



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala



**EFFECTO DE LA NOREPINEFRINA Y
EPINEFRINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE
FACTORES DE VIRULENCIA EN
*Gallibacterium anatis.***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA:

PABLO ALEJANDRO REA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ERASMO NEGRETE ABASCAL

SINODALES

Dra. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

Dra. MARTHA OFELIA SALCEDO ÁLVAREZ

Dr. ERIC MONROY PÉREZ

Biol. TOMÁS ERNESTO VILLAMAR DUQUE

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo de México, 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.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 4-Genética de la Unidad de Morfología y Función de la FES Iztacala, UNAM con el apoyo de DGAPA-PAPIIT IN219919 e IN204122

Índice

Resumen.	1
Introducción.	2
Catecolaminas.	3
Comunicación celular.	5
<i>Gallibacterium anatis</i>	6
Factores de virulencia.	7
Antecedentes.	9
Objetivos.	10
Objetivo general.	11
Objetivos particulares.	11
Material y Métodos.	12
Cepas bacterianas.	11
Cinética de crecimiento.	11
Obtención de proteínas totales.	12
Obtención de proteínas secretadas.	12
Obtención de adhesinas.	12
Aislamiento de proteínas amiloides.	13
Producción de proteínas amiloide-like.	13
Electroforesis.	14
Zimograma.	14
Inmuno reconocimiento.	14
Formación de biopelícula.	15
Resultados.	16
Cinética de crecimiento.	16
Perfil de proteínas.	17
Adhesinas.	20
Actividad proteolítica.	22
Inmunoreconocimiento.	23
Producción de proteínas amiloide-like.	28
Formación de biopelícula.	31

Discusión.	32
Conclusiones.	38
Perspectivas.	39
Bibliografía.	40

Índice de figuras

Figura 1. Biovares de <i>Gallibacterium anatis</i> , y sus diferencias en las propiedades hemolíticas.....	7
Figura 2. cinética de crecimiento de la cepa <i>G. anatis</i> 12656-12 en medio tsb, sin adiciones (control) o con epinefrina 10, 20, 30, 40, o 50µm.....	16
Figura 3. cinética de crecimiento de la cepa <i>G. anatis</i> 12656-12 en medio tsb, sin adiciones (control) o con norepinefrina 10, 20, 30, 40, o 50µm.	17
Figura 4. cinética de crecimiento de la cepa <i>G. anatis</i> F-149 ^T en medio tsb, sin adiciones (control) o con epinefrina 10, 20, 30, 40, o 50µm.....	17
Figura 5. cinética de crecimiento de la cepa <i>G. anatis</i> F-149 ^T , en medio tsb, sin adiciones (control) o con norepinefrina 10, 20, 30, 40, o 50µm.	18
Figura 6. patrón de proteínas de <i>G. anatis</i> 12656-12 en gel sds-page al 12 %, en presencia de catecolaminas.....	19
Figura 7. Patrón de proteínas de <i>G. anatis</i> F-149 ^T en gel SDS-PAGE al 12%, en presencia de catecolaminas.....	21
Figura 8. Patrón de proteínas de posibles adhesinas de <i>G. anatis</i> 12656-12 en gel SDS-PAGE al 12 %, en presencia de catecolaminas.....	22
Figura 9. Patrón de proteínas de posibles adhesinas de <i>G. anatis</i> F-149 ^T en gel SDS-PAGE al 12 %, en presencia de catecolaminas.....	23
Figura 10. Zimograma SDS-PAGE 12% con gelatina porcina 1% de proteínas secretadas por <i>G. anatis</i> 12656-12 , en presencia de catecolaminas.	24
Figura 11. Zimograma SDS PAGE 12% con gelatina porcina 1% de proteínas secretadas por <i>G. anatis</i> F-149 ^T , en presencia de catecolaminas.....	24
Figura 12. Inmuno reconocimiento de proteínas de extractos totales de <i>G. anatis</i> 12656-12, en presencia de catecolaminas, con suero de aves infectadas.....	25
Figura 13. Inmuno reconocimiento de proteínas de extractos totales de <i>G. anatis</i> F-149 ^T , en presencia de catecolaminas, con suero de aves infectadas.	27
Figura 14. Far western blot de probables adhesinas de <i>G. anatis</i> 12656-12, en presencia de catecolaminas, con fibrinógeno de cerdo biotinilado_.....	28
Figura 15. Far western blot de probables adhesinas de <i>G. anatis</i> F-149 ^T , en presencia de catecolaminas, con fibrinógeno de cerdo biotinilado.	28
Figura 16. Unión de Rojo Congo de <i>G. anatis</i> 12656-12 a 39°C en presencia de concentraciones crecientes de epinefrina (A) y norepinefrina (B).....	29
Figura 17. Unión de Rojo Congo de <i>G. anatis</i> F-149 ^T a 39°C en presencia de concentraciones crecientes de epinefrina (A) y norepinefrina (B).....	30
Figura 18. Proteínas purificadas tipo amiloide de <i>G. anatis</i> 12656-12 en gel SDS-PAGE al 12% sin pintar con azul de coomassie	31

Figura 19. Proteínas purificadas tipo amiloide de <i>G. anatis</i> F-149 ^T en gel SDS-PAGE al 12%, sin pintar con azul de coomassie.	31
Figura 20. Formación de biopelícula de <i>G. anatis</i> 12656-12, en presencia de catecolamina.....	32
Figura 21. Formación de biopelícula de <i>G. anatis</i> F-149 ^T , en presencia de catecolaminas.....	32

Índice de tablas

Tabla 1. Lista de anticuerpos y proteínas usados.	15
Tabla 2. Expresión diferencial de proteínas (extractos totales) de <i>G. anatis</i> F-149 ^T	20
Tabla 3. Inmuno reconocimiento de proteínas de extractos totales de <i>G. anatis</i> 12656-12 en presencia de epinefrina.	26

Resumen.

Gallibacterium anatis es una bacteria Gram negativa miembro de la familia *Pasteurellaceae* que forma parte del microbiota del tracto respiratorio y reproductivo de aves domésticas o silvestres, pero también es la causa de diversas afecciones tales como salpingitis, peritonitis, síndrome respiratorio y baja en la postura. Este microorganismo puede ser biovar hemolítico o no hemolítico. La patogenicidad de esta bacteria se ha asociado a la expresión de algunos factores de virulencia, sin embargo, el efecto de las hormonas catecolaminas en la expresión de éstos, ha sido poco estudiado. En el presente trabajo se estudió el efecto de diversas concentraciones de epinefrina (E) o norepinefrina (NE) en el crecimiento de esta bacteria, así como su efecto en la expresión diferencial de proteínas. La presencia de E o NE en concentraciones de 20 a 50 μM en el medio de cultivo, favorecen el crecimiento de ambos biovars, pero no significativamente el de la no-hemolítica. Estas concentraciones de hormonas incrementan o disminuyen el patrón de proteínas en el rango de 20 a 70 kDa de ambas cepas; y también incrementan la expresión de probables adhesinas en ambas cepas. Estas diferencias fueron corroboradas en los ensayos de Western blot usando suero de aves infectadas con *G. anatis*. El incremento de posibles adhesinas también se corroboró por Far Western blot usando fibrinógeno biotinilado. Aunque ambas cepas unen el colorante Rojo Congo, se observó un incremento de su unión por el biovar hemolítico, tanto con E como con NE; pero la NE indujo una disminución de su unión para el biovar no-hemolítico, lo que sugiere que la producción de proteínas amiloide-like; principal componente proteico de una biopelícula, se ve afectada por la presencia de E o NE. La presencia de hormonas provocó una disminución en la formación de biopelícula en ambas cepas. La presencia de catecolaminas afecta el crecimiento y la expresión de probables factores de virulencia de *G. anatis*, indicando que esta bacteria responde al estrés de su hospedador.

Introducción.

El estrés es una respuesta a los estímulos, externos o internos, capaz de alterar la homeostasis fisiológica y la capacidad de hacer frente a esa situación estresante, es un determinante crucial de la salud y la enfermedad. La exposición a condiciones adversas inicia una serie de respuestas adaptativas organizadas para defender la estabilidad del medio interno y mejorar la supervivencia del organismo. Este proceso suele denominarse "respuesta al estrés", esto implica varios mecanismos que permiten al organismo realizar los ajustes fisiológicos y metabólicos necesarios para hacer frente a las exigencias del desafío homeostático (Gold & Chrousos., 2002).

En los animales, el estrés da lugar a una comunicación bidireccional entre el cerebro y los órganos periféricos, además de estar mediada por una serie de hormonas y factores neuroactivos (Reiche *et al.*, 2004).

La respuesta al estrés es un sistema sofisticado, eficiente y evolutivamente mantenido, que regula el aprendizaje, los recuerdos y la toma de decisiones estratégicas en varias capas del sistema nervioso central (SNC) (Bains *et al.*, 2015). Cuando un escenario se percibe como peligroso el cerebro activa varios circuitos neuronales para mantener la integridad fisiológica incluso en las circunstancias más extremas. Sin embargo, la detección de diversas formas de estrés requiere la participación de muchas redes. Diferentes redes neuronales y funciones celulares se activan por el estrés psicológico y físico, dejando diversas huellas en el cerebro. Los estresores físicos son estímulos que provocan auténticas anomalías fisiológicas y superan al individuo; como una hemorragia o una enfermedad (Dayas *et al.*, 2001).

Los estresores físicos son analizados principalmente por el tronco del encéfalo y las áreas hipotalámicas y con frecuencia requieren una respuesta sistémica inmediata (Joëls & Baram 2009). En consecuencia, la primera etapa de la reacción al estrés (sistema simpático adrenomedular-SAM) permite una rápida aclimatación, que da lugar a respuestas a corto plazo como el estado de alerta, la vigilia y la valoración de circunstancias particulares, lo que permite un movimiento estratégico para superar la adversidad en las primeras etapas de un periodo traumático. El mecanismo hormonal (eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal-HPA) se considera más lento en comparación con los procesos sinápticos que estimulan el SAM, pero da lugar a una reacción secretora intensificada y prolongada en la fase secundaria (respuestas de larga duración) (Ulrich-Lai & Herman., 2009).

El estrés provoca la liberación de una serie de potentes efectores biológicos y ha llevado a pensar que el aumento de las infecciones que se producen tras el estrés se debe a la reducción de la eficacia inmunitaria por parte de las hormonas del estrés: catecolaminas. En el contexto de la infección, casi todas las células inmunitarias poseen receptores para las hormonas catecolaminas y los neuropéptidos. Demostrando así que existe una estrecha conexión entre los sistemas nervioso e inmunitario, ya que las fibras nerviosas simpáticas inervan ampliamente el tejido linfático y los ganglios de los órganos. En general, se ha demostrado que la exposición a las hormonas del estrés reduce la eficacia inmunitaria, especialmente la inmunidad celular protectora (Reiche *et al.*, 2004; Glaser & Kiecolt-Glaser., 2005).

La epinefrina y norepinefrina son catecolaminas que están evolutivamente conservadas en los animales, tanto vertebrados como invertebrados, la fuente principal de epinefrina es la médula suprarrenal, mientras que la norepinefrina se sintetiza en la médula suprarrenal y por neuronas adrenérgicas distribuidas por todo el cuerpo (Walker & Drouillard 2012).

Catecolaminas.

Una hormona es el primer mensajero químico, transmitido por sangre y suele ser secretada por un órgano o grupo de células en respuesta a una demanda del entorno para señalar la respuesta específica de otro (Gomperts *et al.*, 2003).

Hay un gran número de sustancias, que actúan con gran intensidad en cantidades mínimas, que son de gran importancia en los procesos fisiológicos. Una clase de éstas consiste en las hormonas que se producen en un órgano particular; pasan a la corriente sanguínea y producen efectos en órganos distantes. Por lo tanto, proporcionan una coordinación química de las actividades del organismo, trabajando junto a ella a través del sistema nervioso. Las hormonas suelen liberarse en pequeñas cantidades en lugares alejados de los órganos a los que se dirigen. Al entrar en la circulación, pueden entrar en contacto con enzimas que las descomponen. Muchas de ellas circulan en forma de complejos con proteínas de unión específicas, lo que reduce aún más su concentración libre (Gomperts *et al.*, 2003).

La familia de las hormonas del estrés que incluyen a la epinefrina, la norepinefrina y la dopamina son catecolaminas naturales que contienen un núcleo de catecol formado por un anillo de benceno con grupos hidroxilos adyacentes y una cadena amina lateral opuesta

que contribuye a la especificidad del receptor. Las catecolaminas existen en concentraciones bajas (micromolares) en el cerebro con respecto a los neurotransmisores aminoácidos como el glutamato y el ácido γ -aminobutírico. Sin embargo, tienen una importancia considerable en la regulación de múltiples aspectos de la función del sistema nervioso central (Goldstein *et al.*, 2003).

Las catecolaminas se sintetizan en los nervios en el lugar de su liberación, tanto en las terminales como en los cuerpos celulares. La tirosina hidroxilasa (TH, tirosina 3-monooxigenasa) cataliza la conversión de sus sustratos tirosina y oxígeno molecular en 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA). Es la enzima más importante en la síntesis de catecolaminas, siendo el paso inicial y limitante de la velocidad en la síntesis de dopamina, norepinefrina y epinefrina (Goldstein *et al.*, 2003).

La catecolamina afecta al crecimiento y la virulencia de las bacterias, el aumento del crecimiento de las bacterias por las catecolaminas también depende del tipo y la concentración de catecolamina a la que son expuestas las bacterias (O'Donnell *et al.*, 2006). Se ha observado que las catecolaminas (epinefrina, norepinefrina y Dopamina), influyen directamente en el crecimiento de bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Pseudomonas aeruginosa*. La virulencia de una bacteria se manifiesta cuando se produce una interacción mutua entre un patógeno bacteriano y su huésped (Kendall & Sperandio, 2016).

Comunicación celular

Se ha sostenido ampliamente que las bacterias deben percibir y reconocer el entorno del huésped para expresar los genes esenciales para la colonización o la expresión de la virulencia. En este sentido, la detección de quórum sensing (QS) es un mecanismo de señalización de célula a célula en el que las bacterias responden a moléculas químicas similares a las hormonas, llamadas autoinductores (AI). Cuando un autoinductor alcanza un umbral de concentración crítico, las bacterias reconocen y responden a esta señal alterando sus patrones de expresión génica (Clarke *et al.*, 2006).

Casi todos los sistemas conocidos de detección de quórum en bacterias Gram negativas presentan cuatro características comunes. En primer lugar, los autoinductores de estos sistemas son las acil-homoserinas-lactonas (AHL) u otras moléculas que se sintetizan a partir de la S-adenosilmetionina (SAM), y son capaces de difundirse libremente a través de la membrana bacteriana. En segundo lugar, los autoinductores se unen a receptores específicos que residen en la membrana interna o en el citoplasma. En tercer lugar, la detección de quórum suele alterar entre docenas y cientos de genes que sustentan diversos procesos biológicos. En cuarto lugar, en un proceso denominado autoinducción, la activación de la detección de quórum impulsada por el autoinductor estimula el aumento de la síntesis del autoinductor (Papenfort & Bassler, 2016; Miller & Bassler, 2001).

Existen 3 tipos de autoinductores, AI-1: químicamente son acil-homoserina-lactonas (AHL) los cuales tiene un anillo conservado de homoserina lactona conectada a través de un enlace amida a una cadena de acilo variable que puede ser de cadena corta y se difunde a través de la membrana. La detección del quórum de tipo AHL se produce principalmente en las bacterias Gram negativas y está implicada sobre todo en la señalización intraespecífica (Rai *et al.*, 2015).

AI-2: químicamente es un diéster de borato de furanosilo, el AI-2 es producido y reconocido tanto por bacterias Gram-positivas como Gram-negativas y está implicado en QS tanto inter como intra específico (Rai *et al.*, 2015; Clarke *et al.*, 2006).

