



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



**EFFECTO DE LA EPINEFRINA Y NOREPINEFRINA EN LA  
COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LA BIOPELÍCULA  
DE *Gallibacterium anatis*.**

**TESIS**  
**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**  
**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA**  
**AGUILAR FUENTES ALICIA NOEMI**  
**TUTOR**  
**DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL**

**COMITÉ TUTOR**  
**DRA. MARTHA OFELIA SALCEDO ÁLVAREZ**  
**DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS**  
**DR. JUAN FERNANDO MONTES GARCÍA**  
**DR. ERIC MONROY PEREZ**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, Octubre 2024.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Genética de la UMF de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM y fue financiado por DGAPA-UNAM PAPIIT IN204122.

## **Dedicatorias**

Dedico este trabajo a la familia Aguilar Fuentes por su gran apoyo y amor incondicional.

A mi padre Angel Aguilar y a mi madre Magdalena Fuentes por su gran esfuerzo y paciencia. Por apoyarme en todas las decisiones y proyectos que he tomado a lo largo de mi vida, comprenderme y amarme.

A mis hermanos Uriel, Francisco, Gerardo, Luis y Nataly por darme siempre sus mejores consejos, amor, cariño y velar siempre por mí, son mi admiración.

A mis tíos Loreta y Gabriel, quienes son como mis segundos padres, siempre brindándome su apoyo y cariño.

A mis amigos a lo largo de la carrera con quienes viví este gran episodio, siempre dándome tanto cariño, lealtad, apoyo emocional y la dicha de compartir tantos momentos hermosos juntos.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todas las personas que me acompañaron, alentaron y cuidaron en este proceso de formación profesional. Me siento dichosa de haber llegado hasta este momento.

Agradezco profundamente a mi familia por todo lo que me ha brindado, mis logros también son suyos.

A mi tutor, el Dr. Erasmo Negrete Abascal por haberme dado su voto de confianza, estar pendiente de la correcta realización del proyecto y brindarme sus conocimientos. Gracias por su tiempo, paciencia, por alentarme a crecer profesionalmente y por todos los consejos de vida que me ha compartido los aprecio mucho, además de siempre sacarme una sonrisa.

Al Dr. Juan Fernando Montes García (Dr. Miel) por el apoyo brindado, su gran paciencia y todos sus consejos para llevar a cabo el proyecto. Gracias por su buena y sincera amistad, por tantas carcajadas y las experiencias de vida que ha compartido conmigo.

A mi terapeuta Irma por acompañarme en este proceso, su compromiso y tiempo dedicado a mi bienestar. Gracias puesto que con su ayuda y sabiduría he tenido éxito en mi proceso de sanación y he superado diferentes retos que me permitieron avanzar.

A mis amigos Christopher, Angel, Víctor, Axel y Julián gracias por su bella amistad a lo largo de la carrera, son personas grandiosas y serán unos excelentes biólogos, me siento orgullosa de todo lo que han logrado, los quiero muchísimo.

A mis compañeros de laboratorio Antonio, Buccio, Michelle y Valeria por compartirme su tiempo y conocimiento, además de alegrar mi estancia en el laboratorio, me llevo experiencias muy gratas de cada uno de ustedes. Veronica y Mayra gracias por escucharme y ayudarme siempre que lo necesite, les tengo un gran cariño.

A todas mis mascotas que han sido un gran apoyo emocional.

A la UNAM Facultad de Estudios Superiores Iztacala por ser mi segunda casa y el recinto

donde me he formado profesionalmente. A la carrera de Biología puesto que me ha brindado el conocimiento y habilidades para crecer profesionalmente, además de abrirme oportunidades de tener experiencias maravillosas tanto personales como profesionales.

A la autoclave, por sobrevivir a aquel suceso histórico.

## Resumen

*Gallibacterium anatis* es una bacteria Gram negativa considerada patógena oportunista, forma parte de la microbiota del aparato respiratorio y reproductivo de aves silvestres y domésticas, aunque también puede colonizar al organismo cuando se encuentra estresado e inmunodeprimido y puede causar una variedad de enfermedades, como peritonitis, aerosaculitis, salpingitis y problemas reproductivos. Su patogenicidad se ha asociado a la expresión de algunos factores de virulencia, como lo es la biopelícula, sin embargo, el efecto de las catecolaminas en la biopelícula ha sido poco estudiado.

