina, fibronectina, plasminógeno y el Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I. Esta habilidad sugiere que las fibras curli participan en la mediación de la invasividad de estas bacterias, además de que promueven la evasión del sistema inmune al tener la capacidad de recubrirse con fibronectina; también es probable que esta capacidad de interaccionar con moléculas de la matriz extracelular del hospedero facilite el establecimiento del biofilm (Gophna *et al.*, 2009).

2.6 Biopelículas

Uno más de los factores de virulencia que expresa *A. seminis* es la capacidad de formar biopelícula o biofilm (Montes García *et al.*, 2020), mecanismo que se define como una estructura compleja que le permite a un microorganismo, anteriormente considerado unicelular e individual, presentar conductas multicelulares, sobrevivir en ambientes hostiles, resistir varios tipos de estrés y coordinadamente controlar la expresión de múltiples genes por medio de la liberación y detección de moléculas autoproducidas (*quórum sensing*), que les garantice un efecto específico y suficiente para sobrevivir y permanecer por períodos más prolongados en el ambiente o dentro de su hospedero, causándole una enfermedad crónica (Montes-García, *et al.*, 2017). Estas estructuras están compuestas principalmente, por polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Montes-García *et al.*, 2020). Una biopelícula constituida por miembros de una sola especie bacteriana estará limitada a las capacidades metabólicas y defensivas de este microorganismo; por el contrario, una constituida por diferentes especies bacterianas u otros microorganismos presentará mayor capacidad para utilizar metabolitos más variados y responder a los estímulos adversos del ambiente (Petruzzi, *et al.*, 2016).

La formación de una biopelícula comienza cuando las bacterias planctónicas identifican una superficie, estructura o sustrato, las bacterias comienzan la fijación mediante uniones por medio de filamentos u apéndices tales como fimbrias o pili, una vez adheridas a una superficie, da inicio la fase de crecimiento, en la cual las células bacterianas se dividen y se propagan alrededor del sustrato, a la par que secretan su matriz que las recubre y la cual adquiere una forma similar a los cuerpos fructíferos de las setas. Finalmente, las células se liberan para colonizar nuevas superficies ya sea de forma individual o en conglomerados, esta liberación puede ocurrir por dos vías; la primera consiste en algún daño físico que genere el desprendimiento de partes de la biopelícula, y la segunda, es la dispersión del propio biofilm mediante una serie de señalizaciones por la cual se generan diferentes procesos para degradar la matriz y favorecer la dispersión o diseminación de las bacterias (Petrova y Sauer, 2016).

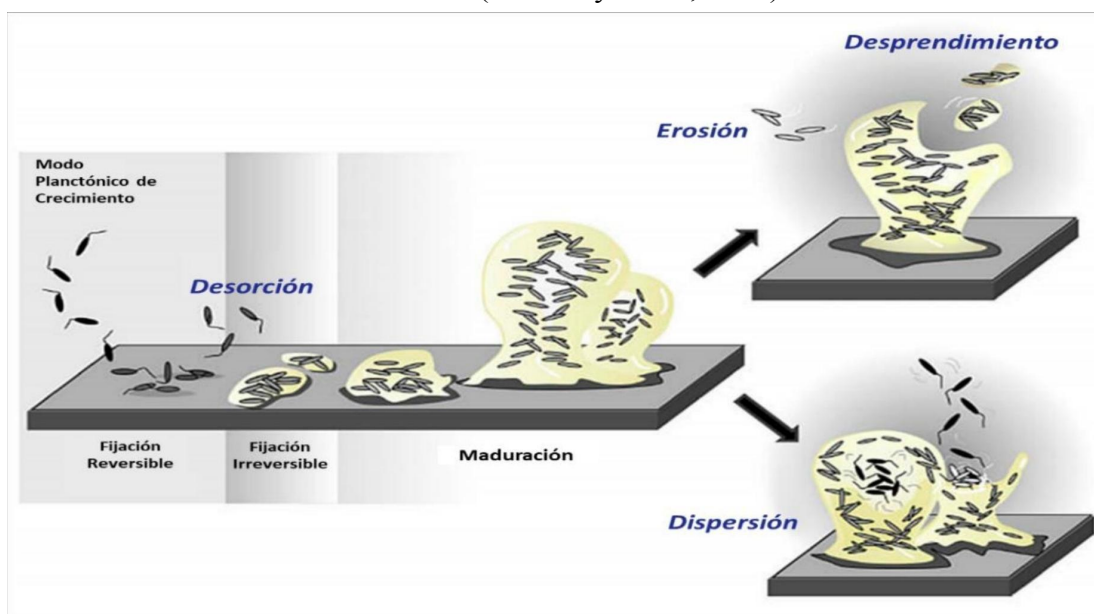


Figura 3. Modelo de las fases de formación de una biopelícula (Tomado de Bautista-Betancourt, 2020. Modificado de Petrova y Sauer, 2016).

2.7 Hormonas Esteroideas Sexuales

Las hormonas esteroideas son macromoléculas que por sus características estructurales pertenecen al grupo de los lípidos, ya que derivan del colesterol, molécula de gran importancia en células eucariotas, ya que brinda, entre otras propiedades, fluidez y estabilidad a la membrana celular. Como tal, el conjunto general de las hormonas esteroideas juega un papel especialmente importante en eucariotas debido a que tienen diversas funciones, gracias a las cuales pueden agruparse en cinco principales grupos, dependiendo del tipo de receptor al cual se unirán y las funciones que ejercen en el organismo: glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos, y progestágenos. Específicamente los andrógenos son las principales hormonas sexuales masculinas (presentes en concentraciones de ng/ml hasta $\mu\text{g/ml}$, dependiendo de la

especie (Edwards, 2005)), cuya función es la estimulación en el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos.

Este tipo de hormonas será secretado principalmente por los testículos, sin embargo, en hembras es secretada en los ovarios y sus concentraciones se encuentran expresadas en pg/ml. La principal molécula representante de los andrógenos es la testosterona, que comparte características estructurales con otras hormonas esteroideas sexuales, tales como el estradiol y la progesterona. (Figura 4).

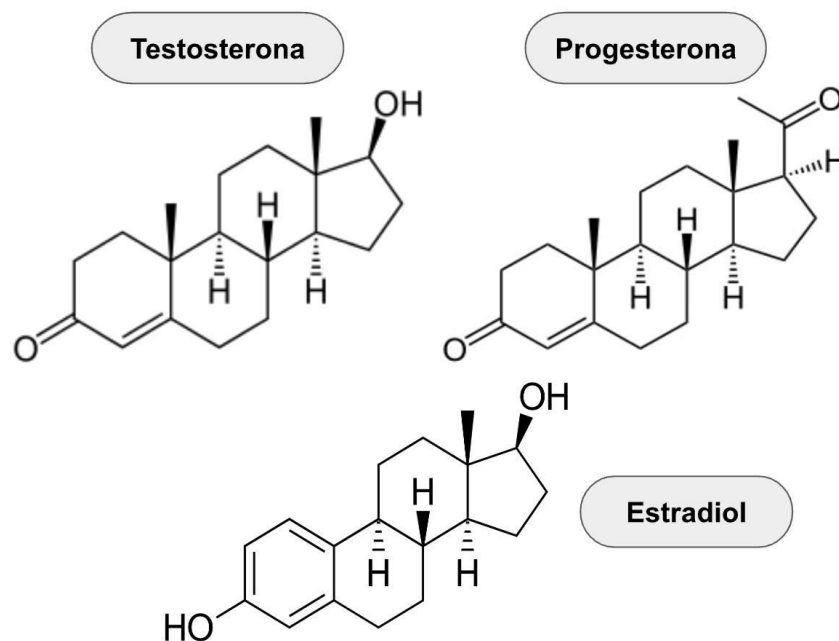


Figura 4. Representación gráfica de las principales hormonas esteroideas sexuales (Tomado de Ramírez-Paz-y-Puente *et al.*, manuscrito en preparación).

Las hormonas esteroideas sexuales (especialmente el estradiol y la testosterona) desempeñan funciones fisiológicas de gran importancia y relevancia en el desarrollo de los diferentes organismos, entre las que se encuentran la reproducción, la diferenciación, proliferación celular, procesos de apoptosis, mecanismos de inflamación, regulación del metabolismo, homeostasis y la función cerebral (Edwards, 2005). Estas hormonas, al ser secretadas, se liberan en el torrente sanguíneo para actuar tanto en los tejidos diana periféricos como en el sistema nervioso central (Wilson, *et al.*, 1998). Las hormonas esteroideas sexuales también actúan como factores de transcripción dependientes de ligandos o de receptores de membrana que estimulan diferentes vías de transducción de señales, favoreciendo o silenciando la expresión de diferentes genes. (Scarpin, *et al.*, 2009).

Otra de las funciones específicas que tienen las hormonas esteroideas sexuales es su participación en la comunicación entre microorganismos y sus hospedadores, lo cual puede ser ventajoso para aquellos microorganismos que se consideran patógenos para sus hospederos, ya

que favorecen la expresión coordinada de diferentes factores de virulencia y gracias a ello, controlan el curso de una infección. Las hormonas sexuales alteran también la expresión y el comportamiento de los genes que influyen en la susceptibilidad y la resistencia a una infección afectando la inmunidad del huésped (Klein, 2000). Particularmente, los machos de todas las especies son más propensos a sufrir infecciones, lo cual podría estar asociado con una respuesta inmune menos eficiente que en las hembras.

2.8 Testosterona

Como se ha mencionado previamente, la testosterona es la principal hormona esteroidea producida por los machos de todas las especies de animales vertebrados, también forma parte del sistema hormonal de las hembras, aunque en ellas su concentración es hasta en un 80% menor, dependiendo de la especie (Ramírez-Paz-y-Puente *et al.*, manuscrito en preparación). Esta hormona juega un papel fundamental en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, principalmente, en la producción de espermatozoides, proceso que se lleva a cabo cuando un individuo entra en su etapa reproductiva. La mayoría de la testosterona en el organismo es producida en las células de Leydig, que se hallan en los testículos, sin embargo, también puede ser producida a partir de un precursor (Dihidrotestosterona) en las glándulas suprarrenales, aunque su síntesis por esta vía es reducida.

Existe una regulación retroalimentativa en la síntesis de testosterona, mediada por la Hormona Luteinizante o LH, que a su vez está regulada por retroalimentación por la FSH. La ruta de síntesis de la testosterona comienza con la regulación de la enzima 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa por acción de la LH (Figura 5). Asimismo, la testosterona es la principal molécula precursora de estradiol, ya que, por medio de enzimas presentes en el retículo endoplásmico rugoso, especialmente de tipo aromatasas, forman el anillo A de la molécula (proceso mediante el cual se generan tres dobles enlaces, creando un anillo bencénico), se elimina un grupo metilo en el C10 y el grupo ceto presente en el C3 se oxida para la formación de un grupo hidroxilo (Edwards, 2005).