AI-3: Es un compuesto aromático que no contiene un esqueleto de azúcar como AI-2 sintetizado por el gen LuxS, el cual también se encarga de sintetizar al AI-2. El AI-3 tiene la capacidad de generar comunicación interdominio ya que ciertas hormonas catecolaminas y en particular la epinefrina y norepinefrina producidas por mamíferos inducen una señalización cruzada con AI-3 (Clarke *et al.*, 2006; Walters *et al.*, 2006).

Todas estas catecolaminas sirven como señales para que los microorganismos modulen la expresión de los genes, por tanto, funcionan en la señalización interdominio.

La señalización interdominio implica una comunicación hormonal entre las bacterias y el huésped (Molina, 2013). Varias especies bacterianas utilizan dos sensores adrenérgicos bacterianos, la epinefrina y norepinefrina no atraviesan la membrana celular; por tanto, depende de los sistemas de dos componentes (TCS) QseBC y QseEF para transmitir las señales adrenérgicas al entorno intracelular. Los sistemas de doble componente suelen estar compuestos por un sensor histidina quinasa situado en la membrana citoplasmática que detecta una señal específica y un regulador de respuesta citoplasmático que controla la salida. Al detectar una señal ambiental concreta, la quinasa se autofosforila y posteriormente transfiere este fosfato a su regulador de respuesta correspondiente. La mayoría de los reguladores de respuesta son factores de transcripción que, tras la fosforilación, median la salida de esta cascada de señalización uniendo el ADN para promover o reprimir la expresión génica (Weigel & Demuth., 2016). Sorprendentemente, el receptor de la hormona del estrés bacteriano y un regulador global, QseC, pueden modular la expresión de muchos (>400) genes, incluidos los de virulencia, metabólicos y de respuesta al estrés (Hughes *et al.*, 2009).

Gallibacterium anatis

Gallibacterium anatis es un cocobacilo, Gram negativo, no móvil, encapsulado, anaerobio facultativo, que pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, *G. anatis* puede subdividirse en dos biovars fenotípicamente distintos: el biovar hemolítico y el biovar anatis no hemolítico, la cepa hemolítica forma zonas β -hemolíticas. *G. anatis* presenta colonias de 1-2 mm de color grisáceo, lisas, semitransparentes, ligeramente elevadas y circulares con un margen entero cuando se incuban durante 24 h a 37 °C en placas ricas en nutrientes que contienen sangre de cerdo, oveja, ternera o pollo (Christensen *et al.*, 2003; Bojesen *et al.*, 2004). *G. anatis* se encuentra frecuentemente en pollos, pero también se ha reportado en aves domésticas, así como en silvestres incluyendo pavos, gansos y patos (Bisgaard *et al.*, 2009; Bisgaard 1993). *G. anatis* forma parte de la microbiota del tracto respiratorio y reproductivo de aves. Por lo tanto, es considerado un patógeno oportunista que compromete principalmente a estos dos sistemas y que puede expandirse al resto del organismo a través de la sangre, provocando lesiones principalmente en los órganos reproductores de gallinas ponedoras y se le considera una de las causas de la salpingitis, peritonitis, síndrome respiratorio y baja en la

postura (Mendoza *et al.*, 2014; Neubauer *et al.*, 2009; Paudel *et al.*, 2013; Paudel *et al.*, 2014).

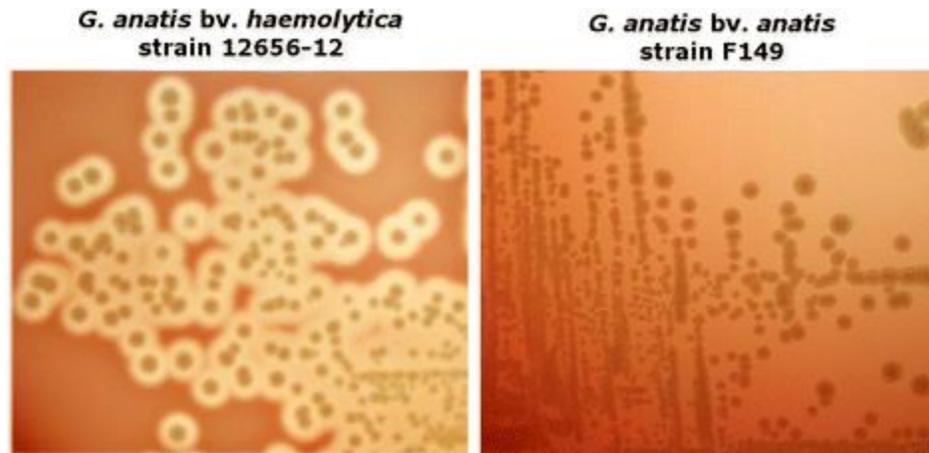


Figura 1. Biovares de *Gallibacterium anatis*, y sus diferencias en las propiedades hemolíticas (Persson & Bojesen., 2015).

Factores de virulencia

Las bacterias poseen mecanismos de patogenicidad específicos que se presentan al superar las defensas de un hospedero. Un microorganismo patógeno posee la capacidad de producir un daño a cualquier nivel en un organismo hospedero susceptible. La virulencia es una medida cuantitativa de la patogenicidad y se mide por el número de microorganismos necesarios para causar una enfermedad, es decir, es el grado de patogenicidad (Casadevall & Pirofski, 1999).

Los factores de virulencia bacterianos permiten que un huésped se replique y se disemine dentro de un hospedero, en parte subvirtiendo o eludiendo las defensas. Un factor de virulencia debe permitir al organismo hacerlo con un inóculo relativamente pequeño (Cross, 2008).

Las bacterias cuentan con dos mecanismos de patogenicidad bacteriana, estos son la fase temprana que se caracteriza por presentar factores de virulencia como movimiento, adhesión e invasión, en la fase tardía presentar factores como supervivencia intracelular, evasión de la respuesta inmune y variación antigénica (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

Un factor de virulencia para *Gallibacterium anatis* es una toxina que secreta, denominada GtxA (toxina A de *Gallibacterium*), la proteína GtxA expresada posee actividad hemolítica

contra eritrocitos de una amplia variedad de huéspedes, y actividad leucotóxica contra la línea celular de macrófagos de pollo (Kristensen *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que *G. anatis* produce vesículas de membrana externa con un contenido proteico que varía dependiendo de la condición de crecimiento, lo que sugiere que la producción de vesículas de membrana externa podría servir para múltiples funciones y ser una forma de hacer frente a los cambios del entorno, por ejemplo, dentro del huésped.

G. anatis expresa metaloproteasas capaces de degradar la inmunoglobulina aviar IgG (García-Gómez *et al.*, 2005). Las metaloproteasas son una clase de proteasas que desempeñan muchas funciones importantes en la virulencia, como la colonización, la adquisición de nutrientes, la evasión inmunitaria y la invasión bacteriana en la circulación sistémica (Miyoshi & Shinoda, 2000).

Se ha visto que *G. anatis* es capaz de adherirse a superficies inertes, lo que se considera un primer paso hacia la formación de biofilm, esta capacidad se asocia a infecciones persistentes y crónicas y a una mayor resistencia a los antimicrobianos (Vaca *et al.*, 2011). *G. anatis* puede ser clasificado en cepas que no producen biofilm y cepas que producen biofilm débil, moderado y fuerte (Johnson *et al.*, 2013).

La adhesión es una colonización inicial esencial seguida de la penetración a través de los tejidos. La adhesión es aparentemente esencial para evitar los mecanismos defensivos innatos del huésped, que no se limitan a los efectos enzimáticos, que pueden eliminar eficazmente los patógenos bacterianos no adherentes (Wu *et al.*, 2008).

Sin embargo, para que la adhesión de los patógenos bacterianos tenga éxito, los patógenos bacterianos deben ser capaces de acceder a algunos nutrientes esenciales, como el hierro, para su crecimiento. Los patógenos bacterianos deben tener una o más estrategias de fijación o adherencia comunes que son las fimbrias y las adhesinas proteicas monoméricas. La adhesión es más bien una unión más frágil y altamente específica, a menudo mediada por adhesinas, el organelo de unión, como el pili, podría estar formado por adhesinas proteicas monoméricas, donde la unión está mediada por proteínas de la superficie celular, la unión más estrecha a la célula huésped puede reconocer proteínas de la superficie de la célula huésped (Hori & Matsumoto, 2010).

G. anatis F-149^T es capaz de expresar fimbrias y adherirse a las células epiteliales de pollos (Lucio *et al.*, 2012). En el caso del *G. anatis* su adhesión está dada por fimbrias de tipo F17-

like que se expanden en la superficie de la bacteria, la adhesina se ubica en el extremo de la fimbria y se encarga del reconocimiento y unión al receptor, estas fimbrias se unen a los receptores que poseen N-acetil-D-glucosamina en la superficie de la célula del hospedero (Persson & Bojesen, 2015).

La movilidad bacteriana es la capacidad que tiene la bacteria de desplazarse de un lugar a otro por medio del flagelo o fimbrias. Los flagelos son apéndices largos los cuales se encuentran fijados a la célula por uno de sus extremos y libres por el otro. El filamento del flagelo bacteriano está compuesto de subunidades de una proteína denominada flagelina y constituyen el principal medio de motilidad (Cárdenas-Perea et al., 2014).

Antecedentes.

Freestone y colaboradores en 2002 evaluaron el crecimiento de *Escherichia coli* en presencia de catecolaminas, reportaron un crecimiento significativo de *E. coli* por catecolaminas, demostraron un mecanismo que promueve el crecimiento de bacterias en presencia de catecolaminas que es la eliminación a través de la captación de hierro de la lactoferrina y la transferrina y su posterior adquisición por las bacterias. Se demostró también que la estructura de 3,4-dihidroxibenzoico de las catecolaminas era fundamental para la adquisición de hierro.

Belay y colaboradores en 2003 examinaron el efecto de las catecolaminas en *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteriodes fragilis*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter Sp*, y *Salmonella choleraesuis*. Los resultados del estudio indicaron que la suplementación de los cultivos bacterianos en un medio mínimo con norepinefrina o epinefrina no incrementan el crecimiento de estas bacterias.

Garcia y colaboradores en 2005 reportaron metaloproteasas secretadas por *G. anatis*, con actividad proteolítica sobre caseína e IgG de pollo después de 24 horas, también reportaron una reacción cruzada con anticuerpos policlonales contra la proteasa purificada de *Aactinobacillus pleuropneumoniae*.

Rivero y colaboradores en 2005 reportaron que *Haemophilus paragallium* secreta metaloproteasas en diferentes medios de cultivo que carecen de suero, mostrando una

actividad proteolítica en proteínas de 100 kDa de masa molecular, activa en un amplio rango de pH 4-9, siendo el pH 7.5 el óptimo. La actividad de proteasas fue inhibida por 20 mM de EDTA/mL y reactivada por el calcio, las proteínas secretadas degradaron parcialmente IgG de pollo y reaccionaron de forma cruzada con un suero policlonal contra una proteasa secretada por *A. pleuropneumoniae*

Bansal y colaboradores en 2007 analizaron el efecto de la epinefrina, norepinefrina e indol en *E. coli* entero hemorrágica (EHEC) O157:H7 mediante un ensayo de quimiotaxis con dos fluoróforos, descubrieron que EHEC es atraído por la epinefrina y la norepinefrina mientras que es repelida por el indol. Además, la epinefrina y la norepinefrina aumentan la motilidad y la formación de biopelícula, mientras que indol la atenua.

Yang y colaboradores en 2014 evaluaron el efecto de norepinefrina y la dopamina en *Vibrio harveyi*, estas favorecen el crecimiento, la producción de sideróforos, la motilidad, la formación de biopelículas y la producción de exopolisacáridos

Cambroneel y colaboradores en 2019 analizaron el efecto de la epinefrina en la motilidad, la adhesión, la formación de biopelículas y la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados demostraron que la epinefrina aumentó la adhesión y la formación de biopelículas.

Cambroneel y colaboradores en 2020 evaluaron los efectos de la epinefrina y norepinefrina en 4 cepas de *Enterococcus faecalis*: MMH594, V583, Symbioflor 1 clon DSM 16431 y OB15, reportaron que la epinefrina modulaba la formación de biopelícula, mientras que la norepinefrina tuvo menos efecto en formación de biopelícula. También se encontró que la epinefrina aumentó significativamente la adhesión de *Enterococcus faecalis* MMH594 y OB15, mientras que la norepinefrina aumentó significativamente la adhesión en *Enterococcus faecalis* V583 y Symbioflor 1 DSM 16431.

Justificación.

G. anatis es un patógeno oportunista que causa diversas afecciones en el sistema reproductor y respiratorio de las aves. Este microorganismo podría responder a diferentes respuestas del estrés de su hospedero, por lo que la producción de hormonas del estrés por parte de las aves podría modificar su potencial patogénico.

Hipótesis.

La expresión de hormonas del estrés (epinefrina/norepinefrina) por aves puede ser detectada por *G. anatis* y esta detección pueden afectar el crecimiento de la bacteria y modificar la expresión de sus probables factores de virulencia

Objetivos.

Objetivo general

Determinar el efecto de la Norepinefrina y Epinefrina en el crecimiento y expresión de factores de virulencia de *G. anatis*.

Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la adición Norepinefrina y Epinefrina sobre el crecimiento de *G. anatis* en fase líquida.
- Establecer patrones de proteínas e inmunoreconocimiento de *G. anatis* en presencia de Norepinefrina y Epinefrina
- Establecer los patrones de proteínas secretadas por *G. anatis* en presencia de Norepinefrina y Epinefrina.
- Observar el efecto de la adición de Norepinefrina y Epinefrina sobre la producción de proteasas en *G. anatis*.
- Determinar el efecto de la adición de Norepinefrina y Epinefrina sobre la producción de proteínas de tipo adhesinas en *G. anatis*.
- Determinar el efecto de la adición de Norepinefrina y Epinefrina sobre la producción de proteínas amiloide-like en *G. anatis*.
- Determinar el efecto de la adición de Norepinefrina y Epinefrina sobre la formación de biopelícula en *G. anatis*.

Material y Métodos

Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas 12656-12 y F-149^T de *G. anatis*, para su mantenimiento fueron crecidas en placas de agar sangre 37°C durante 24 horas.

Cinética de crecimiento

Con la finalidad de determinar el efecto de epinefrina y norepinefrina sobre el crecimiento en *G. anatis*, se realizó un precultivo de las cepas 12656-12 hemolítica y F-149^T no hemolítica en un tubo de ensayo con 3 ml de soya tripticaseína (TSB) y se mantuvieron en agitación (150 rpm) a 37°C durante 24 horas.

Posterior a las 24 horas se colocaron 90µl de los precultivos en tubos de 3 ml de TSB para adicionar de manera independiente con 10, 20,30, 40 y 50µM de epinefrina o norepinefrina respectivamente, como control se ocupó un tubo solo con precultivo, se mantuvieron en agitación (150 rpm) a 39°C. Se tomó lectura de la densidad óptica cada hora durante 5 horas a 600nm, la última lectura fue a las 24 horas.

Obtención de proteínas totales

Las muestras de cultivo de las cepas 12656-12 hemolítica y F-149^T no hemolítica de 24 horas fueron centrifugadas a 13 400 rpm durante 2 minutos, la pastilla se resuspendió en 1 ml de HEPES 20 mM pH 7.4 con lisozima (1 mg/ml), las suspensiones se incubaron a 150 rpm a 37°C durante una hora, posteriormente se sonicaron durante 5 minutos (ciclo de 15 segundos de sonicación y 10 segundos de pausa) en baño de hielo.

Después de la sonicación las muestras fueron centrifugadas a 13 400 rpm durante 2 minutos para descartar las células que no se lisaron (pellet), el sobrenadante fue recuperado (extracto total) y mantenido en refrigeración hasta su uso. La cuantificación de proteínas se realizó con el método de Bradford.

Obtención de proteínas secretadas

Se realizaron cultivos en 100ml de medio TSB de las cepas 12656-12 y F-149^T, se les añadieron 10-50µM de Epinefrina o Norepinefrina, respectivamente, los cultivos se incubaron a 150 rpm, a 39°C, durante 24 horas. Los cultivos se centrifugaron a 10 500 rpm

durante 20 minutos a 9°C, el sobrenadante fue precipitado con un volumen de metanol durante 1 hora en el congelador, las proteínas precipitadas fueron recuperadas por centrifugación a 10 500 rpm durante 20 minutos y posteriormente fueron resuspendidas en PBS y mantenidas en congelación hasta su uso.