En este trabajo se describe el efecto de las catecolaminas Norepinefrina (NE) y Epinefrina (E) en la composición y estructura de la biopelícula de *G anatis*. Esta evaluación se realizó en placas de polietileno de 96 pozos creciendo la bacteria durante 24, 48 o 72 h a 37° en medio BHI y cuantificando por tinción con cristal violeta. La formación y dispersión de biopelículas se llevó a cabo usando 50 µM de E o NE y un grupo control sin hormonas.

La cantidad de biopelícula disminuye en presencia de NE (50%) en comparación a las formadas en presencia de E o sin adiciones. Aunque la cantidad de biopelícula no cambia a lo largo del periodo de incubación; sin embargo, la cantidad de biopelícula preformada, a las 24 o 48h, disminuye en presencia de E o NE, en comparación al control, sugiriendo una dispersión. No se observaron cambios a las 72h.

Por ensayos de digestión enzimática, se observa un incremento en la cantidad de proteínas cuando la biopelícula se indujo en presencia de E. Cambios significativos en la proporción de carbohidratos o DNA no fueron observados.

La presencia de E induce una disminución en la expresión de proteínas totales en el rango de 70 a 200 kDa, pero induce la expresión de proteínas secretadas de entre 110-120 kDa, en presencia de NE. Actividades proteolíticas de alto peso molecular y de 110, 65, 55, o 20 kDa son inducidas en presencia de NE a las 24h. La banda de actividad proteolítica 55 kDa se incrementa a las 72h en presencia de E o NE.

Por observaciones con microscopio de luz, y tinción con azul de Coomassie, se observa que la cantidad de proteínas se incrementa por la presencia de hormonas; un resultado similar se observó para carbohidratos teñidos con azul Alcian. Diferencias en cantidad de DNA no pudieron ser observadas por tinción

con Gel red. Por microscopía electrónica de barrido se observa que las hormonas inducen, a las 24h, una compactación y fragmentación de la biopelícula.

La NE también induce una disminución en la cantidad de biopelícula. Este efecto desaparece a las 48h y fragmentos de biopelícula se ven inmersos en material exopolimérico. Las biopelículas en ausencia de hormonas presentan una gran cantidad de bacterias filamentosas similares a sincicios, pero esta morfología desaparece en presencia de hormonas. En biopelículas preformadas, la adición de NE o E induce una dispersión de estas, a las 24 o 48h, pero a las 72h no se observan cambios.

En conclusión, la adición de catecolaminas tiene un efecto importante con respecto a la composición y estructura de la biopelícula de *G. anatis*, indicando que esta bacteria responde al estrés de su hospedero.

Palabras clave: *G. anatis*, biopelícula, exopolímeros, catecolaminas, virulencia.

## Abstract

*G. anatis* is a Gram-negative bacterium considered an opportunistic pathogen. It is part of the microbiota of wild and domestic birds' respiratory and reproductive systems. However, it can also colonize the body when immunosuppressed and can cause various diseases, such as peritonitis, airsacculitis, salpingitis, and reproductive problems. Its pathogenicity has been associated with the expression of some virulence factors, such as biofilm; however, the effect of catecholamine hormones on its expression has been not studied.

This work describes the effect of the catecholamines Norepinephrine (NE) and Epinephrine (E) on the composition and structure of the *G. anatis* biofilm. This evaluation was carried out in 96-well polyethylene plates, growing the bacteria for 24, 48, or 72 hours at 37° in BHI medium and quantifying it by staining with crystal violet. Biofilm formation and dispersion were performed using 50 µM of E or NE and a control group without hormones.

The amount of biofilm decreases in the presence of NE (50%) compared to those formed in the presence of E or without additions. Although the amount of biofilm does not change throughout the incubation period, the amount of preformed biofilm, at 24 or 48 hours, decreases in the presence of E or NE compared to the control, suggesting dispersion. No changes were observed at 72 hours.

Enzymatic digestion assays showed that when the biofilm was induced in the presence of E, an increase in the amount of proteins was observed. Significant changes in the proportion of carbohydrates or DNA were not observed.