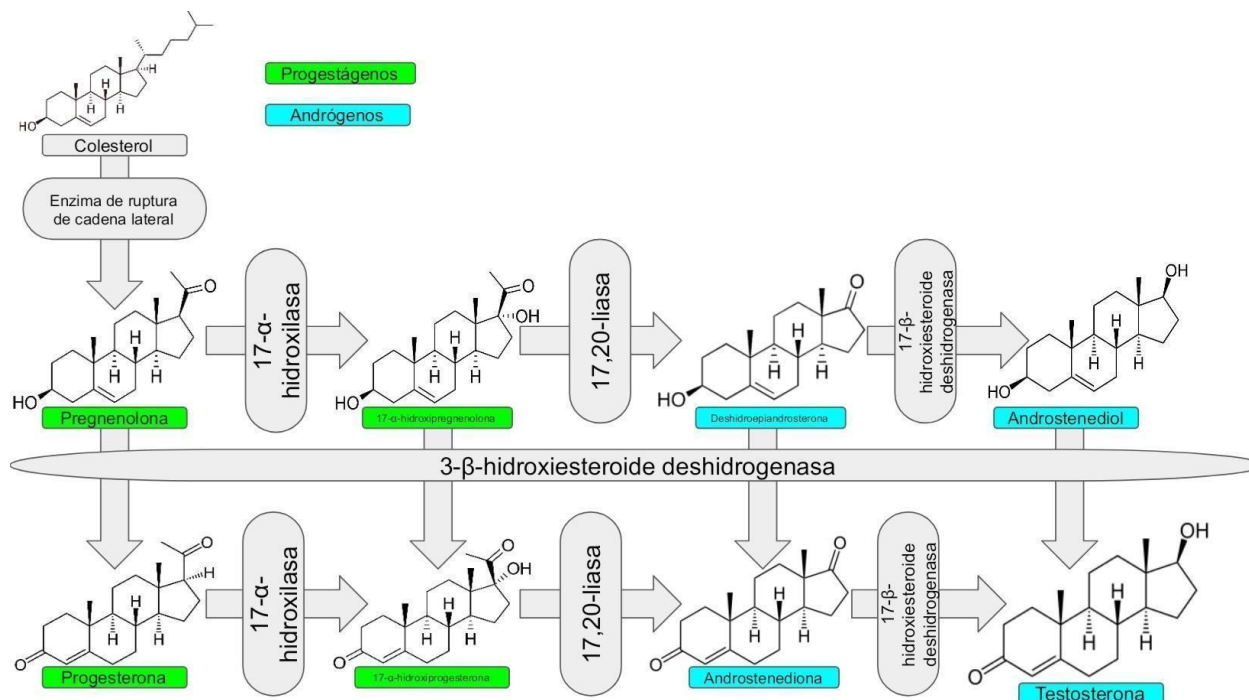


Figura 5. Ruta de biosíntesis de la testosterona (Tomado de Ramírez-Paz-y-Puente *et al.*, manuscrito en preparación).

Ahora bien, se sabe que, al llegar a la madurez sexual, los individuos del género masculino secretan grandes concentraciones de testosterona, niveles que se mantienen constantes durante toda la etapa reproductiva de los organismos y que comienzan a decrecer cuando éstos ingresan a una etapa de senectud. En 2020 Chen-Hsun y colaboradores, describieron el efecto que tiene la testosterona en diferentes cepas de *Escherichia coli*, suprimiendo la infección inicial en células epiteliales de próstata y epidídimo, sin embargo, aún no se conoce el mecanismo por el cual actúa esta hormona en el metabolismo e inhibición de la bacteria. Asimismo, es importante destacar que *A. seminis*, al habitar en el prepucio de ovinos, bovinos y caprinos, adquiere un carácter patógeno cuando llegan a su etapa reproductiva, momento en el cual las concentraciones hormonales se incrementan (especialmente de testosterona), y son detectadas por la bacteria como situaciones propicias para infectar y colonizar a su hospedero.

3. ANTECEDENTES

Al-Katib y Dennis, en 2007, 2008 y 2009, realizaron inoculaciones experimentales de *A. seminis* en carneros aleatoriamente seleccionados, donde investigaron y evaluaron los cambios patológicos secuenciales en el epidídimo y testículos inyectados intra-epididimalmente, y reconociendo diversas cepas de *A. seminis* por medio de técnicas PCR.

En 2014, Moustacas y colaboradores, determinaron los cambios clínicos y patológicos en carneros infectados experimentalmente con *A. seminis* y *Histophilus somni*, bacterias que son capaces de causar infección en carneros al colonizar múltiples órganos del tracto genitourinario, donde, además, inducen hallazgos clínicos macroscópicos o microscópicos indistinguibles entre las afecciones causadas por cada una de las bacterias utilizadas en la investigación.

En el año 2018, Negrete-Abascal y colaboradores realizaron la secuenciación genómica de la cepa *A. seminis* ATCC 15768, donde determinaron el tamaño del genoma presente en esta bacteria, de las cuales, 33 secuencias están relacionadas con profagos y 54 están relacionadas en la formación de RNA funcional. Además, se identificaron genes implicados en la resistencia a los metales pesados, resistencia a antimicrobianos, estrés oxidativo y que codifican a una supuesta proteína RTX.

En 2019, Montes-García y colaboradores, describieron la presencia de una proteína homóloga a GroEl, misma que participa en la aglutinación de eritrocitos en ovejas, proteína que también se encuentra presente en las biopelículas formadas por *A. seminis*. Así, llegaron a la conclusión de que esta proteína GroEL podría funcionar como una proteína de choque térmico y también participar en la adhesión y hemaglutinación.

En el 2020, Montes-García y colaboradores caracterizaron la formación de biopelícula de *A. seminis*, misma que se ve afectada negativamente por los iones de Fe y Ca, las concentraciones de oxígeno ambiental, así como por la temperatura y la composición del medio de cultivo; sin embargo, su producción podría conferir ventajas clave en la bacteria, permitiéndole persistir en los tejidos del huésped y, en condiciones adecuadas, causar enfermedad.

4. JUSTIFICACIÓN

Bajo este marco, resulta importante el conocimiento sobre los factores de virulencia, debido a que cuando se ignoran los mecanismos de adherencia, movilidad, secreción de proteasas, entre otros, entonces se desconoce la forma por la cual podemos combatir a las bacterias. Aunado a ello, la epididimitis, causada por *Actinobacillus seminis*, es considerada una enfermedad importante por sus efectos negativos sobre la fertilidad y esterilidad del rebaño, produciendo pérdidas económicas en la industria ovina. Y aunque se ha descrito que un cambio en las concentraciones hormonales en el hospedero podría favorecer el ascenso de *A. seminis* del prepucio al epidídimo, se desconoce el efecto que estas hormonas, y en especial la testosterona, ejercen en *A. seminis*, para poder lograr esto. Por ello, es necesario conocer los cambios inducidos en *A. seminis* por efecto de la testosterona para así conocer los factores de virulencia expresados por esta bacteria en presencia de dicha hormona para tener un panorama de los mecanismos involucrados en la patogénesis y poder combatir esta enfermedad.

5. HIPOTÉISIS

Si los niveles de testosterona se incrementan en borregos cuando éstos ingresan a su etapa reproductiva y *A. seminis* ingresa al organismo en este momento, entonces la testosterona podría jugar un papel importante en el avance de la bacteria y en la expresión de factores de virulencia de ésta.

6. OBJETIVOS

General

Determinar el efecto de la Testosterona en el crecimiento y la expresión de probables factores de virulencia de *Actinobacillus seminis*.

Particulares

- Determinar el efecto de la Testosterona sobre el crecimiento de *A. seminis*.
- Determinar los patrones de proteínas totales y secretadas por *A. seminis* en presencia de testosterona y su comparación con un control sin ella.
- Determinar los patrones de expresión de supuestas adhesinas por *A. seminis* en presencia de Testosterona.
- Determinar la presencia de proteínas amiloides en *A. seminis*.
- Determinar el efecto de la Testosterona en la formación y dispersión de biopelículas de *A. seminis*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Crecimiento bacteriano

Para el crecimiento bacteriano se utilizó caldo soya tripticaseina (TSB), donde se realizó un pre-cultivo de la cepa ATCC 15768 en un tubo de ensayo con 3 ml de TSB y se dejó creciendo en agitación (180 rpm) a 37°C durante 24 horas (Montes-García, *et al.*, 2020).

7.2 Cinética de crecimiento

Tubos de ensayo con 3 ml de TSB se inocularon con un precultivo de *A. seminis* (3%), posteriormente se adicionaron 1, 2, 3, 4 ó 5 ng/ml de testosterona. Los tubos se incubaron en agitación (180 rpm) a 37°C, y se obtuvieron las densidades ópticas a 600 nm cada hora. El ensayo culminó cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, la última lectura se recabó a las 24 horas de iniciado el procedimiento (Bautista-Betancourt, 2020).

7.3 Obtención de Proteínas

Las muestras de cultivos de *A. seminis* de 24 horas se centrifugaron a 10,500 rpm durante 25 minutos, la pastilla celular se suspendió en 1 ml de HEPES 20 mM pH 7.4 con lisozima (1 mg/ml), las suspensiones se incubaron a 37°C durante una hora en agitación, posteriormente se sonicaron durante 7 minutos (ciclo de 15 segundos de sonicación y 10 segundos de pausa) todo el tiempo en hielo. Después de la sonicación las muestras fueron centrifugadas a 13,400 rpm durante 2 minutos para descartar las células que no se pudieron romper, el sobrenadante se recuperó (extracto total) y las muestras fueron mantenidas en congelación hasta su uso.

Para la obtención de Proteínas Secretadas, los cultivos se centrifugaron durante 25 minutos a 10,500 rpm, se recuperaron los sobrenadantes libres de células y se precipitaron agregando un volumen de metanol. Se mantuvieron en congelación durante una hora, posteriormente se centrifugaron durante 20 minutos a 10,500 rpm. Las proteínas secretadas se recuperaron con PBS 1x y se mantuvieron en congelación hasta su uso (Bautista-Betancourt, 2020).

7.4 Obtención de proteínas de membrana externa (PME)

Para la obtención de PME, se repitió el procedimiento de obtención de Extractos Totales, a partir de cuyas muestras se recuperó el sobrenadante que contenía los restos de bacterias lisadas y se centrifugó a 13,400 rpm por 30 min. Las proteínas obtenidas por esta centrifugación se homogeneizaron en 200 µl de HEPES 20 mM y 200 µl de HEPES con Tritón-X100 2%. La muestra se incubó a 37°C por 30 min en agitación. Por último, se centrifugó a 13,400 rpm por 30 minutos, se conservó la pastilla obtenida que corresponde a la fracción enriquecida de proteínas de membrana externa, la cual se lavó dos veces agregando 200 µl de HEPES, homogeneizando y centrifugando a 13,400 rpm por 5 minutos, las proteínas obtenidas se mantuvieron en congelación a -20°C, hasta su utilización (Montes-García, *et al.*, 2019).