Obtención de adhesinas

De un cultivo de 24 horas con 10-50µM de Epinefrina o Norepinefrina respectivamente, incubadas a 39°C, se procedió a centrifugar a 13 400 rpm durante 2 minutos, la pastilla fue resuspendida en 1 ml de PBS y se adiciono ácido tricloroacético hasta que la concentración llegó al 3%, seguidamente la muestra fue incubada a 37°C en agitación constante durante 30 minutos, posteriormente la muestra se dejó en reposo 1 hora, pasada la hora la muestra fue centrifugada a 6000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante fue descartado y la pastilla fue resuspendida en 1 ml de PBS, en seguida se sonicaron las muestras durante 5 minutos (ciclo de 15 segundos de sonicación y 10 segundos de pausa) manteniéndose en baño de hielo, se volvió a centrifugar a 13 400 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante fue recuperado y preservado en congelación (Figuroa-Valenzuela et al., manuscrito en preparación).

Aislamiento de proteínas amiloides

A 200 microlitros de proteínas secretadas se les adicionaron 200µl de ácido fórmico, se homogeneizaron y se incubaron en baño maría a 95°C durante 15 minutos, en seguida se centrifugaron a 13 400 rpm durante 5 minutos, las pastillas se lavaron 3 veces con 500µl de acetona y se centrifugaron a las condiciones anteriormente mencionadas, por último las muestras fueron resuspendidas en Tris-HCL 20 mM, NaCL 50 mM pH 7.5, las muestras fueron mantenidas en congelación hasta su uso.

Producción de proteínas amiloide-like

Para determinar si la presencia de hormonas induce un cambio en la cantidad de proteínas amiloide-like, ambas cepas de *G. anatis* fueron crecidas en presencia de Epinefrina o Norepinefrina toda la noche a 39 °C a 150 rpm.

La cantidad de proteínas amiloide-like puede ser determinada indirectamente por la capacidad de unir el colorante rojo Congo (RC). Los cultivos fueron ajustados a una D.O de

1.0 a 600 nm, posteriormente fueron lavados en PBS, se tomó 1ml de muestra y fue centrifugada a 16,300g/2 minutos, la pastilla se homogeneizó en 1 ml de PBS/RC (50µg/ml), se mantuvo en agitación durante 30 minutos, posteriormente se centrifugo a 16,300 g durante 5 minutos, y el sobrenadante fue recuperado para su posterior lectura espectrofotométrica a 480 nm, de esta manera se determinó la cantidad de colorante no unido (Montes Garcia *et al.*, 2018).

Electroforesis

Para observar los cambios en los patrones de proteínas de *G. anatis* 12656-12 y F-149^T generados por las hormonas epinefrina y norepinefrina, se realizó una separación electroforética en geles de poliacrilamida con docetil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12%, a las muestras se les añadió Buffer de muestra 6x y β mercaptoetanol 5%. Al culminar la electroforesis los geles se tiñeron en una solución de azul Coomassie 0.25%, metanol 50% y ácido acético 10% durante 30 minutos, el exceso de colorante se eliminó usando una solución de ácido acético al 10%.

Zimograma

Para evaluar la actividad proteolítica se realizó un zimograma en gel de poliacrilamida al 10% copolimerizado con gelatina porcina al 1%, a las muestras de proteínas secretadas se les añadió Buffer de muestra 6x y β mercaptoetanol 5%, posteriormente a la separación, los geles fueron incubados en agitación durante 1 hora con una solución de Tritón X-100 al 1.5%, seguidamente los geles fueron incubados en Tris-HCl 20 mM pH 7.4, CaCl₂, 10 mM durante una noche a 37°C.

Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, el exceso de colorante se eliminó con una solución de ácido acético al 10% (Negrete et al., 1999).

Inmuno reconocimiento

Después de la separación por electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 60 minutos a 300 mA, seguidamente de la transferencia la membrana fue incubada en una solución de leche al 5% en PBS-Tween 0.05% por 1 hora a 37°C, en agitación constante, esto con la finalidad de bloquear los lugares de unión que

hayan quedado, posteriormente la membrana fue sometida a 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween 0.05% para retirar el excedente de leche.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario y proteína
Suero de aves infectadas <i>G. anatis</i>	Anti-pollo
Fibrinógeno cerdo biotinilado	Estreptavidina peroxidada

Tabla 1. Lista de anticuerpos y proteínas usados a concentración 1:1000

La membrana fue puesta en incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo primario con una dilución de 1:1000 en PBS-Tween 0.05%, posteriormente los anticuerpos fueron retirados y se volvieron a realizar 3 lavados de PBS-Tween, seguidamente se adiciono el anticuerpo secundario en una concentración de 1:1000, dejando la membrana con este durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizó un lavado de membrana 3 veces más con PBS-Tween, para el revelado de la membrana se preparó una solución H_3PO_4 50 mM pH 7.4, diaminobencidina, $CoCl_2$ y $NiCl_2$, seguidamente se añadieron 50 μ l de H_2O_2 .

Formación de biopelícula

Con la finalidad de evaluar los efectos de la Norepinefrina y epinefrina sobre la formación de biopelícula, se utilizaron placas de polietileno estériles de 96 pozos.

Se realizaron precultivos de las 2 cepas empleadas en tubos de 3 ml de medio TSB incubadas a 37°C, posteriormente fueron ajustadas a una D.O de 1.0 a 600 nm. La formación de biopelículas se indujo en placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos, estos fueron llenados con 180 μ l de medio TSB e inoculados con 20 μ l de las 2 cepas previamente ajustadas. Como controles negativos se utilizaron medios sin inocular, cada cepa se analizó por triplicado, para los tratamientos se adiciono Norepinefrina y epinefrina respectivamente a concentraciones de 10 μ M - 50 μ M.

La placa fue incubada a 39°C durante 24 horas, posteriormente el medio fue retirado de los pozos, a continuación, la biopelícula se fijó con 200 μ l de metanol por 15 minutos a temperatura ambiente. Se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la evaporación total del metanol, posteriormente se realizó la tinción de cada pozo con 150 μ l de cristal violeta Huesker's al 1% por 15 minutos. Se recuperó el colorante y la placa se lavó con agua corriente para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente se añadieron 150 μ l de

acético glacial al 30%, se dejó incubar la placa con esta solución durante 30 minutos, para recuperar el colorante absorbido por las células.

El colorante recuperado se colocó en una caja nueva de microtitulación, las muestras fueron diluidas 1:5 con ácido acético glacial al 30%, y la densidad óptica determinada medida en un lector de placas a 630 nm (Fredheim *et al.*, 2009).

Resultados

Cinética de crecimiento

El crecimiento de la cepa *G. anatis* 12656-12 fue incrementado cuando el medio estuvo adicionado con 10, 40 o 50 μM de epinefrina (Figura 2) y con 20, 30, 40 o 50 de norepinefrina (Figura 3). Con respecto a la cepa *G. anatis* F-149^T su crecimiento fue incrementado cuando estuvo adicionado con 10 μM de epinefrina (Figura 4), cuando estuvo en presencia con norepinefrina no se observaron diferencias en el crecimiento (Figura 5).

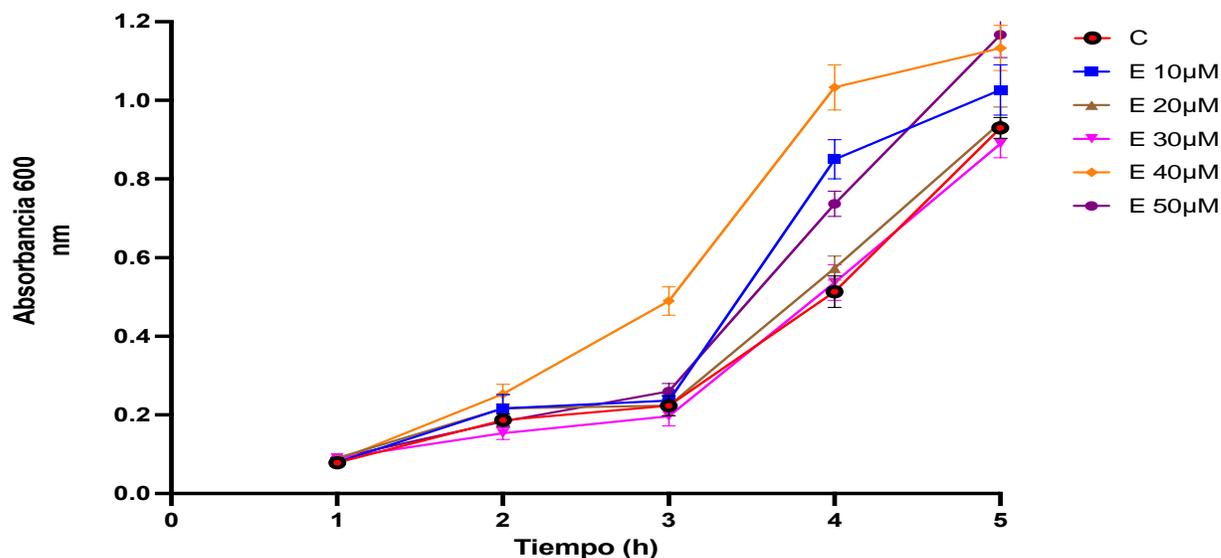


Figura 2. Cinética de crecimiento de la cepa *G. anatis* 12656-12 en medio TSB, sin adiciones (control) o con epinefrina 10, 20, 30, 40, o 50 μM .

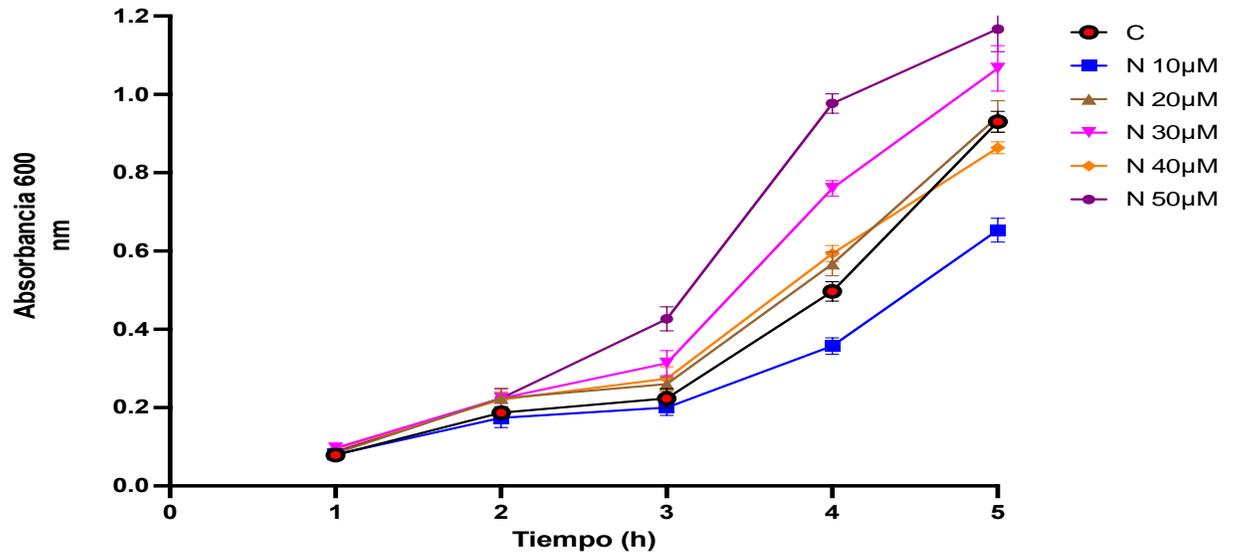


Figura 3. Cinética de crecimiento de la cepa *G. anatis* 12656-12 en medio TSB, sin adiciones (control) o con norepinefrina 10, 20, 30, 40, o 50µM.

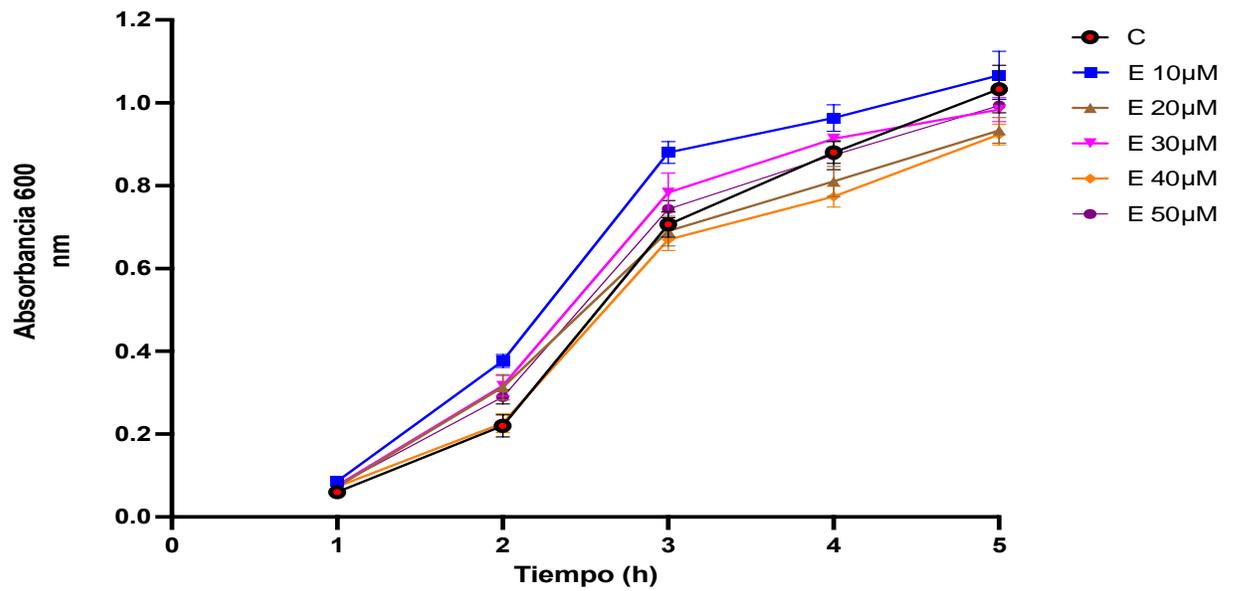


Figura 4. Cinética de crecimiento de la cepa *G. anatis* F-149^T en medio TSB, sin adiciones (control) o con epinefrina 10, 20, 30, 40, o 50µM.

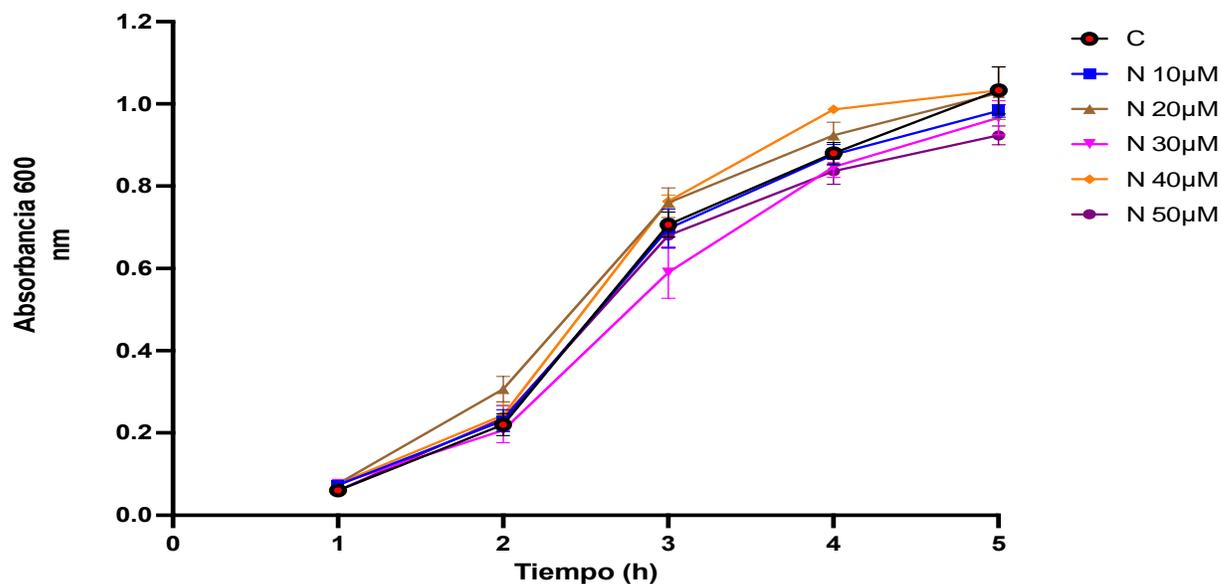


Figura 5. Cinética de crecimiento de la cepa *G. anatis* F-149^T, en medio TSB, sin adiciones (control) o con norepinefrina 10, 20, 30, 40, o 50µM.