The presence of E induces a decrease in the expression of total proteins in the range of 70 to 200 kDa. The induction in the expression of 110-120 kDa-secreted proteins is observed in the presence of NE. High molecular weight proteolytic activities, 110, 65, 55, or 20 kDa are induced in the presence of NE at 24 hours. The 55-kDa proteolytic activity band increases at 72 hours in the presence of E or NE. Light microscope observations and staining with Coomassie blue show that the proteins amount increases due to the presence of hormones; a similar result was observed for carbohydrates stained with Alcian blue. Differences in DNA quantity could not be observed by red gel staining.

Scanning electron microscopy shows that the hormones induce, after 24 hours, compaction and fragmentation of the biofilm. NE also induces a decrease in the

amount of biofilm. This effect disappears after 48 hours, and biofilm fragments are immersed in exopolymeric material. In the absence of hormones, biofilms present many filamentous bacteria like syncytia, but this morphology disappears in the presence of hormones. In preformed biofilms, the addition of NE or E induces their dispersion after 24 or 48 hours, but at 72 hours, no changes are observed.

In conclusion, the addition of catecholamines has an important effect on the composition and structure of the *G. anatis* biofilm, indicating that this bacterium responds to the stress of its host.

Keywords: *G. anatis*, biofilm, exopolymers, catecholamines, virulence.

<b>Índice</b>	
Resumen .....	6
Abstract .....	8
<b>Introducción</b> .....	14
Familia <i>Pasteurellaceae</i> .....	14
Género <i>Gallibacterium</i> .....	14
<i>Gallibacterium anatis</i> .....	14
Hospederos .....	15
Patogénesis de <i>G. anatis</i> .....	15
Estrés .....	15
Catecolaminas .....	16
Factores de virulencia .....	17
Biopelícula bacteriana .....	19
Formación de biopelícula .....	19
Composición de biopelícula .....	21
Estructura de biopelícula .....	23
<b>Antecedentes</b> .....	24
<b>Justificación</b> .....	25
<b>Hipótesis</b> .....	26
<b>Objetivos</b> .....	26
<b>Material y métodos</b> .....	26
Formación de biopelícula y obtención de biomasa .....	27
Obtención de proteínas secretadas .....	27
Obtención de proteínas totales .....	27
Electroforesis .....	27
Zimograma .....	28
Formación de biopelícula .....	28
Dispersión de biopelícula .....	29
Digestión enzimática de biopelícula .....	29
Microscopía óptica .....	29
Microscopía electrónica de barrido .....	29
<b>Resultados</b> .....	30
<b>Discusión</b> .....	43

<b>Conclusiones</b> .....	46
<b>Perspectivas</b> .....	46
<b>Referencias</b> .....	47

## Lista de cuadros y figuras

**Figura 1.** Formación de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 a las 24, 48 y 72 h en presencia o no de catecolaminas (50  $\mu$ M de (NE), (E) y sin adiciones Control (C).

**Figura 2.** Dispersión de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 a las, 48 y 72 h en presencia y ausencia de catecolaminas. Sin adiciones de hormona el Control (C), con 50  $\mu$ M de (NE) y (E).

**Figura 3.** Digestión enzimática de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 de 24 h. Sin adiciones control (C), con 50  $\mu$ M de (E): absorbancias obtenidas después de la degradación enzimática con Tripsina, Amilasa y DNAsa (método cristal violeta).

**Figura 4.** Digestión enzimática de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 de 24 h. Sin adiciones control (C), con 50  $\mu$ M de (NE): absorbancias obtenidas después de la degradación enzimática con Tripsina, Amilasa y DNAsa (método cristal violeta).

**Figura 5.** Digestión enzimática de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 de 48 h. Sin adiciones control (C), con 50  $\mu$ M de (E): absorbancias obtenidas después de la degradación enzimática con Tripsina, Amilasa y DNAsa (método cristal violeta).

**Figura 6.** Digestión enzimática de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 de 48 h. Sin adiciones control (C), con 50  $\mu$ M de (NE): absorbancias obtenidas después de la degradación enzimática con Tripsina, Amilasa y DNAsa (método cristal violeta).

**Figura 7.** Digestión enzimática de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 de 72 h. Sin adiciones control (C), con 50  $\mu$ M de (E): absorbancias obtenidas después de la degradación enzimática con Tripsina, Amilasa y DNAsa (método cristal violeta).