7.5 Obtención de probables Adhesinas

Los cultivos de 24 h se centrifugaron a 10,500 rpm durante 25 minutos, las pastillas obtenidas se resuspendieron con 500 µl de PBS 1x y Ácido tricloro acético al 3%, las suspensiones se incubaron a 37°C durante 30 minutos, se dejaron reposar por una hora y se centrifugaron a 6,000 rpm durante 10 minutos, posteriormente, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con PBS, después se sonicaron durante 7 minutos (ciclo de 15 segundos de sonicación y 10 segundos de pausa). Se centrifugaron las muestras a 13,400 rpm durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante y se llevó a congelación hasta su uso (Figueroa-Valenzuela, *et al.*, manuscrito en preparación).

7.6 Cuantificación de Proteínas.

Para la cuantificación de las proteínas, se agregaron 5µl de la muestra a evaluar en tubos eppendorf previamente lavados con metanol, se adicionaron 495µl de agua destilada y 500µl de reactivo de Bradford, se mezclaron las muestras y se leyeron en un espectrofotómetro modelo VS - 1201 a 595 nm (Bautista-Betancourt, 2020).

7.7 Electroforesis

Se realizó la separación electroforética de las muestras en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% cargando 10 µg/ml por cada carril. Al culminar la electroforesis los geles se tiñeron con azul de Coomassie, el exceso de colorante se eliminó usando una solución de ácido acético al 10% (López-Ochoa, *et al.*, 2017).

7.8 Western Blot

Una vez realizada la separación electroforética, se realizó una electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa; ésta se bloqueó con leche al 5% en PBS-Tween-20 al 0.5%. Tras lavar la membrana nuevamente con PBS-Tween-20, se adicionó como anticuerpo primario suero de borrego con epididimitis y se colocó en agitación durante dos horas, posteriormente, se recuperó el suero, se lavó la membrana y se adicionó como anticuerpo secundario suero α (anti) borrego y se dejó en agitación durante dos horas. Finalmente, se realizó un revelado químico de la membrana para su posterior análisis (Montes-García, *et al.*, 2018).

7.9 Far - Western Blot

Para el estudio más detallado y visualización de posibles adhesinas, una vez realizada la separación electroforética de dichas muestras, se realizaron electrotransferencias a membranas de nitrocelulosa; éstas se bloquearon con leche al 5% en PBS-Tween-20 al 0.5%. Tras lavar las membranas nuevamente con PBS-Tween-20, se adicionaron como moléculas primarias fibrinógeno o fibronectina marcados con biotina, respectivamente, y se colocaron en agitación durante dos horas, posteriormente, se recuperaron las proteínas, se lavaron las membranas y se adicionaron como proteína secundaria estreptavidina peroxidada. Se dejaron en agitación durante dos horas. Finalmente, se realizó un revelado químico de las membranas para su posterior análisis (Negrete-Abascal *et al.*, 1998, 1999).

7.10 Curva de calibración de Rojo Congo (RC)

Para determinar la capacidad de unir el colorante RC por *Actinobacillus seminis*, se preparó una solución stock de colorante RC (5 mg/ mL) en PBS. A partir de este stock se realizaron diluciones para tener concentraciones en el rango de 5 a 50 µg/mL, estableciéndose concentraciones de RC a intervalos de 5 µg/ mL. La absorbancia de cada dilución se determinó por triplicado a 480 nm. (Montes-García, 2015)

7.11 Unión de Rojo Congo

De un cultivo de 24 h a 37°C, se realizó una suspensión bacteriana ajustando a una densidad óptica de 1.0 (±0.2) a 600 nm. De esta suspensión se tomaron alícuotas de 1 ml, se centrifugaron a 13,400 rpm por 2 min, la pastilla se homogeneizó en 1 ml de PBS/RC (50 µg/ml) y se mantuvieron en agitación constante durante media hora, posteriormente se centrifugaron a 13,400 rpm durante 5 minutos y se recuperaron los sobrenadantes, midiendo su absorbancia a 480 nm, los valores se interpolaron en la gráfica de calibración a fin de determinar la cantidad de colorante restante, para cada concentración de testosterona se realizaron 10 repeticiones- (Montes-García, 2015).

7.12 Aislamiento de proteínas amiloides

Proteínas de membrana externa y las proteínas secretadas al medio se sometieron a un tratamiento selectivo, utilizando muestras de 200 µL a las cuales se les agregó el mismo volumen de ácido fórmico. Las mezclas se homogeneizaron y se incubaron en baño María a 95 °C durante 15 minutos, después se centrifugaron a 13,400 rpm durante 5 minutos. Las pastillas restantes se lavaron tres veces con acetona, resuspendiendo en 500 µL de acetona y centrifugando a las condiciones mencionadas anteriormente. Las muestras finalmente se homogeneizaron en Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM pH 7.5, y se mantuvieron en congelación hasta su uso (Negrete-Abascal *et al.*, 2011).

Asimismo, se realizó un inmuno reconocimiento de las proteínas obtenidas por medio de esta purificación, para la cual se utilizaron como anticuerpos primarios, sueros contra la proteína Curli de *E. coli*, donado por el Dr. Juan Xicotencatl (Hospital Infantil “Federico Gómez”), suero anti EF-Tu (López-Ochoa, *et al.*, 2017) y suero de borrego con epididimitis. Como anticuerpos secundarios se utilizaron suero anti-conejo (Sigma Aldrich) para el caso de los dos primeros sueros y anti borrego (Sigma Aldrich) para el caso del último anticuerpo primario.

7.13 Formación de Biopelícula

Para evaluar el efecto de las hormonas en la formación de biopelícula, se emplearon placas de poliestireno estériles con 96 pozos (Sarstedt, Barcelona, España), a los cuales se les adicionaron 180 µL de medio TSB y fueron inoculados con 20 µL de cultivo previamente ajustado a una densidad óptica de 1.0 a 600 nm. Medios sin inóculo fueron usados como controles negativos.

Para determinar el efecto de la testosterona, ésta se agregó en concentraciones de 1, 2, 3, 4 ó 5 ng/ml. Por cada tratamiento se hicieron pruebas por quintuplicado. La placa fue incubada durante 48 h a 37°C.

Después de la incubación, el medio fue retirado de los pozos, las células se fijaron con 200 µL de metanol por 15 min. Los pozos se dejaron secar para que se evaporara el metanol y se tiñó cada pozo con 150 µL de cristal violeta Hucker's al 1% por 15 minutos. Se retiró el colorante y la placa fue lavada con agua corriente para retirar los excesos de colorante. Posteriormente se agregaron 150 µL de ácido acético glacial al 30%, se dejó incubar la caja con esta solución por 30 min en agitación constante para recuperar el colorante absorbido por las células teñidas.

Por último, en una caja nueva de microtitulación, los pozos se llenaron con 160 µL de ácido acético al 30% y 40 µL del contenido de la caja anterior. La densidad óptica fue medida en un lector de placas microplacas modelo PKL a 630 nm. Cada ensayo se realizó por quintuplicado, los resultados se promediaron y se graficaron (Montes-García, *et al.*, 2020).

7.14 Dispersión de Biopelícula

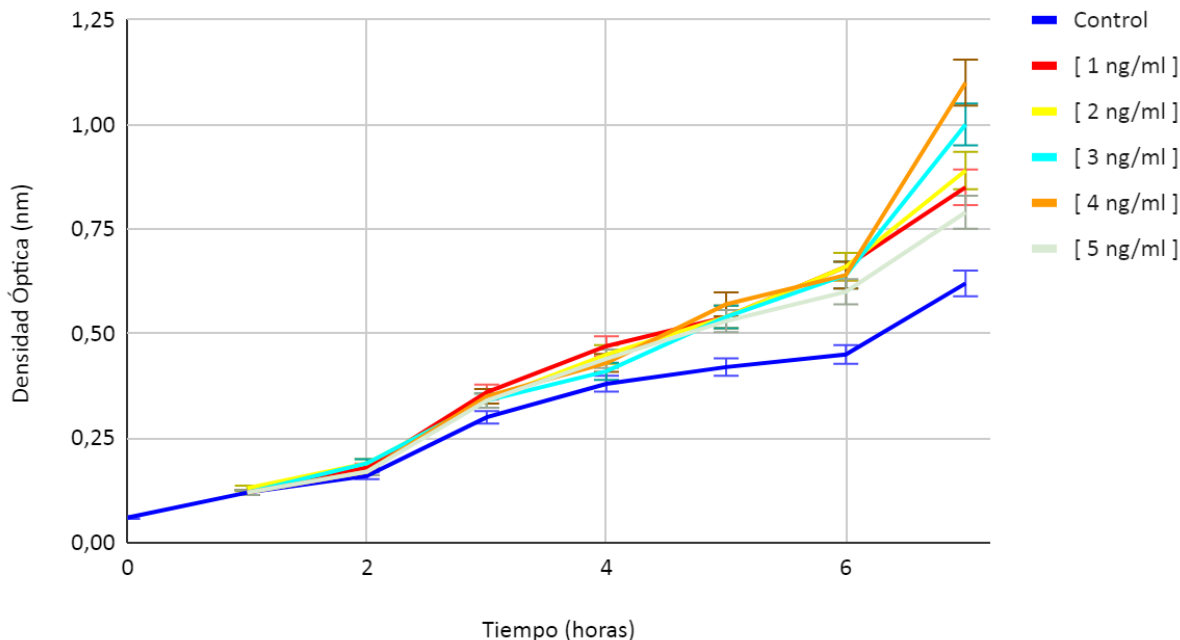
Con el objetivo de determinar si la hormona tenía un efecto dispersor sobre una biopelícula ya formada, se indujo la formación de la biopelícula a las mismas condiciones como fue descrito previamente; como control negativo se utilizó medio sin células. La caja se incubó por 24 h a 37° C, una vez formada la biopelícula, el medio de cultivo fue retirado y sustituido por una solución de agua estéril con las concentraciones previamente mencionadas de Testosterona dentro del campo estéril para evitar contaminación. Nuevamente la caja se incubó por 30 minutos a 37° C; el procesamiento de la caja y la lectura se realizaron de igual forma que el procedimiento anterior (Bautista-Betancourt, *et al.*, 2020).

8. RESULTADOS

8.1 Cinética de Crecimiento

Los resultados que se obtuvieron con esta investigación nos permiten observar que, al agregar testosterona en el medio, el crecimiento de la cepa se ve favorecido hasta en un 100% con respecto al Control (Gráfica 1).

Cinética de Crecimiento con Testosterona



Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *Actinobacillus seminis*, sin adiciones (Control) o con Testosterona (1, 2, 3, 4 ó 5 ng/ml).