Perfil de proteínas

En concentraciones de 10 y 20 µM de epinefrina se observó una disminución de la expresión de bandas de 15, 16 y 25 kDa, y a 40 µM en bandas de 55 y 60 kDa, por el contrario, se observó un incremento en bandas de 17, 21, 25, 26 y 38 kDa cuando se usó 30, 40 o 50 µM de epinefrina (Figura 6A).

Norepinefrina a concentraciones de 10 y 20 µM inducen incremento en la expresión de bandas de 23, 28 y 71 kDa, a concentraciones de 30,40 o 50 µM de una banda de 21 kDa. Por el contrario, estas últimas concentraciones provocaron una disminución de bandas de proteína de 16, 21, 26,31 y 71 kDa (Figura 6B).

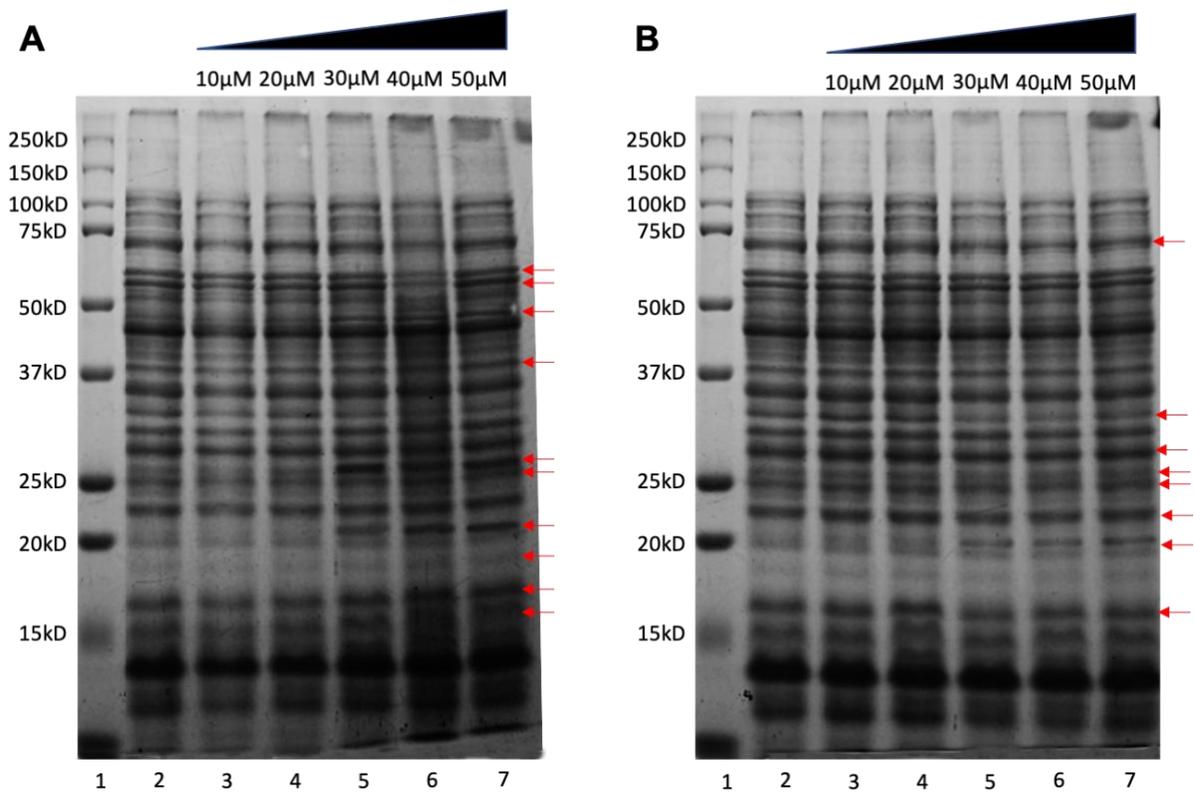


Figura 6. Patrón de proteínas de *G. anatis* 12656-12 en gel SDS-PAGE al 12 %, en presencia de catecolaminas, (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y (7) con 50 μ M de epinefrina (A) o norepinefrina (B). Las flechas indican los cambios observados en los patrones de proteínas.

A pesar de que las catecolaminas no afectaron el crecimiento de la cepa F-149^T, estas produjeron diferentes cambios en los patrones de proteínas de extractos totales, dependiendo de la concentración de hormona adicionada (Figuras 7A y B) (Tabla 2).

Peso molecular	Concentración Epinefrina	Efecto
250 kDa	10-20µM	Disminución
150 kDa	10-20 µM	Disminución
75 kDa	10-20 µM	Disminución
33 kDa	30-50 µM	Aparición
25 kDa	30-50 µM	Incremento
21 kDa	30-50 µM	Incremento

Peso molecular	Concentración Norepinefrina	Efecto
250 kDa	10-20µM	Disminución
150 kDa	30 µM	Disminución
75 kDa	10 µM	Disminución
43 kDa	30-50 µM	Ausencia
35 kDa	30-50 µM	Disminución
33 kDa	30,40 µM	Disminución
32 kDa	10-30 µM	Incremento
31 kDa	10,20 µM	Incremento
20 kDa	10, 30-50 µM	Incremento

Tabla 2. Expresión diferencial de proteínas (extractos totales) de *G. anatis* F-149^T.

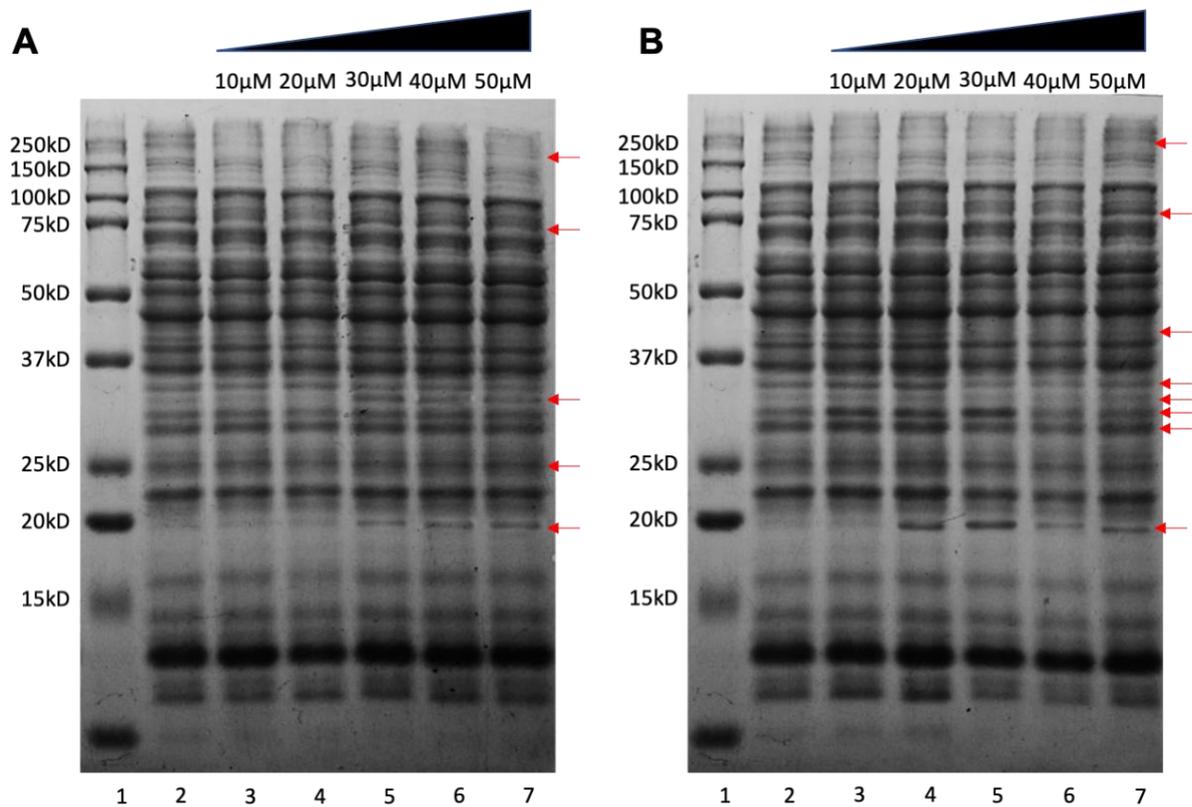


Figura 7. Patrón de proteínas de *G. anatis* F-149^T en gel SDS-PAGE al 12%, en presencia de catecolaminas, (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μM, (4) 20 μM, (5) 30 μM, (6) 40 μM y (7) con 50 μM de epinefrina (A) o norepinefrina (B). Las flechas indican los cambios observados en los patrones de proteínas.

Adhesinas.

Con la finalidad de determinar si la adición de catecolaminas a los cultivos de *G. anatis* promovía una mayor expresión de proteínas de tipo adhesinas, las muestras obtenidas como probables adhesinas fueron separadas por electroforesis en geles SDS-PAGE al 12% para visualizar los patrones de proteínas.

En la cepa 12656-12, la adición de epinefrina en todas las concentraciones evaluadas produjo cambios en los patrones de proteínas tipo adhesinas, observándose un incremento en la expresión de bandas de aproximadamente 60 y 70 kDa (Figura 8A). A 30 μM se incrementaron las bandas de 13 y 43 kDa y a 40 y 50 μM las de 13, 28 y 34 kDa (Figura 8A).

En el caso de norepinefrina la concentración de 10 μM no presentó cambios con respecto al control. Con 20 μM de norepinefrina se observó un incremento en la expresión de bandas de 60 y 70 kDa; de 14, 15, 24, 30, 34, 43, 60, 70 kDa con 30 μM y de 11, 14, 24 kDa con 40 y 50 μM (Figura 8B).

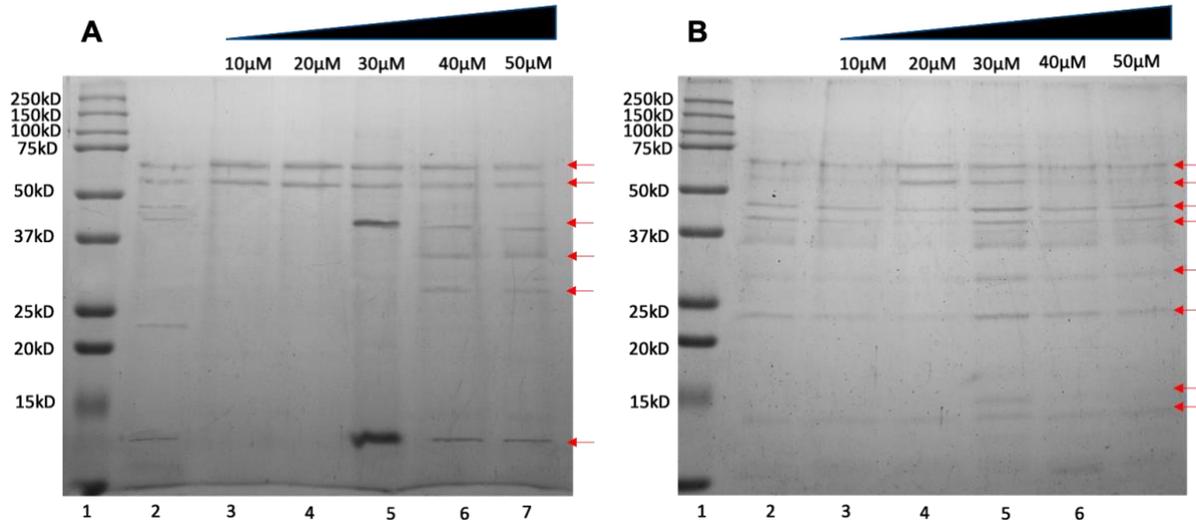


Figura 8. Patrón de proteínas de posibles adhesinas de *G. anatis* 12656-12 en gel SDS-PAGE al 12 %, en presencia de catecolaminas, (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μM , (4) 20 μM , (5) 30 μM , (6) 40 μM y (7) con 50 μM de epinefrina (A) o norepinefrina (B). Las flechas indican los cambios observados en los patrones de proteínas.

La epinefrina a concentraciones de 20 a 50 μM indujo una disminución de bandas a 37 y 40 kDa en la cepa F-149^T, pero incrementó la banda de 35 kDa con concentraciones de 40 y 50 μM (Figura 9A).

En el caso de norepinefrina se presentaron cambios en todas las concentraciones evaluadas aumentando la expresión de bandas a 14, 24 y 37 kDa (Figura 9B).

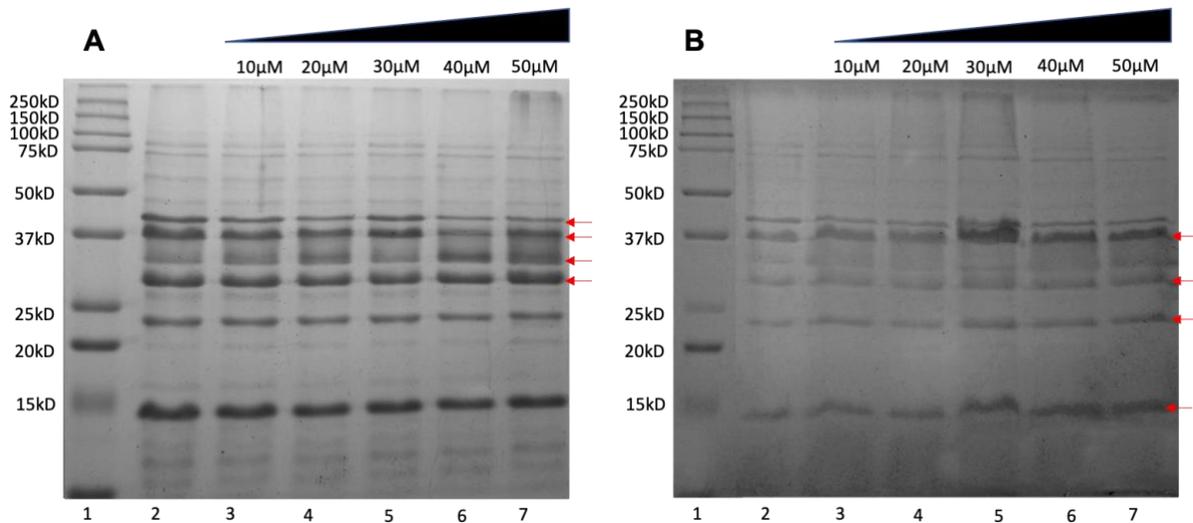


Figura 9. Patrón de proteínas de posibles adhesinas de *G. anatis* F-149^T en gel SDS-PAGE al 12 %, en presencia de catecolaminas, (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y (7) con 50 μ M de epinefrina (A) o norepinefrina (B). Las flechas indican los cambios observados en los patrones de proteínas.

Actividad proteolítica.

Para determinar si la presencia de catecolaminas inducía cambios en la actividad proteolítica expresada por las cepas de *G. anatis*, las muestras de proteínas secretadas, fueron separadas por electroforesis en zimograma con gelatina porcina al 1%.

En muestras de proteínas secretadas por la cepa 12656-12, se observó una disminución de la actividad proteolítica en todas las concentraciones de epinefrina evaluadas con respecto al control sin hormona (Fig 10A). Las bandas principales de 73 o 50 kDa no se observan al usar 20 o 30 μ M , respectivamente, o concentraciones mayores (Figura 10A).