**Figura 8.** Digestión enzimática de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 de 72 h. Sin adiciones control (C), con 50  $\mu$ M de (NE): absorbancias obtenidas después de la degradación enzimática con Tripsina, Amilasa y DNAsa (método cristal violeta).

**Figura 9.** Tinción con azul de Coomassie en biopelículas de *G. anatis* 12656-12 a las 24, 48 y 72 h de formación en presencia o ausencia de NE y E. Imágenes observadas a una amplificación de 4x con un microscopio óptico. **Figura 10.** Tinción con azul Alcian en biopelículas de *G. anatis* 12656-12 a las 24, 48 y 72 h de formación en presencia o ausencia de NE y E. Imágenes observadas a una amplificación de 4x con un microscopio óptico.

**Figura 11.** Tinción con GelRed en biopelículas de *G. anatis* 12656-12 a las 24,48 y 72h de incubación en presencia o no de NE y E. Imágenes observadas en un transiluminador con luz UV.

**Figura 12.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la biopelícula de *G. anatis* 12656-12 a las 24h de formación en presencia o no de NE y E. **Figura 13.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la biopelícula de *G. anatis* 12656-12 a las 48 h de formación en presencia o no de NE y E. **Figura 14.** Patrón de proteínas totales de muestras de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 en gel SDS-PAGE al 10 %. MPM (1), Control (2), NE (3), E (4). A las 24 (a), 48 (b) y 72 h (c). Los recuadros blancos representan la disminución de bandas y los recuadros rojos la expresión de bandas.

**Figura 15.** Patrón de proteínas secretadas de muestras de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 en gel SDS-PAGE al 10 %. MPM (1), Control (2), NE (3), E (4). A las 24 (a), 48 (b) y 72 h (c). Los recuadros blancos representan la disminución de bandas y los recuadros rojos la expresión de bandas.

**Figura 16.** Zimograma 10% con gelatina porcina 1% de proteínas totales por *G. anatis* 12656-12, MPM (carril 1) a las 24 (carriles 2-4), 48h (carriles 5-7), 72h (carriles 8-10). Las flechas blancas indican los cambios observados. **Figura 17.** Zimograma 10% con gelatina porcina 1% de proteínas secretadas por *G. anatis* 12656-12, MPM (carril 1) a las 24 (carriles 2-4), 48h (carriles 5-7), 72h (carriles 8-10). Las flechas blancas indican los cambios observados.

## **Introducción**

### **Familia Pasteurellaceae**

La familia Pasteurellaceae comprende un grupo altamente heterogéneo de bacterias, que incluye a la fecha 20 géneros, son bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas, inmóviles, no esporuladas, generalmente son bacilos pequeños, aunque pueden variar en forma y tamaño dentro del grupo. Los miembros de la familia Pasteurellaceae causan una amplia variedad de enfermedades en humanos y animales (Michael, 2018). Se pueden distinguir de las enterobacterias relacionadas por la producción de oxidasa, y de la mayoría de otras bacterias similares, por la ausencia de flagelos (Bisgaard, 1993).

### **Género *Gallibacterium***

El género *Gallibacterium* comprende 4 especies: *G. anatis*, *G. melopsittaci* sp. nov., *G. trehalosifermentans* sp. nov. y *G. salpingitidis* sp. nov. (El-adawy et al., 2018). Este género de bacterias es perteneciente a la familia Pasteurellaceae en la clase Gammaproteobacteria. Recientemente se ha incluido a *Gallibacterium* como un nuevo género de la familia Pasteurellaceae, que abarca bacterias anteriormente reportadas como *Pasteurella anatis*, *Actinobacillus salpingitidis* y *Pasteurella haemolytica* como organismos similares (Bojesen et al., 2003), *G. anatis* es la especie más estudiada y conocida dentro de este género.

### ***Gallibacterium anatis***

Es una bacteria gramnegativa, cocobacilo, encapsulada, no esporulada, inmóvil, anaerobia facultativa y mesófila (Lawal et al., 2018). Las células de *G. anatis* son generalmente pequeñas, con dimensiones de aproximadamente 0.5-1.5 micrómetros de ancho y 1-3 micrómetros de largo. Es una bacteria facultativa, lo que significa que puede crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Además, puede fermentar la glucosa para obtener energía.