8.2 Obtención de Proteínas

Respecto al patrón de proteínas de extractos totales que se obtuvieron, los datos nos indican una disminución de la concentración en una banda de 25 KDa (aproximadamente) y un incremento en una banda de aproximadamente 14 KDa. De igual manera, se puede observar una desaparición proteica con respecto al Control en una banda de aproximadamente 23 KDa. También se observa la aparición de una banda de aproximadamente 27 KD, presente en todas las concentraciones de hormona (Figura 6).

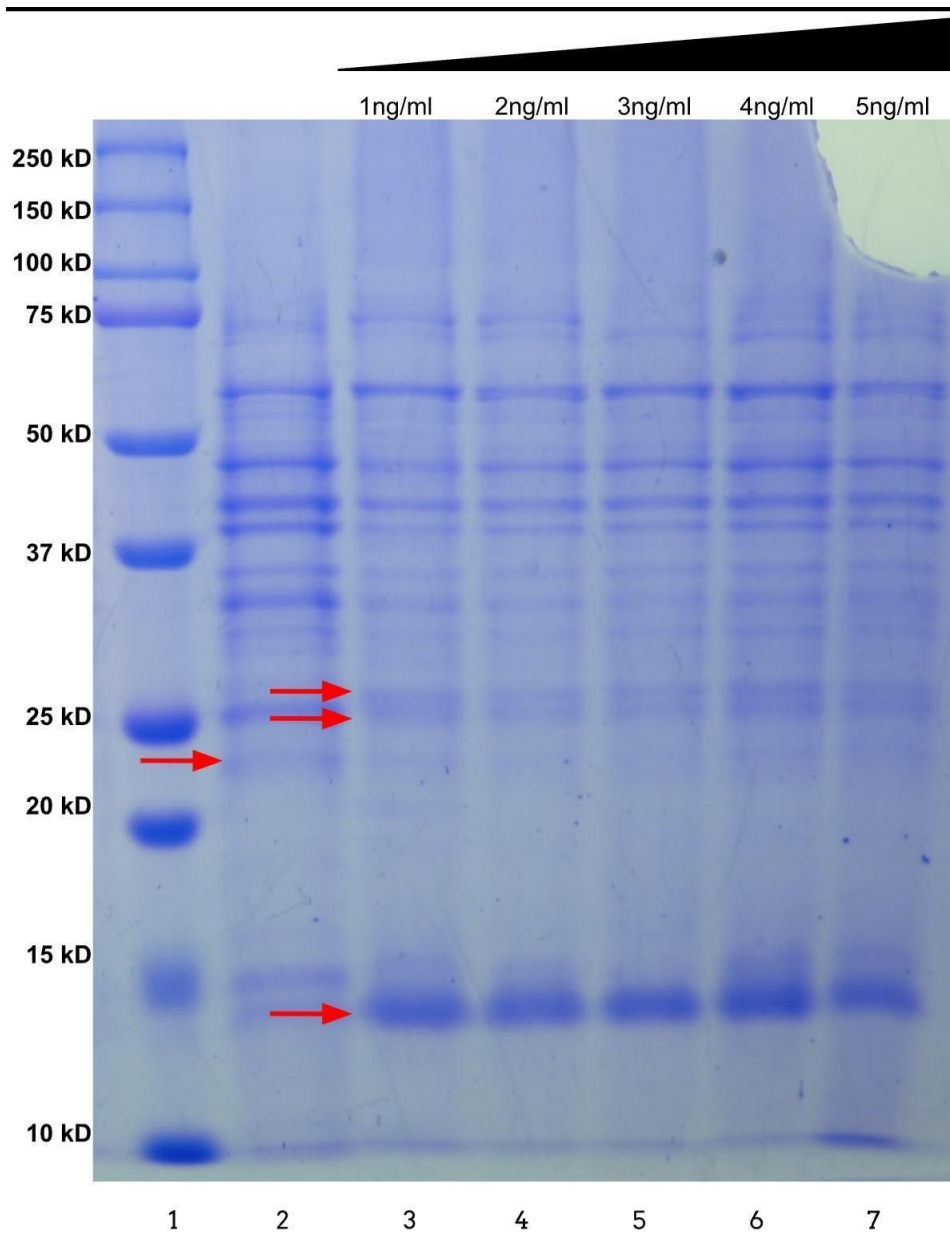


Figura 6. Patrón de proteínas totales de *A. seminis* en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%. (1) MPM, (2) muestra Control, (3) con 1 ng/ml, (4) 2 ng/ml, (5) 3 ng/ml, (6) 4 ng/ml y (7) 5 ng/ml de Testosterona. (-->) Indica las bandas señaladas en el texto

8.3 Obtención de probables Adhesinas

En lo que respecta a las probables adhesinas expresadas en *A. seminis* por la presencia de la Testosterona, se observa un incremento en la concentración de una proteína de aproximadamente 39 KDa y en una banda de aproximadamente 25 KDa, de esta última banda, se observa incremento de su concentración a 1 ng/ml pero está ausente a concentraciones mayores (Figura 7).

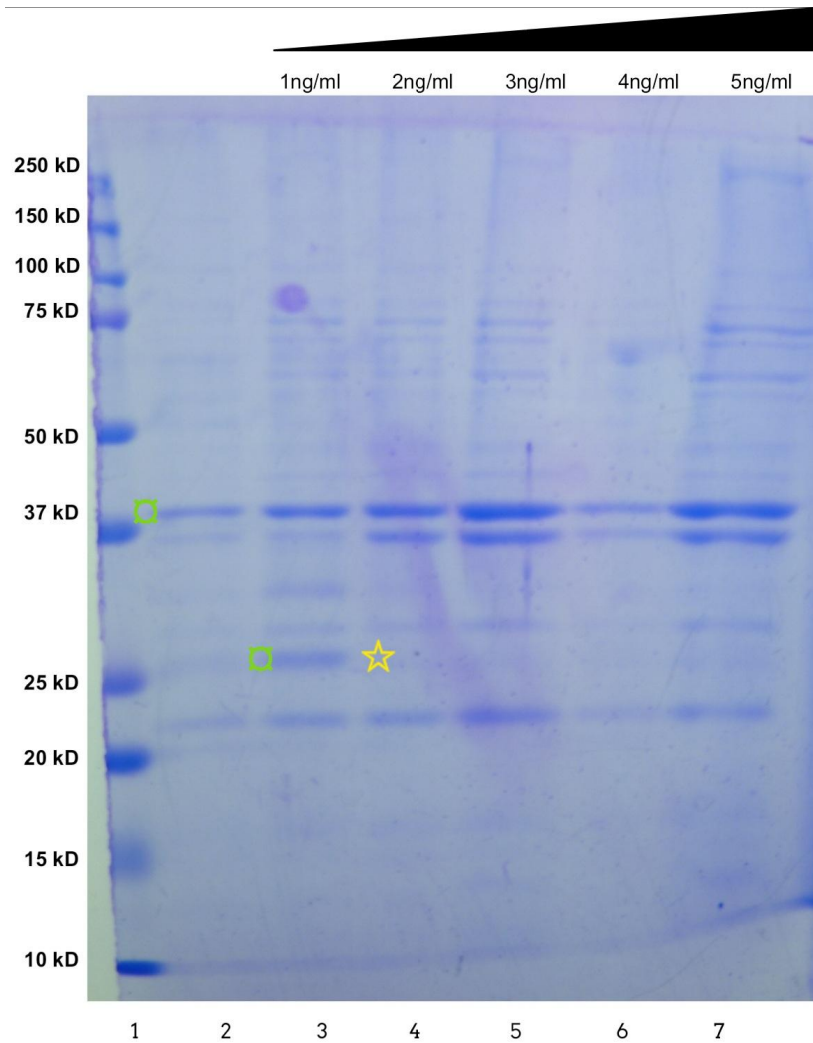


Figura 7. Patrón de probables adhesinas de *A. seminis* en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%. (1) MPM, (2) muestra Control, (3) 1 ng/ml, (4) 2 ng/ml, (5) 3 ng/ml, (6) 4 ng/ml y (7) 5 ng/ml de Testosterona. (◻) Incremento en la concentración, (☆) desaparición de bandas.

Usando la técnica Western Blot se aprecia el reconocimiento inmune, por el suero de borrego con epididimitis, de una proteína de 25 KDa pero únicamente en las muestras que provienen de cultivos con testosterona. Esto mismo ocurre en una banda de aprox 42 KDa. Con respecto a una banda de 50 KDa, el reconocimiento disminuye o desaparece en muestras con testosterona de 1 a 3 ng/ml, pero se incrementa a concentraciones de 4 y 5 ng/ml (Figura 8).

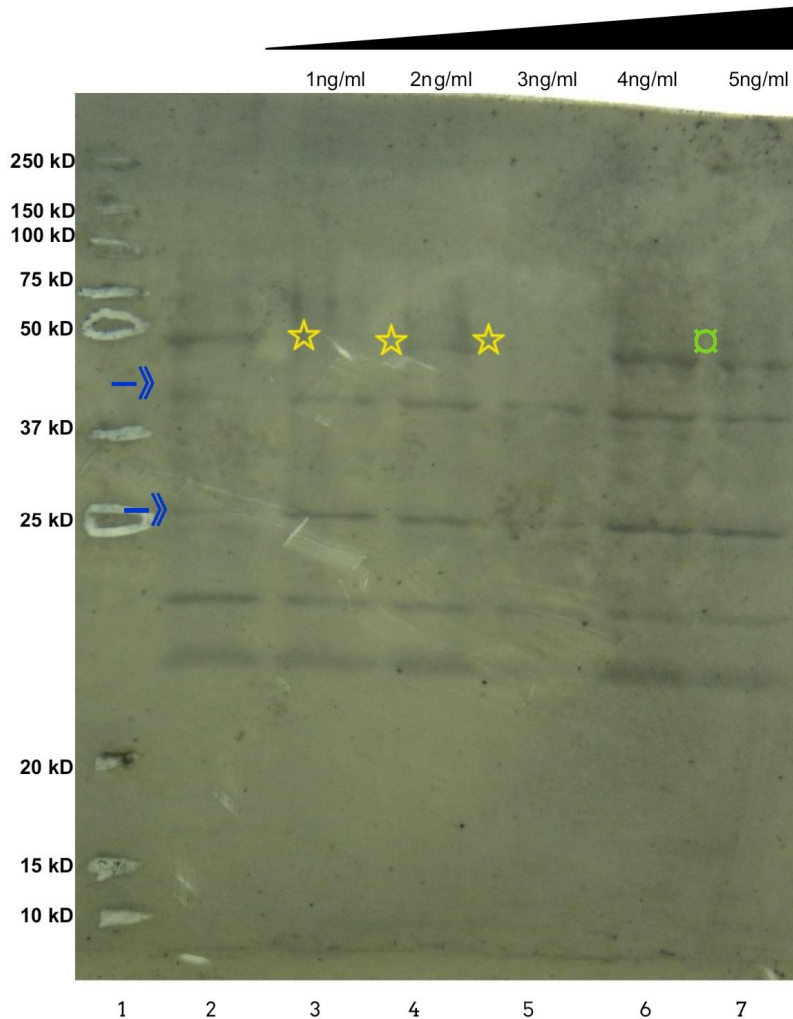


Figura 8. Inmuno reconocimiento de probables adhesinas de *A. seminis* por el suero de borrego con epididimitis. (1) MPM, (2) muestra Control, (3) 1 ng/ml, (4) 2 ng/ml, (5) 3 ng/ml, (6) 4 ng/ml y (7) 5 ng/ml de Testosterona. (◻) incremento en la concentración, (☆) desaparición de bandas, (—>>) ausencia de bandas.