Con el uso de norepinefrina, las mismas bandas: 73 y 50 kDa se observan con más actividad a concentraciones de 10, 40 o 50 μ M, con concentraciones de 20 o 30 μ M únicamente se observó la actividad de 50 kDa (Figura 10B).

En muestras de la cepa F-149^T, la adición de 10 o 40 μ M de epinefrina indujeron incremento de la actividad proteolítica a 50 kDa (Figura 11A), este incremento fue aún más evidente con 30 μ M de norepinefrina, a 40 o 50 μ M de norepinefrina no se apreció actividad proteolítica (Figura 11B).

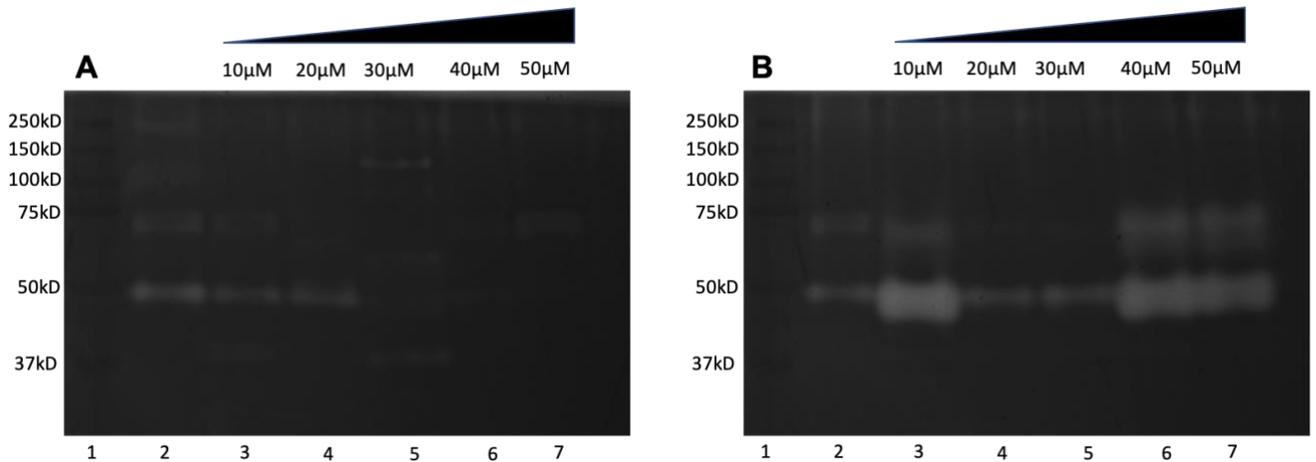


Figura 10. Zimograma 12% con gelatina porcina 1% de proteínas secretadas por *G. anatis* 12656-12, en presencia de catecolaminas (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y (7) con 50 μ M de epinefrina (A) o norepinefrina (B).

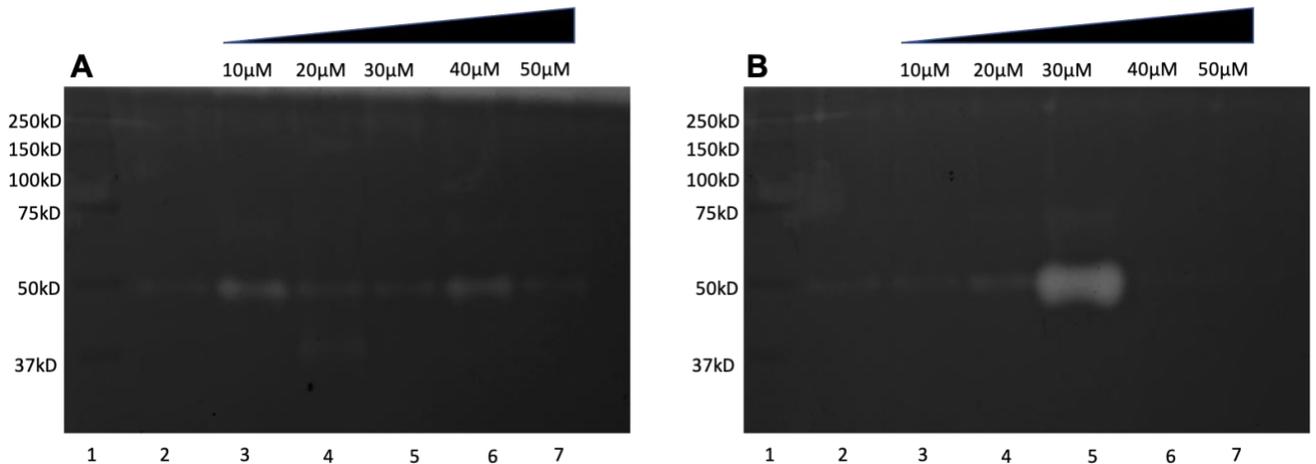


Figura 11. Zimograma 12% con gelatina porcina 1% de proteínas secretadas por *G. anatis* F-149^T, en presencia de catecolaminas (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y (7) con 50 μ M de epinefrina (A) o norepinefrina (B).

Inmunoreconocimiento.

Con el fin de determinar si los cambios en patrones de proteína también correspondían con proteínas inmunogénicas, probables factores de virulencia, se realizó un inmunoreconocimiento con suero de aves infectadas con *G. anatis*.

Para el caso de muestras de la cepa 12656-12, no se observaron cambios con 10 μ M de epinefrina, pero las demás concentraciones, indujeron incrementos en la intensidad de las bandas reconocidas con respecto al control (Figura 12A) (Tabla 3).

Con norepinefrina en concentraciones de 10 o 20 μM hubo aumento en el reconocimiento de bandas de 21,17 y 16 kDa. En concentraciones de 30, 40 y 50 μM , el reconocimiento disminuyó en las bandas de 47, 55, 75 y 100 kDa (Figura 12B).

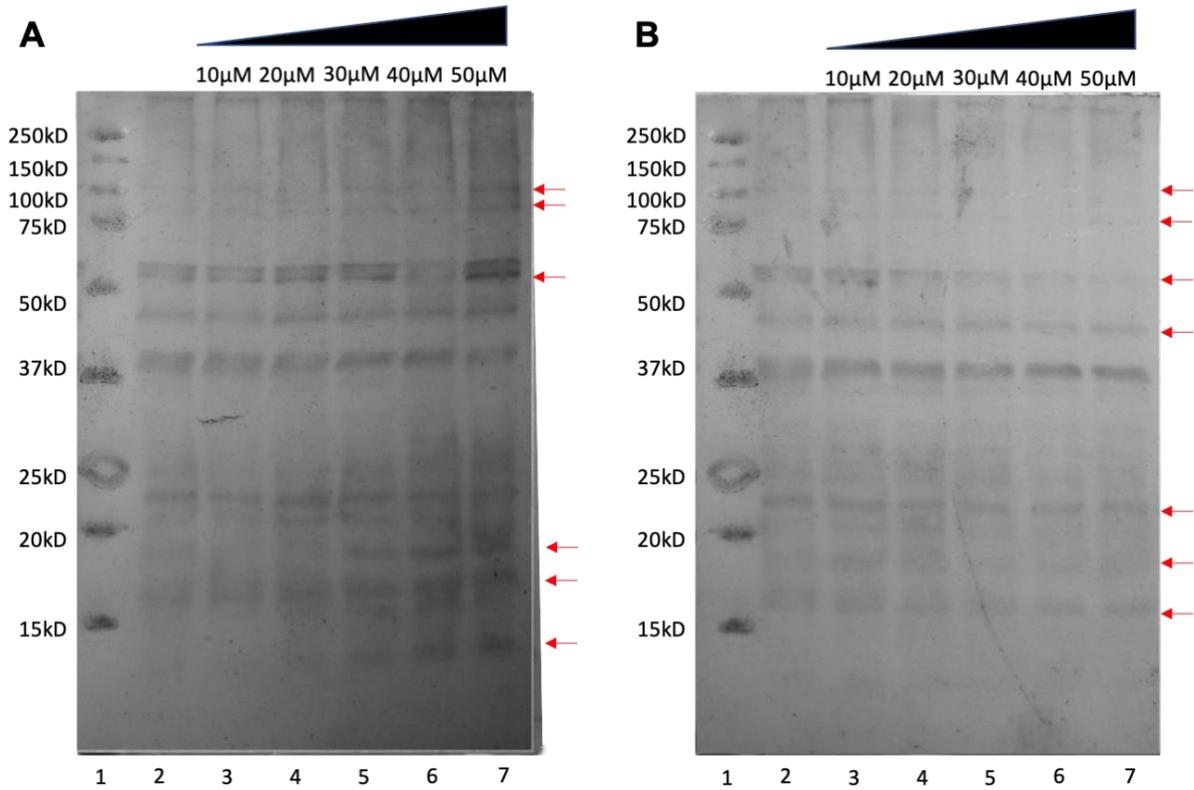


Figura 12. Inmuno reconocimiento de proteínas de extractos totales de *G. anatis* 12656-12, en presencia de catecolaminas, con suero de aves infectadas, (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μM , (4) 20 μM , (5) 30 μM , (6) 40 μM y (7) con 50 μM de epinefrina (A) o norepinefrina (B). Las flechas indican los cambios observados en los patrones de proteínas.

Peso molecular	Concentración Epinefrina	Efecto
100 kDa	50 μ M	Incremento
80 kDa	50 μ M	Incremento
60 kDa	20,30,50 μ M	Incremento
55 kDa	20,30,50 μ M	Incremento
46 kDa	30 μ M	Incremento
21 kDa	20-40 μ M	Incremento
17 kDa	30-50 μ M	Incremento
16 kDa	30-50 μ M	Incremento
13 kDa	20-50 μ M	Incremento

Tabla 3. Inmuno reconocimietno de proteínas de extractos totales de *G. anatis* 12656-12 en presencia de epinefrina.

Para muestras de la cepa F-149^T, con 30 y 40 μ M de epinefrina, se observó un reconocimiento más intenso para las bandas de 75 y 100 kDa (Figura 13A), pero menos intenso en bandas de 19, 75 y 100 kDa cuando se usó norepinefrina a las mismas concentraciones (Figura 13B).

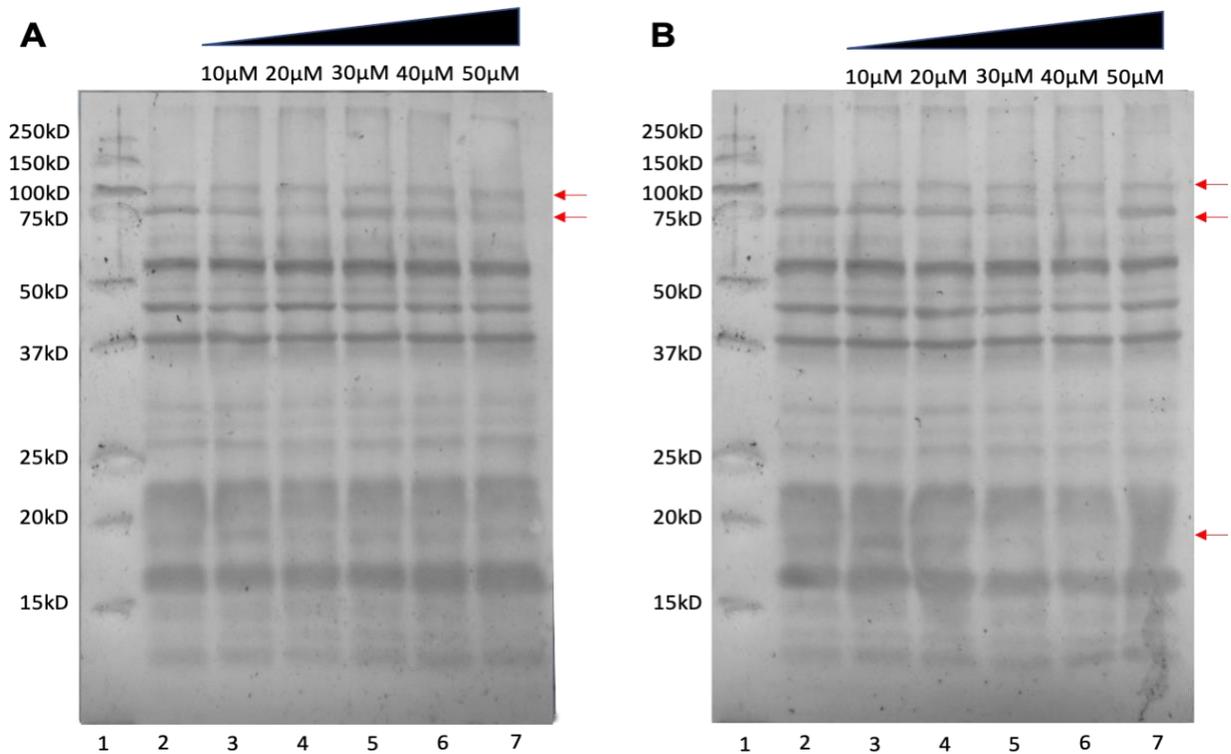


Figura 13. Inmuno reconocimiento de proteínas de extractos totales de *G. anatis* F-149^T en presencia de catecolaminas, con suero de aves infectadas, (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y (7) con 50 μ M de epinefrina (A) o norepinefrina (B). Las flechas indican los cambios observados en los patrones de proteínas.

Para determinar si las catecolaminas inducen cambios en la expresión de probables adhesinas, se realizó la técnica de Far western blot usando fibrinógeno de cerdo biotinilado. El fibrinógeno puede ser utilizado como “blanco” de adhesinas bacterianas.

Todas las muestras de probables adhesinas de la cepa 12656-12, en presencia de epinefrina o norepinefrina, interaccionan con fibrinógeno con bandas de 60 y 70 kDa; bandas de 37 y 13 kDa se observan con concentraciones de 30 a 50 μ M y una banda de 37 kDa interacciona con fibrinógeno a 30 μ M (Figura 14A y B).

Para muestras de la cepa F-149^T en presencia de 20 a 50 μ M de epinefrina, se observa un incremento en la interacción con fibrinógeno en bandas de 24 y 19 kDa (Figura 15A); mientras que con norepinefrina a 10, 30 o 40 μ M se aprecia este incremento en bandas de 40 y 37 kDa (Figura 15B y A).

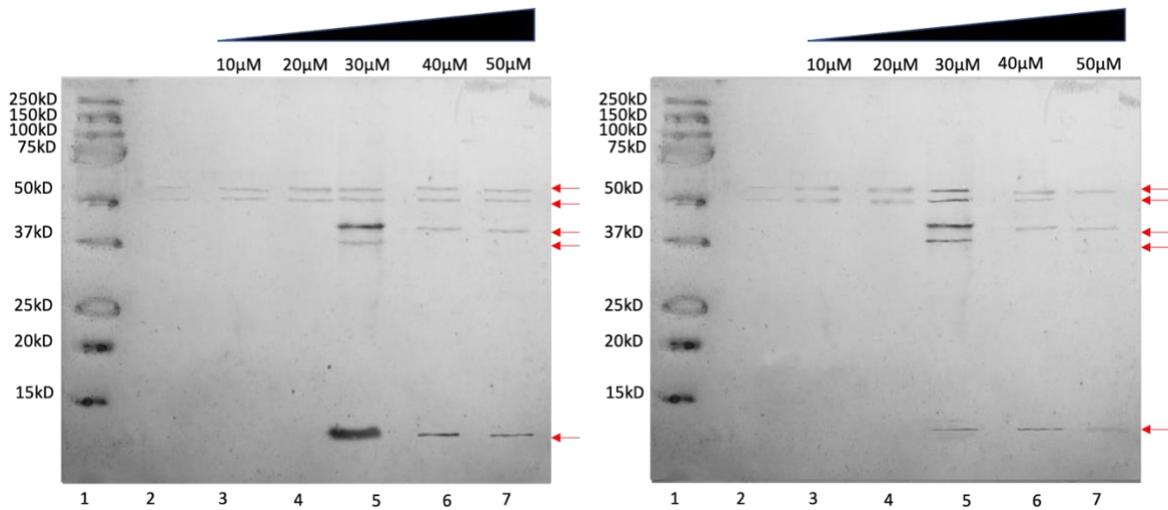


Figura 14. Far western blot de probables adhesinas de *G. anatis* 12656-12, en presencia de catecolaminas, con fibrinógeno de cerdo biotinilado (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y (7) con 50 μ M de epinefrina (A) o norepinefrina (B). Las flechas indican los cambios observados en los patrones de proteínas.