8.4 Far - Western Blot

Con respecto a la interacción entre las probables adhesinas y fibrinógeno, se encontró una interacción a aproximadamente 22, 27, 40 48, 50 y 65 KDa (Figura 9). Mientras que, en la interacción con fibronectina, ésta se observa en bandas de aproximadamente 27, 40, 50 y 55 KDa, bandas que en presencia de testosterona tuvieron una reacción más intensa (Figura 10).

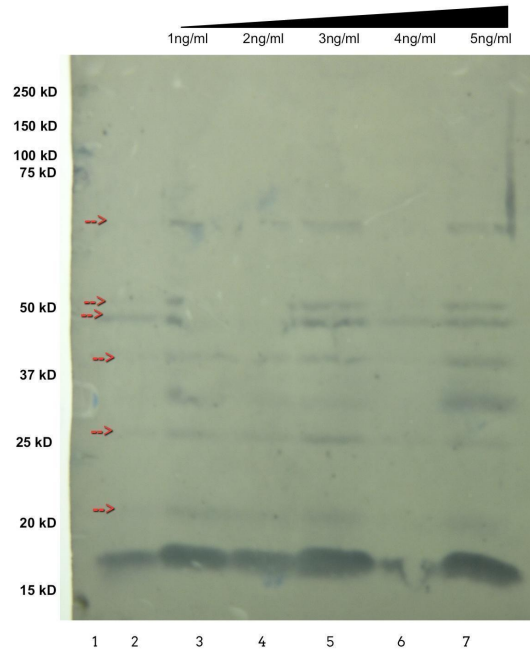


Figura 9. Far-Western Blot de probables adhesinas con fibrinógeno ovino biotinilado. (1) MPM, (2) muestra Control, (3) 1 ng/ml, (4) 2 ng/ml, (5) 3 ng/ml, (6) 4 ng/ml y (7) 5 ng/ml de Testosterona.

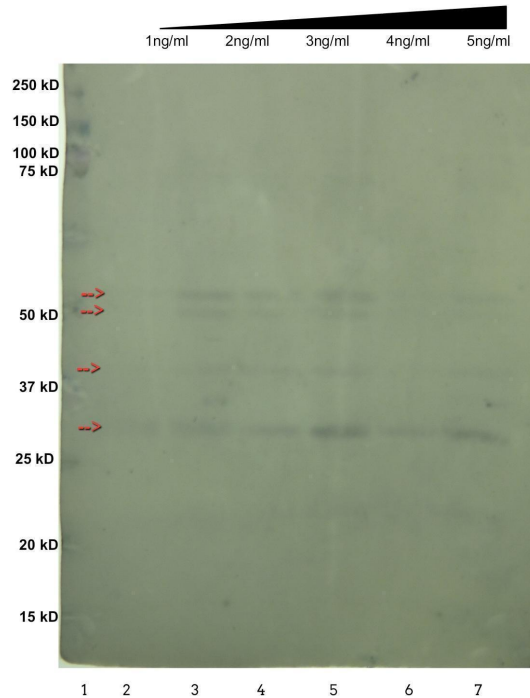


Figura 10. Far-Western Blot de probables adhesinas con fibronectina de bovino biotinilada. (1) MPM, (2) muestra Control, (3) 1 ng/ml, (4) 2 ng/ml, (5) 3 ng/ml, (6) 4 ng/ml y (7) 5 ng/ml de Testosterona.

8.5 Obtención de proteínas amiloides

Una de las principales propiedades de las proteínas amiloides es su capacidad de teñirse con colorante RC. Para demostrar la existencia de proteínas de este tipo en *A. seminis*, la cepa fue cultivada en presencia de este colorante (Figura 11). Por lo que, una vez que se demostró la unión de RC por *A. seminis*, se procedió a obtener proteínas de membrana externa, así como a concentrar las proteínas secretadas al medio, encontrándose que el colorante se une a una proteína de aproximadamente 37 KDa, aún después de ser separada electroforéticamente principalmente en las muestras de membrana externa (Figura 13, carriles 1 y 2) aunque en escasa cantidad en las de proteínas secretadas (Figura 13, carriles 3 y 4).

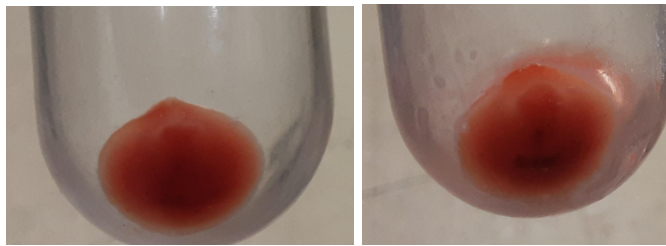


Figura 11. Pastilla bacteriana de *A. seminis* crecida en caldo TSB y adicionada con RC en presencia de testosterona. Izquierda: Control. Derecha: 3 ng/ml de hormona.



Figura 12. Proteínas secretadas al medio por *A. seminis* en presencia de RC y testosterona (izquierda, 3 ng/ml), precipitadas con metanol.

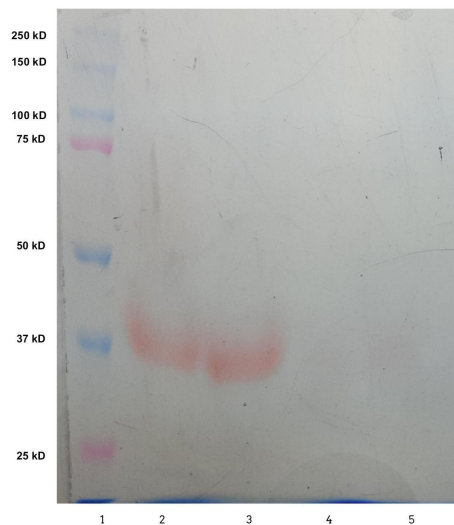


Figura 13. Gel SDS-PAGE 10%, sin pintar con azul de Coomassie en el que se observa la separación de bandas de aproximadamente 37 KDa, teñidas con RC, provenientes de proteínas de membrana externa (carriles 2 y 3) de *A. seminis* y las proteínas concentradas del sobrenadante (carriles 4 y 5).

Posteriormente se procedió a teñir el gel con Azul de Coomassie para observar el patrón de proteínas totales (Figura 14), donde se confirma la presencia de una proteína de alrededor de 37 KDa.

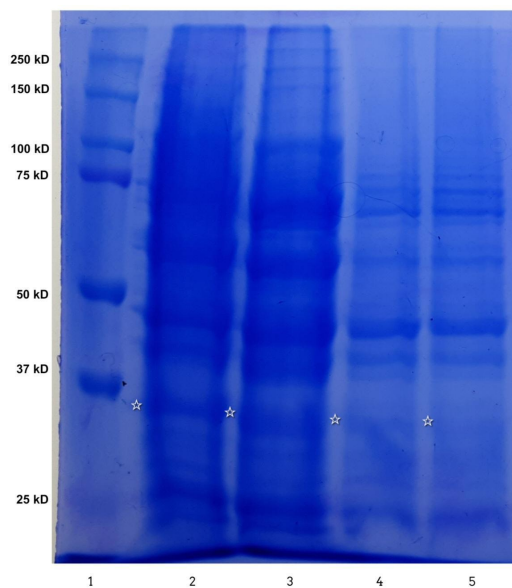


Figura 14. Gel SDS-PAGE 10%, teñido con azul de Coomassie en el que se observa la presencia de bandas de aproximadamente 37 KDa (☆), provenientes de proteínas de membrana externa (carriles 2 y 3) de *A. seminis* y las proteínas concentradas del sobrenadante (carriles 4 y 5).

8.6 Purificación de Proteínas Amiloides

Una vez identificada la banda correspondiente a una probable proteína amiloide, ésta se separó hirviendo las muestras obtenidas de proteínas de membrana externa y proteínas secretadas al medio en presencia de ácido fórmico. Estas muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% y teñidas con Azul de Coomassie, observándose bandas de aproximadamente 48, 37 y 30 KDa (Figura 15).

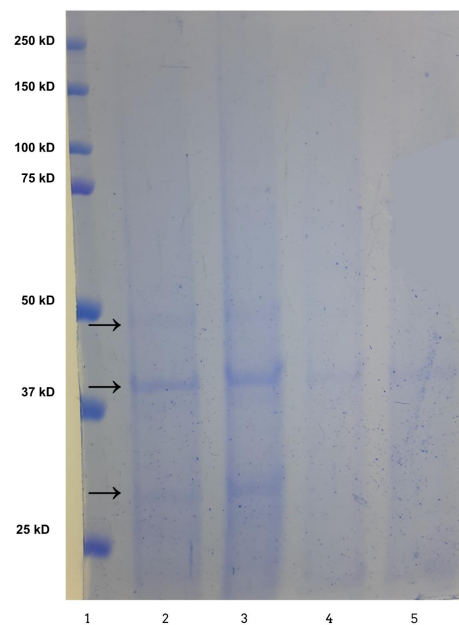


Figura 15. Gel SDS-PAGE 10% de proteínas amiloides, teñido con azul de Coomassie en el que se observan bandas de 48, 37 y 30 KDa (-->), proveniente de proteínas de membrana externa (carriles 2 y 3) y proteínas secretadas (carriles 4 y 5) a concentraciones de 4 y 5 ng/ml de testosterona, respectivamente.

8.7 Inmuno reconocimiento de probable Proteína Amiloide

Para determinar la capacidad inmunogénica de las proteínas amiloides, se realizaron Western Blot, utilizando diferentes antisueros. Los resultados obtenidos con estos inmuno reconocimientos nos muestran que en presencia de suero contra EF-Tu existe un reconocimiento de bandas a un peso molecular aproximado de 45, 37 y 30 KDa (Figura 16). Sin embargo, en presencia de suero contra la proteína Curli y suero de borrego con epididimitis no se encontró reconocimiento alguno con las proteínas obtenidas o fue muy tenue la reacción.