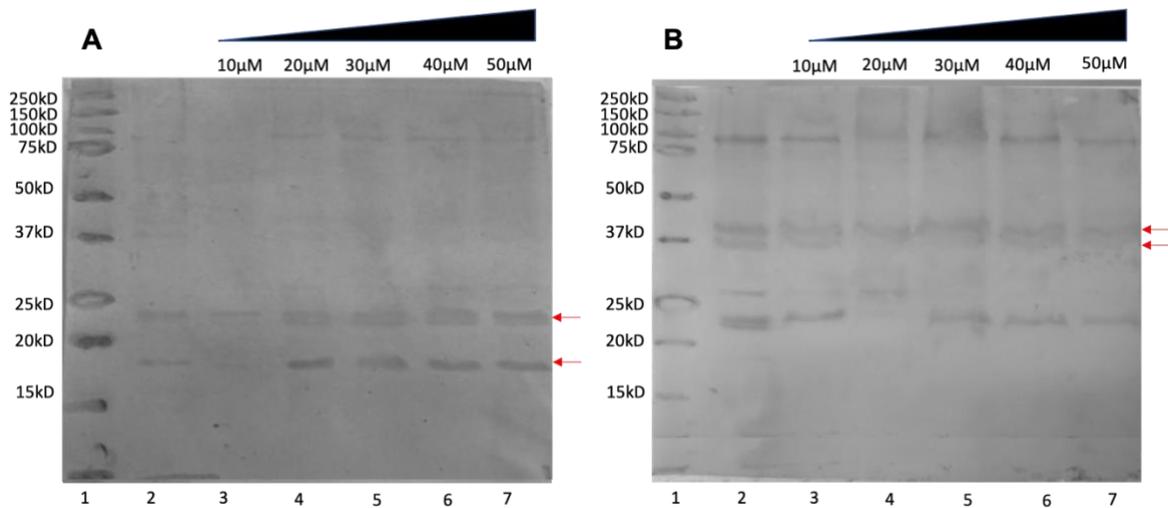


Figura 15. Far western blot de probables adhesinas de *G. anatis* F-149^T, en presencia de catecolaminas, con fibrinógeno de cerdo biotinilado (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5) 30 μ M, (6) 40 μ M y (7) con 50 μ M de epinefrina (A) o norepinefrina (B). Las flechas indican los cambios observados en los patrones de proteínas.

Producción de proteínas amiloide-like

Para determinar si la presencia de catecolaminas induce un cambio en la cantidad de proteínas amiloide-like de *G. anatis*, ambas cepas fueron crecidas en presencia del colorante RC y hormonas, las proteínas amiloides pueden identificarse por su capacidad de interaccionar con el colorante rojo Congo (RC).

A concentraciones de 10, 30, 40 o 50 μM de epinefrina, la cepa 12656-12 se tuvo una mayor unión de RC (Figura 16A). Con norepinefrina, todas las concentraciones usadas favorecieron la unión de RC, lo cual indica que hubo mayor producción de proteínas amiloides (Figura 16B).

La cepa F-149^T presentó una mayor capacidad de unión de RC con 10 o 30 μM de epinefrina (Figura 17A), pero con norepinefrina a concentraciones de 20 a 50 μM se indujo una disminución en su unión (Figura 17B).

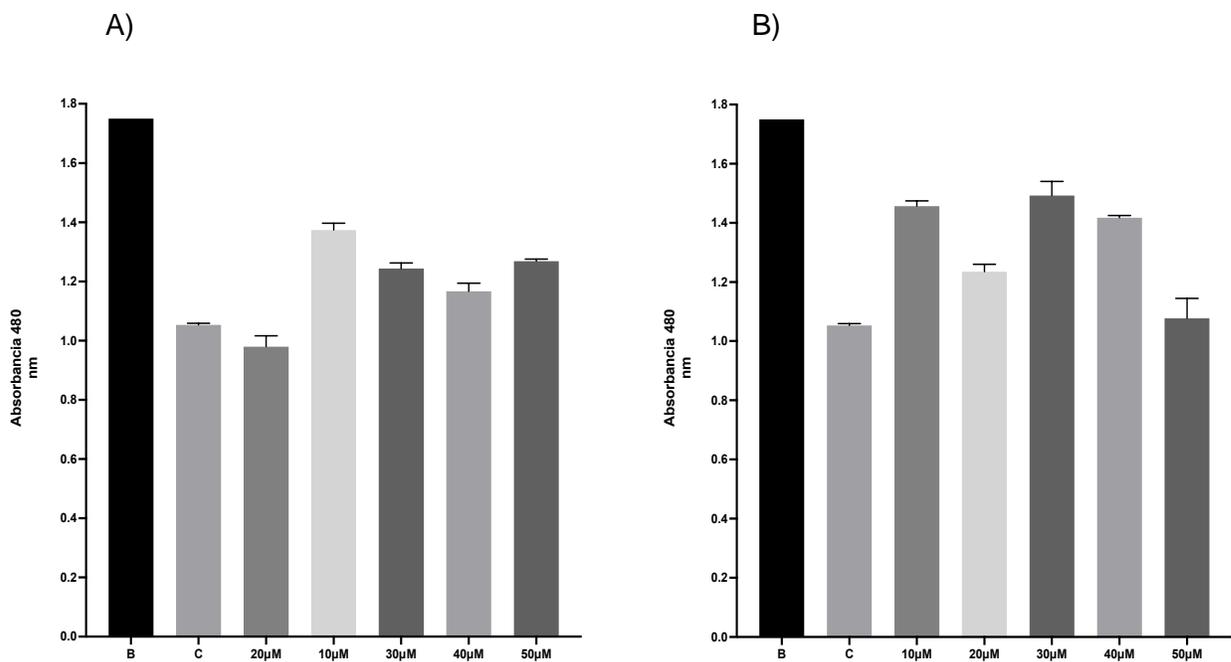


Figura 16. Unión de Rojo Congo por *G. anatis* 12656-12 a 39°C en presencia de concentraciones crecientes de epinefrina (A) y norepinefrina (B).

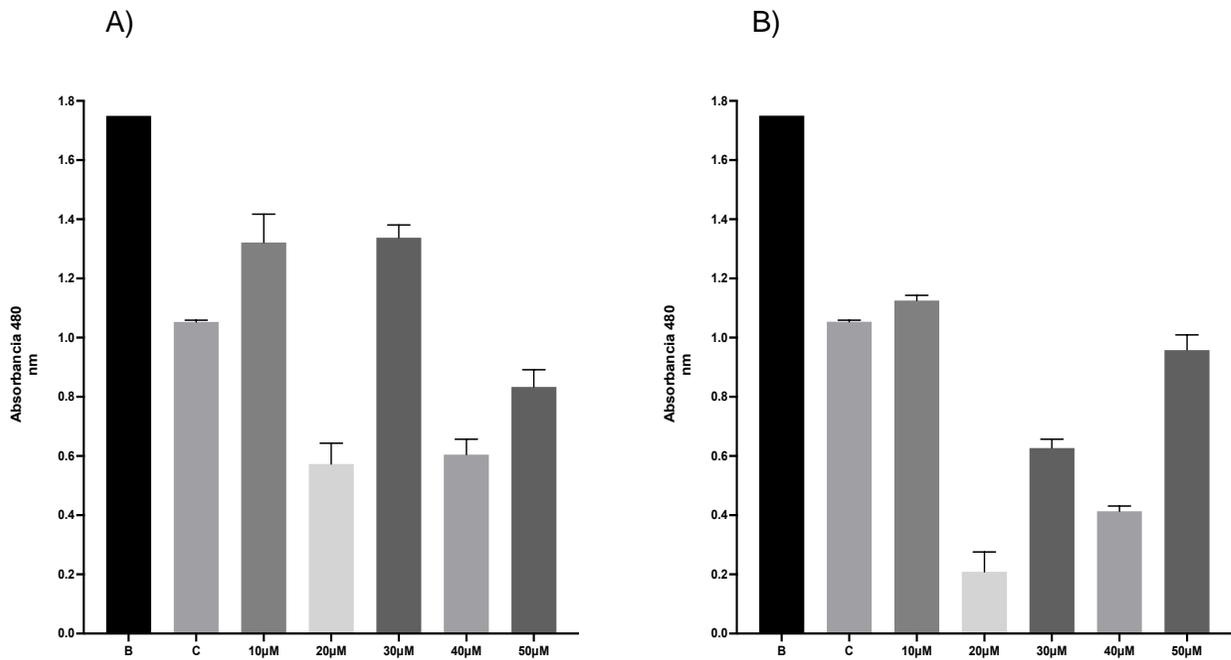


Figura 17. Unión de Rojo Congo por *G. anatis* F-149^T a 39°C en presencia de concentraciones crecientes de epinefrina (A) y norepinefrina (B).

Habiendo corroborado la capacidad de *G. anatis* de producir proteínas amiloides-like, muestras de proteínas secretadas fueron incubadas en baño María con ácido fórmico; las proteínas tipo amiloide resisten la digestión ácida. Una vez digeridas, las muestras fueron separadas por electroforesis en gel SDS-PAGE al 12 %, observándose una proteína de aproximadamente 43 kDa que retiene el colorante RC (Figura 18A y B) (Figura 19A y B).

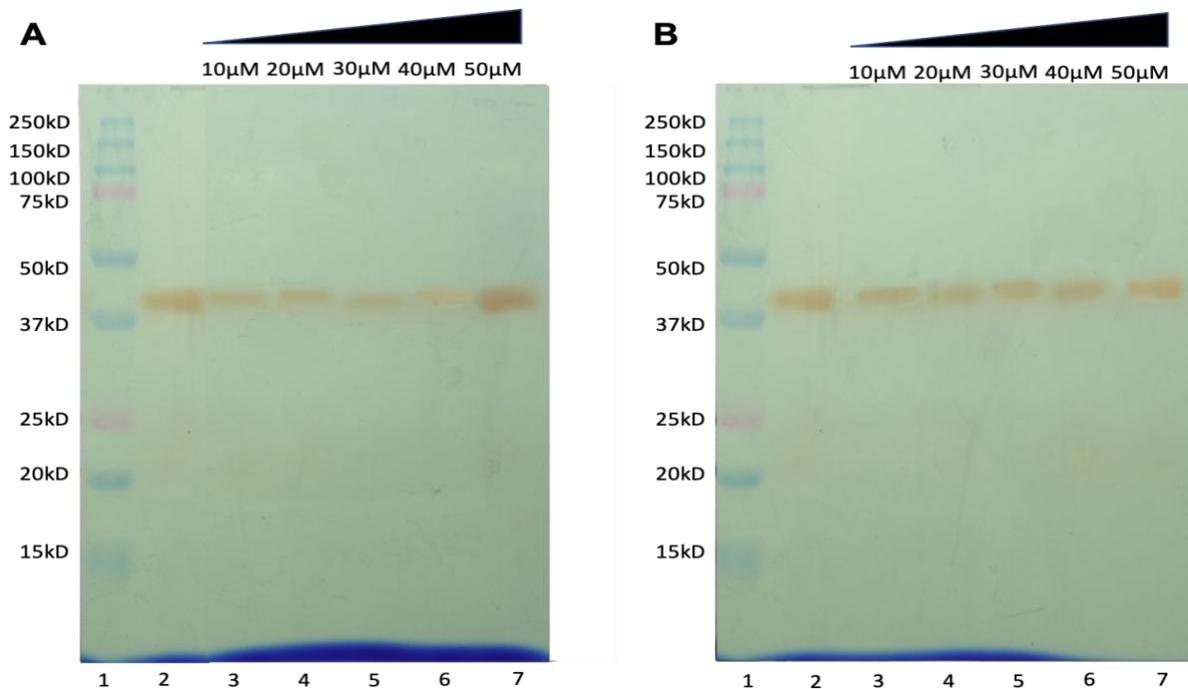


Figura 18. Proteínas purificadas tipo amiloide de *G. anatis* 12656-12 en gel SDS-PAGE al 12% sin pintar con azul de coomassie, (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5)30 μ M, (6) 40 μ M y (7) con 50 μ M de epinefrina (A) o norepinefrina (B).

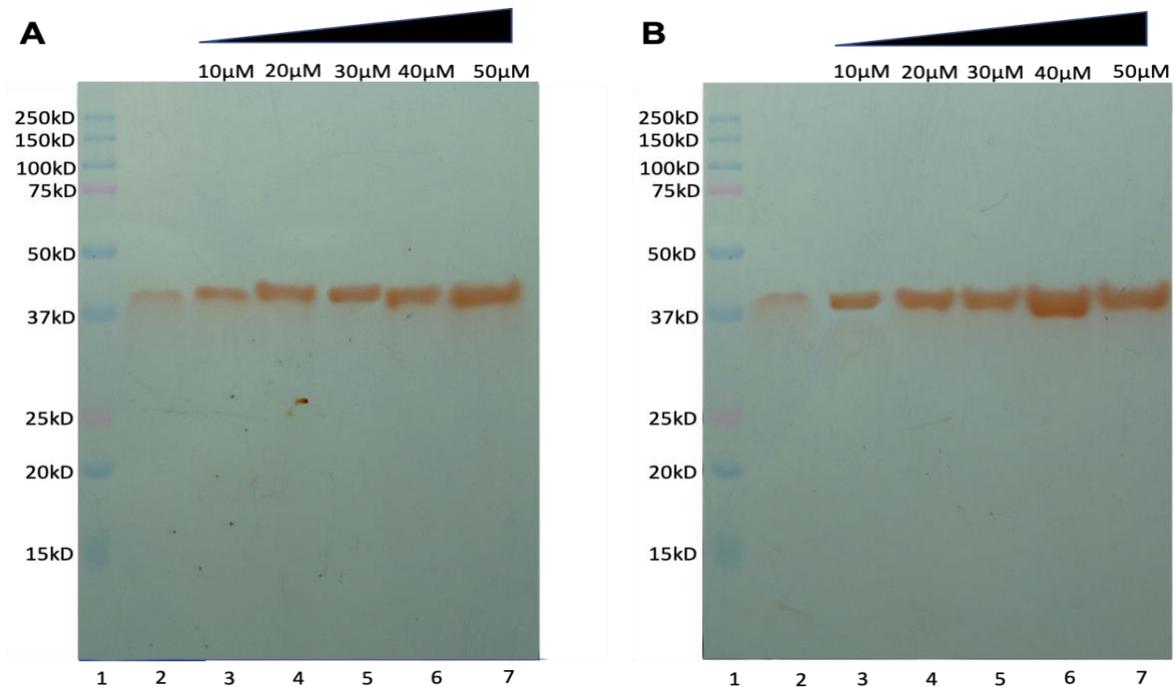


Figura 19. Proteínas purificadas tipo amiloide de *G. anatis* F-149^T en gel SDS-PAGE al 12%, sin pintar con azul de coomassie, (1) MPM, (2) muestra control, (3) 10 μ M, (4) 20 μ M, (5)30 μ M, (6) 40 μ M y (7) con 50 μ M de epinefrina (A) o norepinefrina (B).

Formación de biopelícula.

De manera similar a cómo se observaron cambios por la adición de catecolaminas, la presencia de estas indujo una disminución en la producción de biopelícula en *G. anatis*, en ambas cepas, tanto con epinefrina como con norepinefrina, a todas las concentraciones probadas, excepto en la cepa 12656-12 con 20 μM de norepinefrina, en que se observó un incremento (Figura 20A y B) (Figura 21A y B).

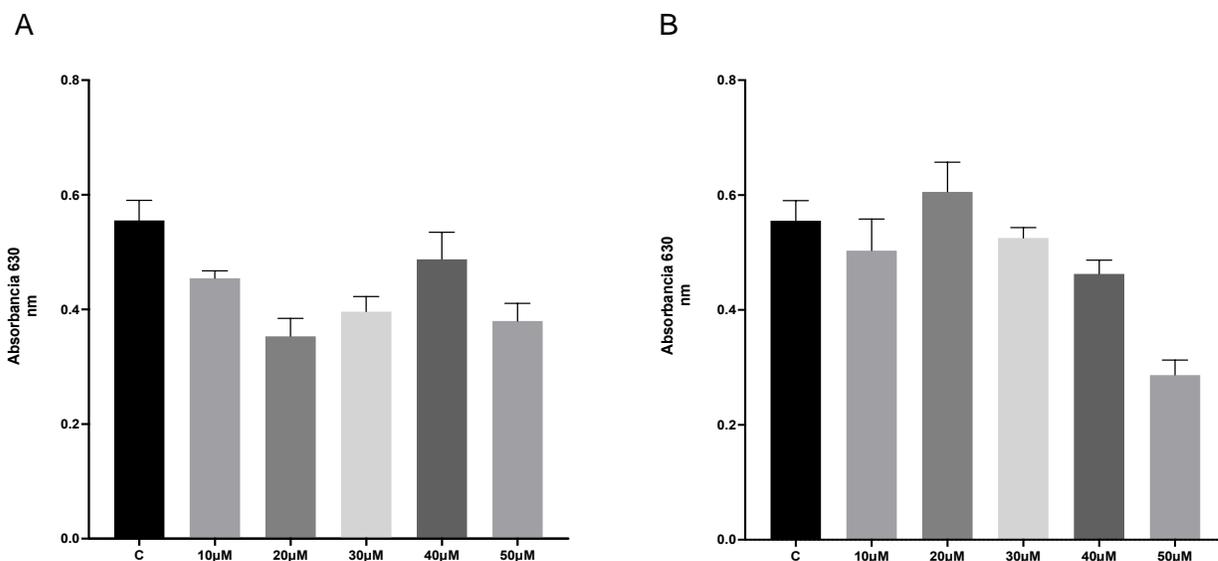


Figura 20. Formación de biopelícula de *G. anatis* 12656-12, en presencia de catecolaminas. Sin adiciones (control) o con 10, 20, 30, 40, o 50 μM de epinefrina (A) o norepinefrina (B).

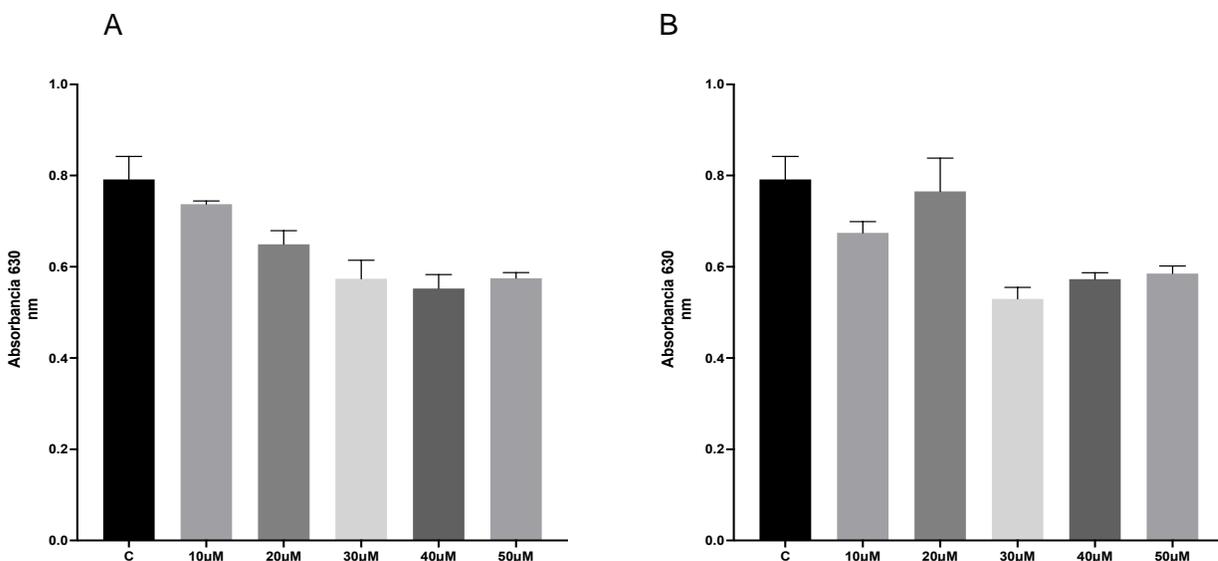


Figura 21. Formación de biopelícula de *G. anatis* F-149^T en presencia de catecolaminas. Sin adiciones (control) o con 10, 20, 30, 40, o 50 μM de epinefrina (A) o norepinefrina (B).

Discusión

Las enfermedades en las aves de corral, especialmente las infecciones causadas por la microbiota, no sólo afectan gravemente al bienestar de los animales, sino que también son la causa de pérdidas devastadoras en la industria avícola. Los pollos representan alrededor del 93% de la población mundial de aves de corral. A pesar del enorme crecimiento del sector avícola, la producción de aves de corral sigue viéndose obstaculizada por numerosos factores, entre los que destacan las enfermedades, que causan una elevada morbilidad y mortalidad (El-Adawy *et al.*, 2018). La septicemia es una importante causa de muerte en las aves de corral, especialmente en los pollos, y causa importantes pérdidas económicas a la industria avícola de todo el mundo. Es bien sabido que varios patógenos bacterianos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Avibacterium paragallinarum*, *Pasteurella multocida* y *G. anatis* están involucrados en la causa de la septicemia (Ewers *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2022 Jones *et al.*, 2013).

Varios informes de casos clínicos en aves y estudios experimentales en pollos revelaron que *G. anatis* es un importante patógeno bacteriano, es un cocobacilo, Gram negativo, no móvil, encapsulado, anaerobio facultativo, que pertenece a la familia *Pasteurellaceae*.

Gallibacterium anatis produce gallibacteriosis, una enfermedad sistémica que afecta principalmente al tracto reproductivo generando lesiones que afecta severamente a las gallinas ponedoras, provocando la baja producción de huevos (Neubauer *et al.*, 2009). Los animales con Gallibacteriosis presentan: cara hinchada, secreción nasal, fiebre, postración, anorexia, dificultad respiratoria, crestas y barbillas cianóticas, diarrea, deshidratación, disminución en la postura (gallinas) y mortalidad variable. En la necropsia se observa congestión en senos infraorbitarios y tráquea, hepatomegalia con puntos hemorrágicos, esplenomegalia, aerosaculitis, peritonitis y en otros casos, hemorragia en miocardio, inflamación renal, folículos deformes (gallinas), salpingitis, atrofia ovárica, ruptura folicular (Christensen *et al.*, 2003; Bojesen *et al.*, 2004).

Las bacterias poseen mecanismos de patogenicidad específicos que se presentan al superar las defensas de un hospedero. Los factores de virulencia bacterianos permiten que un huésped se replique y se disemine dentro de un hospedero, en parte subvirtiendo o eludiendo las defensas (Cross., 2008).

La detección de quórum sensing es un mecanismo crucial de señalización entre células bacterianas, que permite a las bacterias responder a los autoinductores y, por tanto,

cambiar su expresión génica (Clarke *et al.*, 2006). En varias especies bacterianas, como *E. coli* enterohemorrágica, la quinasa sensora de quórum QseC se ha asociado a cambios en la motilidad bacteriana, así como a la activación de genes de virulencia (Moreira & Sperandio., 2010). La detección de QS en las bacterias es la principal responsable de expresión de factores de virulencia como las moléculas de adhesión, las toxinas, proteasas y formación de biopelícula (Rutherford & Bassler., 2012).

Los estudios de endocrinología microbiana han revelado que las catecolaminas no sólo desempeñan un papel esencial en el estrés y las respuestas inmunitarias, sino que también desencadenan respuestas patógenas. Uno de los efectos de las catecolaminas en las bacterias es estimular el crecimiento al facilitar la remoción del hierro de las proteínas de unión al hierro del huésped (Freestone *et al.*, 2000; Anderson & Armstrong., 2008).

La expresión de otros factores de virulencia bacteriana también se ve afectada por las catecolaminas. Por ejemplo, en *E. coli*, las catecolaminas pueden aumentar la adhesión a las células del huésped mediante la regulación al alza de los genes asociados a la adhesión (Lyet *et al.*., 1997) las catecolaminas también pueden afectar a la quimiotaxis y a la colonización de las células Hela y aumentar la producción de toxina Shiga (Bansal *et al.*, 2007; Voigt *et al.*, 2006).

Previamente se demostró que en *G. anatis* se ve favorecido su crecimiento por la adición de E o NE 50 uM (Martínez Gonzáles., 2013). En la cepa 12656-12 la adición epinefrina o norepinefrina tuvo como resultado un incremento en la densidad poblacional a concentraciones menores de hormonas, esto concuerda con lo reportado por Belay & Sonnenfeld en el 2002 o con Freestone y colaboradores en 2002 quienes reportaron que las catecolaminas como epinefrina y norepinefrina favorecen el crecimiento en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. Sin embargo, el crecimiento de la cepa F-149^T no fue afectado significativamente, de manera semejante a como fue reportado por Belay y colaboradores en 2003 cuando evaluaron el efecto de las catecolaminas en *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteriodes fragilis*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter Sp*, y *Salmonella choleraesuis*, donde observaron que la suplementación de los cultivos bacterianos con norepinefrina o epinefrina no incrementan el crecimiento de estas bacterias.

Un mecanismo por el cual las catecolaminas aumentan el crecimiento bacteriano es aumentar la disponibilidad de hierro, facilitando su remoción de la transferrina y, por tanto, ponerlo a disposición de las bacterias. Las catecolaminas forman complejos con la transferrina, debilitando así la alta afinidad con el hierro férrico (Fe^{3+}) hasta el punto de perder hierro. Hay que tener en cuenta que las hormonas catecolaminas contienen una fracción de catecolato que también está presente en muchos sideróforos (Lyet *et al.* 2011).

La presencia de epinefrina y norepinefrina en todas las concentraciones evaluadas produjo cambios en los patrones de proteínas totales de ambas cepas de *G. anatis*, se precisa seguir estudiando estos cambios en los patrones de proteínas y tratar de identificar estas proteínas expresadas diferencialmente.

La matriz extracelular es la parte proteica acelular de los tejidos animales, la matriz extracelular participa en la construcción de andamios estructurales, la regulación de los procesos fisiológicos, la señalización celular, la migración y el transporte de solutos a través de los tejidos corporales y las barreras celulares (Hynes, 2009). Los componentes de la matriz extracelular incluyen diferentes proteínas, entre ellas, el colágeno, la laminina, la elastina y fibronectina están normalmente presentes y constituyen como un objetivo para la adhesión de diferentes microorganismos. Se ha demostrado que varios patógenos bacterianos, se adhieren a las moléculas de la matriz extracelular o a componentes de la sangre, como el fibrinógeno (Sela *et al.*, 1993; McNab *et al.*, 1996; Beg *et al.*, 2002; Montes-García *et al.*, 2018).

Para evaluar si las catecolaminas promovieron factores de virulencia, entre las cuales se encuentran las adhesinas, que son proteínas con capacidad de unión a fibrinógeno, se realizó la obtención de posibles adhesinas de ambas cepas de *G. anatis*, las cuales fueron sometidas a un ensayo de interacción proteína-fibrinógeno observándose una interacción positiva en bandas de 65 y 60 kDa para la cepa 12656-12 y para la cepa F-149^T en bandas de 24 y 19 kDa, esto concuerda con resultados previos con miembros de familia *Pasteurellaceae* en específico *A. seminis* en la cual Montes-García y colaboradores 2018 identificaron dos proteínas de 25 y 40 kDa que funcionan como adhesinas, demostrando que ambas proteínas interactuaron con fibronectina y fibrinógeno.

En los zimogramas para la cepa 12656-12, se observa una disminución de la actividad proteolítica en todas las concentraciones de epinefrina y en norepinefrina a concentraciones de 20 o 30 μM .

En muestras de la cepa F-149^T, la adición de 10 o 40 μM de epinefrina induce incremento de la actividad proteolítica a 50 kDa, este incremento es aún más evidente con 30 μM de norepinefrina. Lanter & Davies en 2015 reportaron que *Propionibacterium acnes*, tras interactuar con norepinefrina libera proteasas y lipasas en gran medida, también inducen la dispersión de biopelícula.

Las proteínas amiloides son agregados proteicos muy ordenados con una morfología filamentosa no ramificada, que suele presentar una disposición helicoidal de hebras β empaquetadas ortogonalmente al eje largo de la fibra (Eisenberg & Sawaya., 2017).

Las fibrillas amiloides suelen presentar una "cremallera estérica" de cadenas laterales apiladas e interdigitadas que estabilizan e impulsan la oligomerización. Debido a esta forma tan ordenada y apretada, las fibras amiloides muestran una gran resistencia a la proteólisis y a la desnaturalización química y térmica (Greenwald & Riek., 2010; Sitaras *et al.*, 2011). La arquitectura amiloide cross- β también da lugar a propiedades tintóreas indicativas basadas en la unión y el ordenamiento de los colorantes rojo Congo y tioflavina T (Groenning., 2010).

El papel de los amiloides bacterianos en la virulencia es diverso, cuando actúan como estructuras adhesivas, es probable que lo hagan a través de una alta multivalencia de interacciones no específicas con superficies y polímeros bióticos y abióticos, más que a través de interacciones específicas de alta o media afinidad como se observa en la mayoría de las adhesinas bacterianas (Moonens & Remaut., 2017; Alteri *et al.*, 2007; Montes-Garcia *et al.*, 2018).

Como componente de la matriz extracelular en la biopelícula, pueden aumentar la capacidad de la bacteria productora para soportar condiciones ambientales cambiantes y desafiantes. Las fibras de Curli son amiloides producidos en las biopelículas de bacterias entéricas en el medio ambiente, así como durante las infecciones. La formación de biopelículas puede promover la persistencia en el huésped, así como facilitar la propagación al mejorar la supervivencia de un patógeno fuera del huésped (May & Okabe., 2008).

Se encontró que ambas cepas de *G. anatis* en presencia de epinefrina o norepinefrina hay presencia de una proteína de 43 kDa que retiene el colorante de rojo Congo, esto concuerda

con lo reportado por López-Ochoa y colaboradores en 2017 donde encontraron una proteína de 43 kDa que retiene rojo Congo en *G. anatis*, la cual fue identificada como EF-Tu. Es una de las proteínas más abundantes que se encuentran en las bacterias, la función principal y canónica de la EF-Tu es transportar los ARNt aminoacilados al ribosoma, pero también puede desempeñar otras funciones, muchas de las cuales incluyen importantes rasgos de virulencia, una de estas funciones es la de la adhesión en bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas (Harvey *et al.*, 2019).

Las catecolaminas indujeron una disminución en la cantidad de biopelícula formada en ambas cepas de *G. anatis*. Se ha descrito en diferentes microorganismos que las cepas de un mismo microorganismo pueden responder de manera diferente ante la presencia de catecolaminas.

Cambronel y colaboradores en 2020 evaluaron los efectos de la epinefrina y norepinefrina en 4 cepas de *Enterococcus faecalis*: MMH594, V583, Symbioflor 1 clon DSM 16431 y OB15. Se encontró que epinefrina modula la formación de biopelícula (biovolumen y grosor) en *E. faecalis*, norepinefrina tuvo menos efecto en la formación de biofilm de estas bacterias.

Cambronel y colaboradores en 2019 analizaron el efecto de la epinefrina en la motilidad, la adhesión, la formación de biopelículas y la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados demostraron que la epinefrina aumentó la adhesión y la formación de biopelículas.

G. anatis es un microorganismo patógeno oportunista que responde a los cambios ambientales y en particular a las diferencias en la concentración de catecolaminas. El incremento en la concentración de estas hormonas, además de disminuir la respuesta inmune de su hospedero, parece regular la expresión de sus factores de virulencia favoreciendo la expresión de su potencial patogénico.