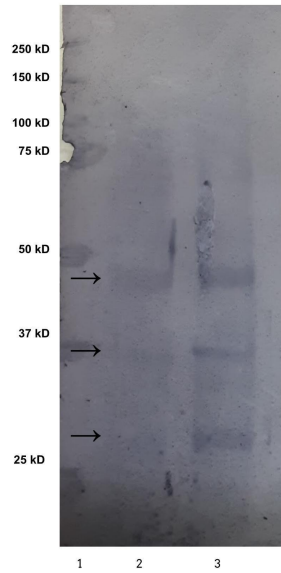


Figura 16. Inmuno reconocimiento de proteínas amiloides con anti - EF-Tu. (1) MPM, (2) proteínas amiloides de cultivo de *A. seminis* con 4 ng/ml de testosterona o (3) 5 ng/ml de hormona.

8.8 Cuantificación de la capacidad de unión de Rojo Congo

Teniendo evidencia de que *A. seminis* expresa una proteína amiloide, se procedió a determinar la cantidad de colorante RC que podía unirse a dicha proteína, extrapolando los datos obtenidos en la curva de calibración de RC, midiendo el remanente de colorante (aquellos que no habían sido unidos por la proteína amiloide). La capacidad de unir RC por parte de *A. seminis* se muestra en el Gráfico 2.

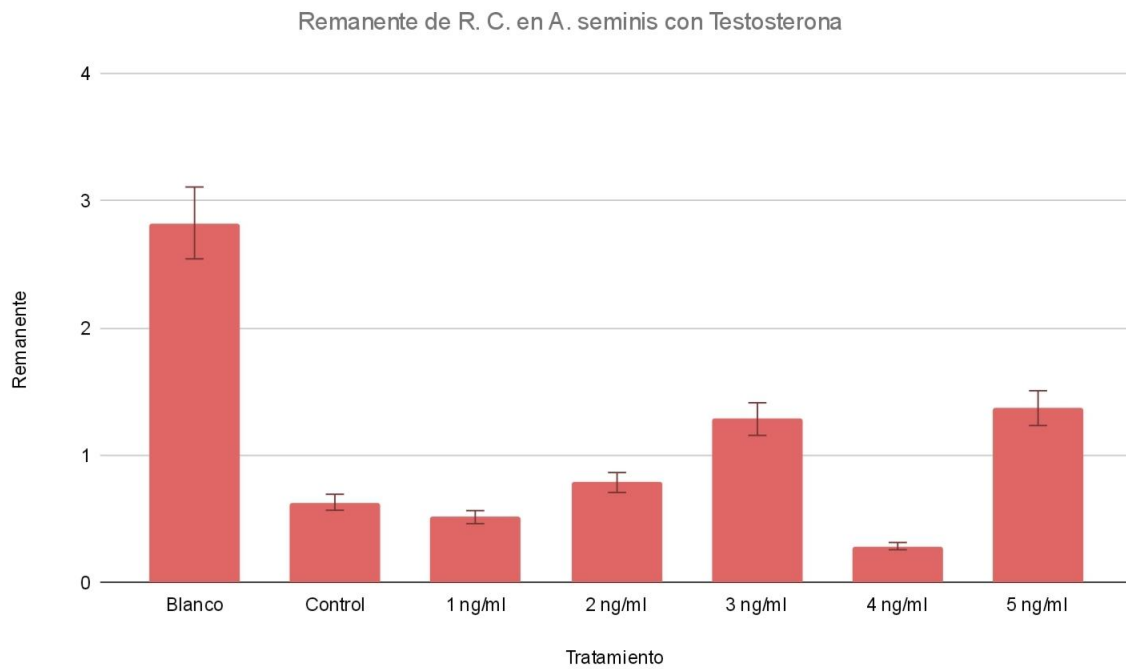


Gráfico 2. Cuantificación de RC en solución después de incubar *A. seminis* crecida en presencia de diferentes concentraciones de testosterona.

8.7 Formación de biopelícula

La cantidad de biopelícula formada fue muy similar entre las bacterias crecidas en presencia de las diferentes concentraciones de testosterona y aquellas que carecían de dicha hormona, sin embargo, la cantidad de biopelícula formada en presencia de 1 ng/ml de testosterona fue ligeramente mayor con una densidad óptica de 2.61 con respecto al control (2.38) (Gráfico 3).

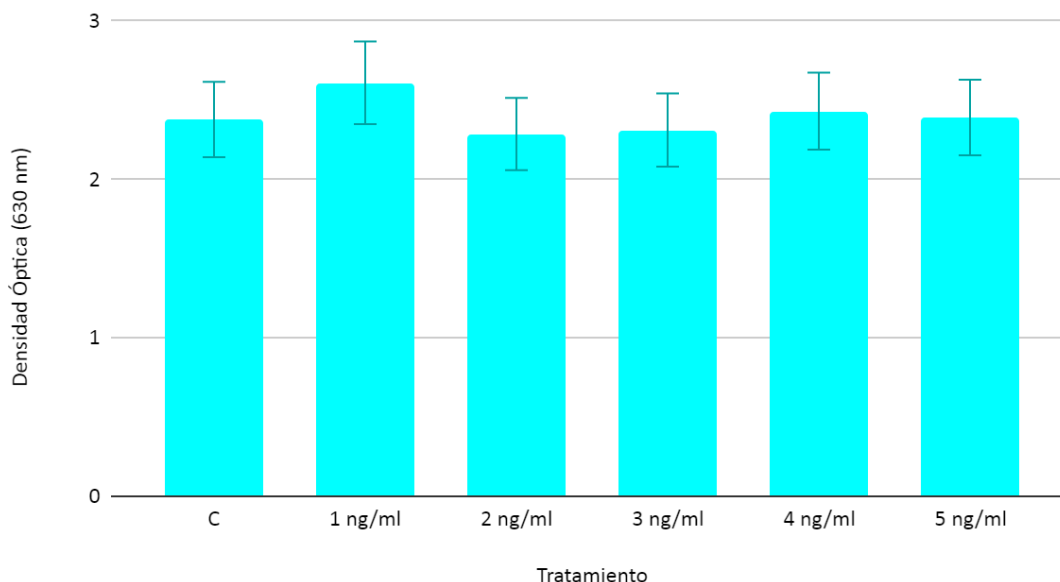
Formación de biopelículas en *A. seminis* con testosterona

Gráfico 3. Formación de biopelícula de *A. seminis* en presencia o no de testosterona a 37 °C en medio TSB.

8.8 Dispersión de Biopelícula

Una biopelícula ya formada fue incubada con diferentes concentraciones de testosterona (1 a 5 ng/ml) con el fin de determinar si esta hormona induce una dispersión de la misma, sin embargo, se encontró que a una concentración de 2 ng/ml de testosterona se observó un incremento considerable en la biopelícula (3.96 nm) mientras que a una concentración de 5 ng/ml se observó una cantidad ligeramente menor de biopelícula (1.88 nm), sin embargo, no se aprecia una diferencia significativa entre el control (2.33 nm) y el resto de las diferentes concentraciones de hormona evaluadas (Gráfico 4).

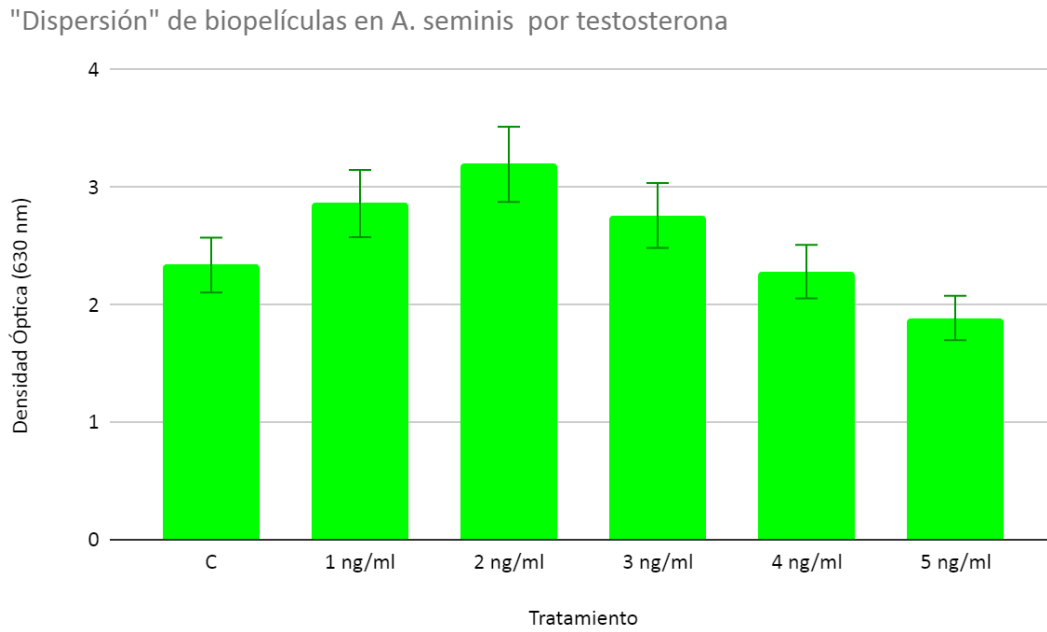


Gráfico 4. Cuantificación de la biopelícula formada por *A. seminis* en presencia de testosterona a 37 °C en medio TSB.

9. DISCUSIÓN

Actinobacillus seminis al ser un microorganismo presente en la microbiota prepucial de carneros y borregos, requiere de mecanismos específicos para la infección de su huésped (Acosta *et. al.*, 2006). Diversos reportes indican que cuando los ovinos o caprinos alcanzan su madurez sexual, son más susceptibles de sufrir epididimitis causada por *A. seminis*, debido a que esta bacteria puede detectar los cambios hormonales relacionados con esta madurez. Sin embargo, a la fecha, no existen reportes que indiquen los posibles cambios en *A. seminis* que le pudiesen conferir esta capacidad patogénica. En 2020, Carbajar-Serna y colaboradores reportaron que en borregos sanos entrantes a la madurez sexual se presentaba una concentración de 6 ng/ml de Testosterona en el plasma seminal, por ello, es que se decidió trabajar con concentraciones muy similares a las presentes en condiciones fisiológicas para obtener datos que reflejaran una aproximación a lo que ocurre con los organismos que son afectados por *A. seminis*.

A través de cinéticas de crecimiento se pudo observar que la testosterona favorece el crecimiento de *A. seminis* hasta en un 50% con respecto a la muestra control, con lo cual se podría ver beneficiado al infectar a borregos y carneros que han alcanzado la madurez sexual, teniendo un flujo de ingreso anti sentido hasta su llegada al epidídimo y causando inflamación de éste e incluso la infertilidad del organismo. El alojamiento de *A. seminis* en el tracto urinario del borrego se podría ver favorecido por la presencia y expresión de adhesinas, mismas que utilizarían para adherirse a las células blanco, con mecanismos similares a los expuestos por Montes-García y colaboradores en 2018, quienes identificaron dos proteínas de *A. seminis* que participan en la adhesión a células de una línea celular de cáncer de vejiga, lo que sugiere que *A. seminis* podría colonizar el tracto urinario de éstos hospederos, tal y como lo plantean Acosta y colaboradores en un estudio realizado en 2006, quienes inocularon intra-uretralmente a borregos con esta bacteria, encontrando daños en riñones, vesícula seminal, cordones deferentes y epidídimo, sugiriendo una infección progresiva que tiene como órgano blanco final el epidídimo. Asimismo, en 2007, Al-Katib y colaboradores, inocularon carneros machos jóvenes en epidídimo, uretra, conducto deferente izquierdo, músculo glúteo izquierdo, oral, nasal e intravenosamente, encontrando que al inocular epidídimo, conductos deferentes y uretra además de inoculaciones de manera oral e intravenosamente, generaban una progresión e infección de los carneros por *A. seminis* después de 9 a 44 días después de la inoculación, donde el epidídimo de éstos carneros mostraba diferentes grados de infección por la bacteria. La expresión de las adhesinas descritas por Montes-García y colaboradores y las descritas aquí, podrían participar en la colonización de estos tejidos y en la patogénesis de *A. seminis*.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede deducir que la testosterona participa en la regulación genética de *A. seminis* debido a que se aprecian cambios en los patrones de proteínas, en particular, a las bandas de 25 y 50 KDa (Figura 6; Figura 7, carriles 3 a 7), mismas que podrían tener un importante efecto dentro de la patogénesis de este microorganismo.

El inmuno reconocimiento obtenido usando suero de animales infectados con *A. seminis* nos indica que las proteínas expresadas en presencia de testosterona, también se expresan *in vivo*, y son inmunogénicas. Con lo referente a las probables adhesinas, al tener unión con moléculas como el fibrinógeno y la fibronectina, nos sugiere que se trata de moléculas de adhesión, sin embargo, aún falta corroborar su participación a través de ensayos de adhesión en cultivos celulares y su inhibición o disminución en la adhesión, con el uso de anticuerpos específicos o con el uso de otras moléculas tales como carbohidratos. Además, su identificación por espectrometría de masas nos indicará si se trata de adhesinas o de proteínas con más de una función, tal y como se describió previamente por Montes-García y colaboradores (2018), quienes describieron una fosfoglicerato mutasa (25 KDa) y el Factor de Elongación Tu.

En el presente estudio se muestran los resultados preliminares en la expresión de posibles proteínas amiloides (PA) de aproximadamente 48, 37 y 30 KDa presentes en *A. seminis* en presencia o no de testosterona, esto aproximadamente a 37 KDa. Las PA son proteínas que suelen asociarse con diferentes colorantes como el Rojo Congo o la tioflavina, ejemplo de ello, es la proteína Curli, expresada por *Escherichia coli* o *Salmonella spp* (Chapman *et. al.*, 2002), por medio de la cual estos microorganismos establecen interacciones inter bacterianas. Asimismo, las fibras curli tienen capacidad adherente e interaccionan con moléculas del hospedero como laminina, fibronectina, plasminógeno y el Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I (MHC I). Esta habilidad sugiere que las fibras curli participan en la mediación de la invasividad de estas bacterias a través de una mayor adhesión hacia células del hospedero, además de que promueven la evasión del sistema inmune al tener la capacidad de recubrirse con fibronectina; también es probable que esta capacidad de interaccionar con moléculas de la matriz extracelular del hospedero facilite el establecimiento del biofilm (Gophna *et al.*, 2002).

De esta manera, la capacidad de unir el colorante Rojo Congo por *A. seminis* nos sugirió la posibilidad de expresión de proteínas amiloides por esta bacteria. En 2014, Montes-García identificó una proteína amiloide-like expresada por *Mannheimia haemolytica* a un peso molecular aproximado de 50 KDa identificada como OmpP2-like, mientras que en 2017 López-Ochoa y colaboradores describieron en *Gallibacterium anatis* una proteína amiloide-like de aproximadamente 37 KDa del tipo EF-Tu, resultado muy similar al encontrado en esta investigación, ya que el corrimiento electroforético de muestras de proteínas de membrana externa o proteínas secretadas de bacterias crecidas en presencia de RC, nos confirmó esta posibilidad (Figura 13) con una banda de aproximadamente 37 KDa observada geles sin teñir, lo que sugiere la posibilidad de proteínas semejantes entre los diferentes miembros de la familia Pasteurellaceae, sin excluir su íntima relación con la proteína curli de *E. coli*.

Cuando se realizó la cuantificación de unión de RC por *A. seminis* (Gráfico 2), se observó que a concentraciones de 3 y 5 ng/ml de testosterona, existía un incremento en estas lecturas, pero una disminución considerable a una concentración de 4 ng/ml de hormona. Se desconoce el motivo por el cual se aprecian estos cambios en las lecturas de RC cuando *A. seminis* crece en presencia de dichas concentraciones de hormona. Se esperaba que, si las hormonas cambiaban la cantidad de PA expresada, variara la cantidad de RC unido, a mayor concentración de PA, mayor unión de RC, y menos cantidad en el sobrenadante, sin embargo, como se ha mencionado, a concentraciones de 3 y 5 ng/ml de hormona se observaron cantidades mayores a las determinadas en la muestra control (Gráfico 2). Estos incrementos parecen no deberse a la presencia de hormonas o a componentes secretados por la bacteria. De esta manera, podemos inferir en que las PA expresadas por *A. seminis* podrían favorecer la virulencia de este microorganismo aumentando la adhesión hacia células del hospedero.

Se sabe que la capacidad de producir una biopelícula les permite a las bacterias permanecer en el hospedero con mayor facilidad, evitándoles así daños causados por diferentes tipos de estrés (pH, temperatura, oxidación, nutricional, entre otros), resistencia a antibióticos y depredación. Asimismo, es sabido que la testosterona tiene un alto impacto e importancia en los diferentes procesos de infección, favoreciendo la expresión de diversos factores de virulencia en múltiples cepas de diferentes microorganismos. En *A. seminis* previamente hemos mostrado que cuando se crece esta bacteria en presencia de testosterona, se induce la expresión de proteínas que podrían fungir como probables adhesinas debido a su capacidad de interactuar con fibrinógeno biotinilado.

Se ha descrito para diversos microorganismos que la presencia de hormonas sexuales o del estrés inducen cambios en la cantidad de biopelícula formada (von Stein *et al.*, 2021). Por ello, se quiso saber si la testosterona inducía cambios en la cantidad de biopelícula formada o si estas hormonas inducían una probable dispersión de éstas. Por lo que, al realizar los diferentes ensayos, se observó que la cantidad de biopelícula no es afectada por las diferentes concentraciones de testosterona evaluadas, excepto por 1 ng/ml, en que se incrementa ligeramente; y aunque se aprecia una menor cantidad de biopelícula ya formada al incubarla con 5 ng/ml de testosterona (Gráfico 4), esta diferencia no es significativa. Por lo que se puede concluir que la testosterona no induce la dispersión de biopelículas, pero el incremento en las concentraciones de testosterona podría influir en la colonización, más no en la capacidad de formar biopelículas.

10. CONCLUSIONES

- La testosterona favorece el crecimiento de *Actinobacillus seminis* cepa ATCC 15768.
- La testosterona favorece la expresión proteica y de probables adhesinas a concentraciones fisiológicas
- En presencia de testosterona, se induce una mayor expresión de posibles proteínas amiloides de 48, 37 y 30 KDa en *A. seminis*.
- La testosterona no participa activamente en la formación de biopelículas de *A. seminis*, ni tampoco en su dispersión.

11. PERSPECTIVAS

- Identificar y caracterizar la proteína amiloide expresada por *A. seminis* en presencia de testosterona.
- Identificar alguna de las proteínas secretadas al medio y probables adhesinas expresadas en la biopelícula de *A. seminis* en presencia de testosterona y continuar con su caracterización.

12. REFERENCIAS

- Acosta, D. J. P. y Tórtora P. J. L. 2002. Epididimitis en ovinos. Acontecer Ovino-Caprino. 15:36- 40.
- Acosta, J.; Díaz, E.; Arellano, B.; Tenorio, V. R. y Tórtora, J. 2006 Experimental induction of epididymitis in sheep, by intra-urethral inoculation of *Actinobacillus seminis*: A bacteriological, serological, and histopathological study. OVINOS Técnica Pecuaria en México; 44(2):257-267.
- Al - Katib, W. A. y Dennis, S. M. 2007. Early sequential findings in the genitalia of rams experimentally infected with *Actinobacillus seminis*. New Zealand Veterinary Journal. 56:2, 50-54.
- Al - Katib, W. A. y Dennis, S. M. 2008. Pathological changes in accessory sex organs of rams following experimental infection with *Actinobacillus seminis*. New Zealand Veterinary Journal. 56:6, 319-325.
- Al - Katib, W. A. y Dennis, S. M. 2009. Ovine genital actinobacillosis: A review. New Zealand Veterinary Journal, 57:6, 352-358.
- Appuhamy, S.; Coote, J. G.; Low, J. C. y Parton, R. 1998. PCR methods for rapid identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strains. Journal of Clinical Microbiology. 36, 3: 814–817.
- Barnhart, M. M. y Chapman, M. R. 2006. Curli biogenesis and function. Annual Review of Microbiology. 60, 131–147.
- Bulgin, M. S.; Bruss, M. L. y Anderson, B. C. 1990. Methods for control of lamb epididymitis in large purebred flocks. Journal American Veterinary Medical Association 196:1110-1115.
- Carvajal-Serna, M.; Fatnassi, M.; Torres-Ruda, F.; Cardozo, J. A.; Grajales-Lombana, H.; Hammadi, M.; Abecia, J.A.; Muiño-Blanco, T.; Pérez-Pe, R.; Cebrián-Pérez, J. Á. y Casao, A. 2020. Vasectomy and photoperiodic regimen modify the protein profile, hormonal content and antioxidant enzymes activity of ram seminal plasma. International Journal of Molecular Sciences. 21, 536-549.
- Casadevall, A. y Pirofski L. A. 1999. Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity Division of Infectious Diseases. Infection and immunity. 67 (8): 3703–3713.
- Cebra, C. y Cebra, M. 2012. Diseases of the hematologic, immunologic, and lymphatic systems (Multisystem Diseases). EN: Pugh D. y Baird N. Sheep and Goat Medicine. Saunders. 466-502 pp.
- Chapman, M. R.; Robinson, L. S.; Pinkner, J. S.; Roth, R.; Heuser, J.; Hammar, M.; Normark, S. y Hultgren, S. J. 2002. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation, Science 295, 851–855.
- Chen-Hsun Ho, Yu-Chuan Lu, Chia-Kwung Fan, Hong-Jeng Yu, Hsin-Tien Liu, Chia-Chang Wu, Kuan-Chou Chen, Shih-Ping Liu y Po-Ching Cheng. 2020. Testosterone

regulates the intracellular bacterial community formation of uropathogenic *Escherichia coli* in prostate cells via STAT3. *International Journal of Medical Microbiology*. 310, 7: 151.