Conclusiones

- La presencia de hormonas E o N favorece el crecimiento de la cepa de *G. anatis* 12656-12, pero no de la cepa F-149^T.
- Las hormonas E o N inducen cambios en los patrones de proteínas de ambas cepas de *G. anatis*.
- La presencia de hormonas E o N tiene efectos diversos en la actividad proteolítica de las cepas de *G. anatis*
- La presencia de hormonas E o N afectan la producción de proteínas amiloide-like en ambas cepas de *G. anatis*.
- La presencia de hormonas E o N tiene efectos adversos en la producción de biopelícula en ambas cepas de *G. anatis*.

Perspectivas

- Identificar alguna(s) de las proteína(s) expresadas diferencialmente por *G. anatis* al crecer en presencia de catecolaminas.
- Corroborar que las probables adhesinas participan en adhesión celular e identificarlas
- Identificar alguna(s) de las proteína(s) que participan en la dispersión de la biopelícula

Bibliografía

Alteri C.J., Xicohténcatl-Cortes J., Hess S., Caballero-Olín G., Girón J.A., Friedman R.L. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12):5145–5150.

Anderson, M. T., & Armstrong, S. K. (2008). Norepinephrine mediates acquisition of transferrin-iron in *Bordetella bronchiseptica*. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 3940-3947.

Bains, J. S., Cusulin, J. I. W., & Inoue, W. (2015). Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(7), pp.377-388.

Bansal, T., Englert, D., Lee, J., Hegde, M., Wood, T. K., & Jayaraman, A. (2007). Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157: H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infection and immunity*, 75(9), 4597-4607.

Beg, A. M., Jones, M. N., Miller-Torbert, T., & Holt, R. G. (2002). Binding of *Streptococcus mutans* to extracellular matrix molecules and fibrinogen. *Biochemical and biophysical research communications*, 298(1), 75-79.

Belay, T., & Sonnenfeld, G. (2002). Differential effects of catecholamines on in vitro growth of pathogenic bacteria. *Life sciences*, 71(4), 447-456.

Belay, T., Aviles, H., Vance, M., Fountain, K., & Sonnenfeld, G. (2003). Catecholamines and in vitro growth of pathogenic bacteria: enhancement of growth varies greatly among bacterial species. *Life sciences*, 73(12), 1527-1535.

Bisgaard, M. (1993). Ecology and significance of Pasteurellaceae in animals. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 279(1), 7-26.

Bisgaard, M., Korczak, B. M., Busse, H. J., Kuhnert, P., Bojesen, A. M., & Christensen, H. (2009). Classification of the taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard within *Gallibacterium* and description of *Gallibacterium melopsittaci* sp. nov., *Gallibacterium trehalosifermentans*

sp. nov. and *Gallibacterium salpingitidis* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(4), 735-744.

Bojesen, A., Juul, S., Birkebæk, N., & Gravholt, C. H. (2004). Increased mortality in Klinefelter syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(8), 3830-3834.

Cambronel, M., Nilly, F., Mesguida, O., Boukerb, A. M., Racine, P. J., Baccouri, O., & Zimmermann, K. (2020). Influence of Catecholamines (Epinephrine/Norepinephrine) on biofilm formation and adhesion in pathogenic and probiotic strains of *Enterococcus faecalis*. *Frontiers in microbiology*, 11, 1501.

Cambronel, M., Tortuel, D., Biaggini, K., Maillot, O., Taupin, L., Réhel, K., ... & Rodrigues, S. (2019). Epinephrine affects motility, and increases adhesion, biofilm and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* H103. *Scientific reports*, 9(1), 1-8.

Cárdenas-Perea, M. E., Cruz, O. R., Gándara-Ramírez, J. L., & Pérez-Hernández, M. A. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la "inteligencia" de las bacterias. *Elementos*, 94, 35-43.

Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and immunity*, 67(8), 3703-3713.

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. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(1), 275-287.

Clarke, M. B., Hughes, D. T., Zhu, C., Boedeker, E. C., & Sperandio, V. (2006). The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10420-10425.

Cross, A.S. (2008). What is a virulence factor? *Critical Care* 12 (6), 196.

Dayas, C. V., Buller, K. M., Crane, J. W., Xu, Y., & Day, T. A. (2001). Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *European Journal of Neuroscience*, 14(7), pp.1143-1152.

Eisenberg, D. S., & Sawaya, M. R. (2017). Structural studies of amyloid proteins at the molecular level. *Annual review of biochemistry*, 86, 69-95.

El-Adawy, H., Bocklisch, H., Neubauer, H., Hafez, H. M., & Hotzel, H. (2018). Identification, differentiation and antibiotic susceptibility of *Gallibacterium isolates* from diseased poultry. *Irish veterinary journal*, 71(1), 1-10.

Ewers, C., Janßen, T., Kießling, S., Philipp, H. C., & Wieler, L. H. (2004). Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary microbiology*, 104(1-2), 91-101.

Figueroa-Valenzuela C, Montes-García JF , Candelario Vazquez-Cruz C, Zenteno E and Negrete-Abascal E. *Mannheimia haemolytica* OmpH binds fibrinogen and fibronectin (manuscrito en preparación)

Fredheim, E. G. A., Klingenberg, C., Rohde, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flægstad, T., & Sollid, J. E. (2009). Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), 1172-1180.

Freestone, P. P., Lyte, M., Neal, C. P., Maggs, A. F., Haigh, R. D., & Williams, P. H. (2000). The mammalian neuroendocrine hormone norepinephrine supplies iron for bacterial growth in the presence of transferrin or lactoferrin. *Journal of bacteriology*, 182(21), 6091-6098.

Freestone, P. P., Williams, P. H., Haigh, R. D., Maggs, A. F., Neal, C. P., & Lyte, M. (2002). Growth stimulation of intestinal commensal *Escherichia coli* by catecholamines: a possible contributory factor in trauma-induced sepsis. *Shock*, 18(5), 465-470.

Garcia-Gomez, 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. *Avian Pathology*, 34(5), 426-429.

Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Reviews Immunology*, 5(3), 243-251.

Gold, P. W., & Chrousos, G. P. (2002). Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Molecular psychiatry*, 7(3), 254-275.

Goldstein, D. S., Eisenhofer, G., & Kopin, I. J. (2003). Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305(3), 800-811.

Gomperts, B. D., Kramer, I. M., & Tatham, P. E. (2003). Prolog: Signal Transduction Origins, and Ancestors En: *Signal transduction*. Gulf Professional Publishing. 1-17.

Greenwald, J., & Riek, R. (2010). Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure*, 18(10), 1244-1260.

Groenning, M. (2010). Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils current status. *Journal of chemical biology*, 3(1), 1-18.

Guo, M., Liu, D., Chen, X., Wu, Y., & Zhang, X. (2022). Pathogenicity and innate response to *Avibacterium paragallinarum* in chickens. *Poultry Science*, 101(1), 101523.

Harvey, K. L., Jarocki, V. M., Charles, I. G., & Djordjevic, S. P. (2019). The diverse functional roles of elongation factor Tu (EF-Tu) in microbial pathogenesis. *Frontiers in microbiology*, 2351.

Hori, K., & Matsumoto, S. (2010). Bacterial adhesion: from mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3), 424-434.

Hughes, D. T., Clarke, M. B., Yamamoto, K., Rasko, D. A., & Sperandio, V. (2009). The QseC adrenergic signaling cascade in enterohemorrhagic E. coli (EHEC). *PLoS pathogens*, 5(8), e1000553

Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326(5957), 1216-1219.

Joëls, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro symphony of stress. *Nature reviews neuroscience*, 10(6), p.459-466.

Johnson, T. J., Danzeisen, J. L., Trampel, D., Nolan, L. K., Seemann, T., Bager, R. J., & Bojesen, A. M. (2013). Genome analysis and phylogenetic relatedness of *Gallibacterium anatis* strains from poultry. *PLoS One*, 8(1), e54844.

Jones, K. H., Thornton, J. K., Zhang, Y., & Muel, M. J. (2013). A 5-year retrospective report of *Gallibacterium anatis* and *Pasteurella multocida* isolates from chickens in Mississippi. *Poultry Science*, 92(12), 3166-3171.

Kendall, M. M., & Sperandio, V. (2016). What a dinner party! Mechanisms and functions of interkingdom signaling in host-pathogen associations. *MBio*, 7(2), e01748-15.

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

Lanter, B. B., & Davies, D. G. (2015). *Propionibacterium acnes* recovered from atherosclerotic human carotid arteries undergoes biofilm dispersion and releases lipolytic and proteolytic enzymes in response to norepinephrine challenge in vitro. *Infection and immunity*, 83(10), 3960-3971.

Li, J., Xu, Y., Wang, X., Li, Y., Wang, L., & Li, X. (2016). Construction and characterization of a highly reactive chicken-derived single-chain variable fragment (scFv) antibody against *Staphylococcus aureus* developed with the T7 phage display system. *International Immunopharmacology*, 35, 149-154.

López-Ochoa, J., Montes-García, J. F., Vázquez, C., Sánchez-Alonso, P., Pérez-Márquez, V. M., Blackall, P. J., ... & 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.

Lucio, M.L.S., Vaca, S., Vázquez, C., Zenteno, E., Rea, I., PérezMárquez, V.M. & Nagrete-Abascal, E. (2012). Adhesion of *Gallibacterium anatis* to chicken oropharyngeal epithelial cells and the identification of putative fimbriae. *Advances in Microbiology*, 2, 505–510.

Lyte, M., Erickson, A. K., Arulanandam, B. P., Frank, C. D., Crawford, M. A., & Francis, D. H. (1997). Norepinephrine-induced expression of the K99 pilus adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, 232(3), 682-686.

Lyte, M., Vulchanova, L., & Brown, D. R. (2011). Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa–bacteria interactions. *Cell and tissue research*, 343(1), 23-32.

Martínez González, K.K. (2013). Análisis de la expresión de factores de virulencia regulados por quorum sensing en *Gallibacterium anatis*. Tesis de Maestría, FESC-UNAM.

May, T., & Okabe, S. (2008). *Escherichia coli* harboring a natural IncF conjugative F plasmid develops complex mature biofilms by stimulating synthesis of colanic acid and curli. *Journal of bacteriology*, 190(22), 7479-7490.

McNab, R., Holmes, A. R., Clarke, J. M., Tannock, G. W., & Jenkinson, H. F. (1996). Cell surface polypeptide CshA mediates binding of *Streptococcus gordonii* to other oral bacteria and to immobilized fibronectin. *Infection and Immunity*, 64(10), 4204-4210.

Mendoza, K., I Zavaleta, A., Koga, Y., Rodríguez, J., Alvarado, A., & Tinoco, R. (2014). Variabilidad genética de cepas de *Gallibacterium anatis* aisladas de aves comerciales del Perú con infecciones respiratorias. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(2), 233-244.

Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199.

Miyoshi, S. I., & Shinoda, S. (2000). Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes and infection*, 2(1), 91-98.

Molina, P. E. (2013). *General Principles of Endocrine Physiology* En: *Endocrine physiology*. New York: McGraw-Hill Medical. pp 1-19

Montes García JF, Vaca S, Delgado NL, Uribe-García A, Vázquez C, Sánchez Alonso P, Xicohtencatl Cortes J, Cruz Cordoba A, Negrete Abascal E. (2018) *Mannheimia haemolytica* OmpP2-like is an amyloid-like protein, forms filaments, takes part in cell adhesion and is part of biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 111(12):2311-2321.

Montes-García, J. F., Martínez, D. A. C., Pacheco, S. V., Cruz, C. V., Alonso, P. S., Cortes, J. X., ... & Negrete-Abascal, E. (2018). Identification of two adhesins of *Actinobacillus seminis*. *Small Ruminant Research*, 167, 100-103.

Moonens, K., & Remaut, H. (2017). Evolution and structural dynamics of bacterial glycan binding adhesins. *Current opinion in structural biology*, 44, 48-58.

Moreira, C. G., & Sperandio, V. (2010). The epinephrine/norepinephrine/autoinducer-3 interkingdom signaling system in *Escherichia coli* O157: H7. *Microbial Endocrinology*, 213-227.

Negrete-Abascal, E., Tenorio, V.R., & de la Garza, M. (1999). Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Current microbiology*, 38(1), 64-67.

Neubauer, C., De Souza-Pilz, M., Bojesen, A. M., Bisgaard, M., & Hess, M. (2009). Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. *Avian Pathology*, 38(1), 1-7.

O'Donnell, P. M., Aviles, H., Lyte, M., & Sonnenfeld, G. (2006). Enhancement of in vitro growth of pathogenic bacteria by norepinephrine: importance of inoculum density and role of transferrin. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), pp 5097-5099.

Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576-588.

Paudel, S., Alispahic, M., Liebhart, D., Hess, M., & Hess, C. (2013). Assessing pathogenicity of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model: the respiratory and reproductive tracts of chickens are targets for bacterial colonization. *Avian Pathology*, 42(6), 527-535.

Paudel, S., Liebhart, D., Aurich, C., Hess, M., & Hess, C. (2014). Pathogenesis of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model fulfils Koch's postulates: 2. Epididymitis and decreased semen quality are the predominant effects in specific pathogen free cockerels. *Avian Pathology*, 43(6), 529-534.

Persson, G., & Bojesen, A. M. (2015). Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry. *Veterinary Research*, 46(1), 1-11.

Rai, N., Rai, R., & Venkatesh, K. V. (2015). Quorum sensing biosensors. In Quorum sensing vs quorum quenching: *a battle with no end in sight* (pp. 173-183). Springer, New Delhi.

Reiche, E. M. V., Nunes, S. O. V., & Morimoto, H. K. (2004). Stress, depression, the immune system, and cancer. *The lancet oncology*, 5(10), .617-625.

Rivero-García, P. C., Cruz, C. V., Alonso, P. S., Vaca, S., & Negrete-Abascal, E. (2005). *Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases. *Canadian journal of microbiology*, 51(10), 893–896.

Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(11), a012427.

Sela, S., Aviv, A., Tovi, A., Burstein, I., Caparon, M. G., & Hanski, E. (1993). Protein F: an adhesin of *Streptococcus pyogenes* binds fibronectin via two distinct domains. *Molecular microbiology*, 10(5), 1049-1055.

Sitaras, C., Naghavi, M., & Herrington, M. B. (2011). Sodium dodecyl sulfate–agarose gel electrophoresis for the detection and isolation of amyloid curli fibers. *Analytical biochemistry*, 408(2), 328-331.

Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature reviews neuroscience*, 10(6), 397-409.

Vaca, S., Monroy, E., Rojas, L., Vazquez, C., Sanchez, P., Soriano-Vargas, E., ... & Negrete Abascal, E. (2011). Adherence of *Gallibacterium anatis* to inert surfaces. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(13), 1688-1693.

Voigt, W., Fruth, A., Tschape, H., Reissbrodt, R., & Williams, P. H. (2006). Enterobacterial autoinducer of growth enhances shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 44(6), 2247-2249

Walker, C. E., & Drouillard, J. S. (2012). Effects of catecholamines on gut microflora and potential for beta-adrenergic agonists to impact ruminal fermentation. *Open Agric. J.* 6: pp 57–66.

Walters, M., Sircili, M. P., & Sperandio, V. (2006). AI-3 synthesis is not dependent on luxS in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 188(16), 5668-5681.

Weigel, W. A., & Demuth, D. R. (2016). Qse BC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in *Enterobacteriaceae* and *Pasteurellaceae*. *Molecular Oral Microbiology*, 31(5), 379-397.

Wu, H. J., Wang, A. H., & Jennings, M. P. (2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current opinion in chemical biology*, 12(1), 93-101.

Yang, K., Meng, J., Huang, Y. C., Ye, L. H., Li, G. J., Huang, J., & Chen, H. M. (2014). The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in epinephrine-enhanced motility and biofilm formation by *Escherichia coli*. *Cell biochemistry and biophysics*, 70(1), 391-398.

Yang, Q., Anh, N. D., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2014). Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi*. *Frontiers in microbiology*, 5, 584.