- Collinson, S. K.; Parker, J. M.; Hodges, R. S. y Kay, W. W. 1999. Structural predictions of AgfA, the insoluble fimbrial subunit of *Salmonella* thin aggregative fimbriae, *Journal of Molecular Biology*. 290: 741–756.
- Coutte, L.; Alonso, S.; Reveneau, N.; Willery, E.; Quatannens, B.; Locht, C. y Jacob-Dubuisson, F. 2003. Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *Journal of Experimentation in Medicine* 197 (6): 735-42.
- De la Cruz M. A. H. 2015. Caracterización de proteasas de *Actinobacillus seminis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tlalnepantla Edo. de México.
- Diacovich, L. y Gorvel, J. P. 2010. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nature Review Microbiology*. 8: 117-128.
- Dibarrat, J.; Díaz, E.; Reynoso, A.; Tenorio, R. y Gutiérrez, T. 2006. Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral con *Actinobacillus seminis*: estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. *Técnica Pecuaria en México*, 44(2): 257-267.
- dos Santos F. A., de Azevedo E. O., de Azevedo S. S., Garino J. F., Mota R. A., de Cássia P. K. P., Gomes A. L. y Alves C. J. 2014. Isolation of *Actinobacillus seminis* from a goat with clinical epididymo-orchitis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(1): 205-208.
- Edwards, D. P. 2005. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annual Review of Physiology*. 67: 335–376.
- Figueroa-Valenzuela, C; Montes-García, J. F.; Vazquez-Cruz, C.; Zenteno, E.; Pereyra, A. y Negrete-Abascal, E. *Mannheimia haemolytica* OmpH binds fibrinogen and fibronectin and participates in biofilm formation (Manuscrito en preparación).
- Finlay, B. B. y Cossart, P. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276:718–725.
- Foster, R. A. 2017. Male Reproductive System. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 1194–1222.
- Genetzky R. M. 1995. Epididymitis in rams. *The Compendium Food Animal*. 17:447-454.
- Gerlach, R.G. y M. Hensel. 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 297: 401-15.
- Gophna, U.; Oelschlaeger, T. A.; Hacker, J. y Ron, E. Z. 2009. Role of fibronectin in curli-mediated internalization. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 212(3): 55-58.

- Gutiérrez J. L.; Díaz E.; Tenorio V. R.; Garrido G. I.; Tórtora J. L. y Acosta J. P. 2015. Diagnóstico serológico, histopatológico y molecular de epididimitis en carneros de Zacatecas, México. *Quehacer Científico en Chiapas*. 10:16-23.
- Hajtós I.; Fodor L.; Glávits R. y Vargas J. 1987. Isolation and characterization of *Actinobacillus seminis* strains from ovine semen samples and epididymitis. *Journal of Veterinary Medicine*. 34(1-10): 138-147.
- Hwang H. H.; Healey M. C.; Elsner Y. Y. y Johnston A. V. 1989. Primary culture of ram epididymal epithelial cells. *Journal Tissue Culture Methods*. 12: 77- 81
- Ishibashi, Y., S.; Claus, D. y Relman, A. 1994. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *Journal Experiments Medicals*. 180:1225–1233
- Jansen B. C. 1983. The epidemiology of bacterial infection of genitalia rams. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*.; 50: 275- 282.
- Kim, S.H.; Turnbull, J. y Guimond, S. 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *Journal of Endocrinology*. 209: 139-151
- Kimizuka, R.; Kato, T.; Hashimoto, S.; Yamanaka-Okada, A.; Okuda, K. y Ishihara, K. 2009. Congo Red-binding Protein in Rough-phenotype *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is Amyloid-like fiber. *Bull Tokyo Dental College*. 50:23-29.
- Klemm, P. y M.A. Schembr. 2000. Bacterial adhesins: function and structure. *International Journal of Medical Microbiology*. 290(1): 27-35.
- Klein, S. L. 2000. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(6): 627–638.
- Kline, K.A.; Falker, S.; Dahlberg, S.; Normark, S. y Henriques-Normark, B. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe*. 5:580–592.
- Low, J.; Somerville, D.; Mylne, J. y Mckelvey, W. 1995. Prevalence of *Actinobacillus seminis* in the semen of rams in the United Kingdom. *The Veterinary Record*. 136(11):268-9.
- López-Ochoa, J.; Montes-García, J. F.; Vázquez-Cruz, C.; Sánchez-Alonso, P.; Pérez-Márquez, V.; Blackall, P.; Vaca-Pacheco, S. y Negrete-Abascal, E. 2017. *Gallibacterium* elongation factor-Tu possesses amyloid-like protein characteristics, participates in cell adhesion, and is present in biofilms. *Journal of Microbiology*. 55(9): 745–752.
- Meylan, E., Tschopp, J. & Karin, M. 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 7098:39-44.
- Montes-García, J. F. 2014. Identificación de proteínas amiloides expresadas por *Mannheimia haemolytica*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.

- Montes-García, J. F.; Chincoya, D.; Vaca, S.; Vázquez, C.; Sánchez, P.; Cortes, J.; Trujillo-Ruiz, H. y Negrete-Abascal, E. 2018. Identification of two adhesins of *Actinobacillus seminis*. *Small Ruminant Research*. 167, 100–103.
- Montes-García, J.F.; Delgado-Tapia, W.A.; Vaca, S.; Negrete-Abascal, E.; Vazquez-Cruz, C. y Cruz-Córdova, A. 2019. *Actinobacillus seminis* GroEL-homologous protein agglutinates sheep erythrocytes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 112:1655-1662.
- Montes-García, J.F.; Rojas, L.; Zenteno, E.; Vazquez-Cruz, C. y Negrete-Abascal, E. 2020. Characterization of *Actinobacillus seminis* biofilm formation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 113:1371-1383.
- Moustacas, V. S.; Silva, T. M. A.; Costa, L. F.; Carvalho-Júnior, C. A.; Santos, R. L. y Paixão, T. A. 2014. Clinical and pathological changes in rams experimentally infected with *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni*. *The Scientific World Journal*. 241452.
- Negrete-Abascal, E.; Tenorio, V. R.; Guerrero, A. L.; García, R. M.; Reyes, M. E. y de la Garza, M. 1998. Purificación y caracterización de una proteasa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, un antígeno común a todos los serotipos. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 62(3):183-190.
- Negrete-Abascal, E.; Tenorio, V. R. y de la Garza, M. 1999. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Current Microbiology*. 38(1): 64-67.
- Negrete-Abascal, E.; Montes-García, F.; Vaca, S.; Villamar, T. y Vázquez, C. 2011. Expression of amyloid proteins type curly by *Gallibacterium anatis*. *International Pasteurellaceae conference*. 24-27 August. Elsinore, Denmark.
- Negrete-Abascal, E.; Montes-García, F.; Vaca-Pacheco, S.; Leyto-Gil, A. M.; Fragoso-García, E.; Carvente-García, R.; Perez-Agueros, S.; Castelan-Sanchez, H. G.; García-Molina, A.; Villamar T. E.; Sánchez-Alonso, P. y Vázquez-Cruz, C. 2018. Genome sequence of *Actinobacillus seminis* strain ATCC 15768, a reference strain of ovine pathogens that causes infections in reproductive organs. *Genome Announc*. 6:e01453-17.
- Núñez del Arco, A.; Salas-Téllez, E.; De la Garza, M.; Díaz-Aparicio, E. y Tenorio-Gutiérrez, V. 2006. Identification of an immunogenic protein of *Actinobacillus seminis* that is present in microvesicles. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 70:43-49.
- Petrova, O. E. y Sauer, K. 2016. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Current Opinion in Microbiology*. 30: 67–78.
- Ramírez-Paz-y-Puente, G. A., Vazquez-Cruz, C. y Negrete-Abascal, E. Hormonas Esteroides Sexuales: Moléculas moderadoras de la infección bacteriana. Manuscrito en preparación.
- Reyes M. E. 2018. Respuesta al estrés por hierro de *Actinobacillus seminis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tlalnepantla Edo. De México.

- Rivas-Muñoz, R. 2013. Patogénesis pulpar y periapical. En Microbiología en Endocrinología. UNAM.
- Romero, D.; Aguilar, C.; Losick, R. y Kolter, R. 2010. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. Proceedings of the National Academy of Sciences. 107, 2230–2234.
- Santos, F. A.; Figueiredo da Costa, D.; Ferreira da Silva, A.; Dos Santos Pessoa, R. M.; Figueiredo Rocha, V. C.; Gomes Olinda, R.; Dantas, A. F. M.; de Melo, M. A.; Peña Alfaro, C. E.; Azevedo, S. S. y Alves, C. J. 2019. Microbiological, molecular, and histopathological findings in goats experimentally infected with *Actinobacillus seminis*. Microbial Pathogenesis. 133, 103555.
- Scarpin, K. M.; Graham, J. D.; Mote, P. A. y Clarke, C. L. 2009. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. Nuclear Receptor Signaling. 7:100-109.
- Schaller, A.; Kuhnert, P.; de la Puente-Redondo, V. A.; Nicolet, J. y Frey, J. 2000. Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. Veterinary Microbiology 74: 365-376.
- Tortora, G.; Berdell, R.; Funke, B. y Case, C. 2007. Mecanismos de patogenicidad bacteriana. Introducción a la microbiología. (9). Editorial Panamericana.
- von Stein Cubas Warnavin, S.; Valenga, H. M.; Costa, T. B. C.; Chaves, J. D. P.; Spolidorio, L. C.; Spolidorio, D. M. P.; Feres, M.; Soares, G. M. S. y Steffens, J. P. 2021. Periodontal clinical status, microbial profile, and expression of interleukin-1 β in men under androgenic anabolic steroids abuse. Clinical oral investigations. 25(6): 3567-3575.
- Westerlund, B. y Korhonen, T.K. 1993. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. Molecular Microbiology. 9: 687- 694
- Wilson, J. W.; Foster, D. W.; Kronenberg, H. y Larsen, P. R. 1998. Principles of endocrinology, en William Textbook of Endocrinology, J. W. Wilson, Ed., pp. 1–10, WB Saunders Company.
- Wu, J.; Wang, A. y Jennings, M. 2008. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. Current Opinion in Chemical Biology. 12:93-101.
- Zhou, Y; Blanco, L. P.; Smith, D. R. y Chapman, M. R. 2012. Bacterial Amyloids. Methods in Molecular Biology. Methods and Protocols Amyloid Proteins 2nd edición. Methods of Molecular Biology. 849:303-320.