La variedad hemolítica de *G. anatis* es comúnmente parte de la microbiota del aparato respiratorio y reproductivo de las aves silvestres y domésticas (Kristensen et al., 2011), aunque también puede causar una variedad de enfermedades, como peritonitis, aerosaculitis, salpingitis y problemas reproductivos en aves, por lo cual es considerada como patógeno oportunista. La virulencia puede variar entre cepas y

está influenciada por factores genéticos y ambientales.

Se consideran comensales en superficies mucosas de aves y mamíferos, especialmente en el tracto respiratorio superior, aunque pueden convertirse en patógenos oportunistas en situaciones de inmunosupresión o estrés, causando infecciones graves en hospedadores susceptibles. Dentro de estas enfermedades se incluyen infecciones respiratorias, salpingitis, septicemia, enfermedades de transmisión sexual y otros trastornos graves (Mendoza et al., 2014; Neubauer et al., 2009; Paudel et al., 2013; Paudel et al., 2014).

### **Hospederos**

*G. anatis* es conocida desde hace ya tiempo como habitante común del tracto respiratorio y del tracto genital inferior de aves sanas. Se tiene registro de su aislamiento en pollos, patos, gansos, etc. El biovar hemolítico también se ha aislado de aves, bovinos y cerdos sanos y enfermos (Singh et al., 2016).

### **Patogénesis de *G. anatis***

*G. anatis* es parte de la microbiota de aves, sin embargo existen factores que generan inmunosupresión en las aves y que permiten a *G. anatis* causar lesiones; entre estos se encuentran las infecciones simultáneas por otros patógenos, edad y cambio de clima (Bojesen et al., 2004; Chávez et al., 2017; Persson y Bojesen, 2015; Singh et al., 2016), el estrés también provoca la supresión de la inmunidad humoral y celular en las aves de corral (Tsiouris et al., 2015).

### **Estrés**

El estrés ocurre cuando los cambios en el medio externo o interno son interpretados por el organismo como una amenaza a su homeostasis. La habilidad del organismo de ejecutar la respuesta apropiada a estos cambios potencialmente estresantes requiere del correcto reconocimiento y la activación de la respuesta de estrés.

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 y 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 neuro activos (Reiche et al., 2004). 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 (Rea, 2022).

### **Catecolaminas**

Las catecolaminas son un grupo de hormonas similares entre sí, fundamentales en la respuesta al estrés y desempeñan un papel crucial en la adaptación y supervivencia del organismo frente a estímulos desafiantes en su entorno. Las catecolaminas principales son la adrenalina (Epinefrina), noradrenalina (Norepinefrina) y la dopamina.

Las catecolaminas existen en concentraciones bajas ( $\mu\text{M}$ ) en el cerebro, y tienen una importancia considerable en la regulación de múltiples aspectos de la función del sistema nervioso central (Goldstein et al., 2003). Además, se ha demostrado que la exposición a las hormonas del estrés reduce la eficacia inmunitaria, especialmente la inmunidad celular protectora de las aves y aumenta su susceptibilidad a enfermedades (Reiche et al., 2004; Glaser y Kiecolt, 2005).

Estas hormonas afectan al crecimiento y la virulencia de las bacterias, el aumento del crecimiento de las bacterias 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 influyen directamente en la colonización de bacterias Gram negativas como *Escherichia 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 hospedero (Kendall y Sperandio, 2016).

El efecto de estas catecolaminas en las bacterias es muy variado y poco estudiado, se sabe que pueden modificar la expresión de proteínas de la superficie externa y la actividad citotóxica, a su vez, se ha observado que estas pueden generar cambios en la expresión génica, adquisición de hierro y la formación de biopelículas (Boyanova, 2017).

## Factores de virulencia

Las bacterias poseen mecanismos de patogenicidad específicos que emergen al superar las defensas de un hospedero. Un microorganismo patógeno posee la capacidad de producir un daño, a cualquier nivel, en un 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 (Weigel et al., 2003; Sánchez, 2011).

Los factores de virulencia son todos aquellos componentes que le dan al organismo la capacidad de causar enfermedad. Son principalmente de 2 tipos: los expresados en la superficie celular (que desempeñan funciones de adhesión e invasión de tejidos además de formación de biopelículas e inducción de citocinas) y los producidos dentro de la célula bacteriana y que son exportados al sitio de infección (Miranda et al., 2017). La importancia de los factores de virulencia radica en que están involucrados en varios aspectos como la colonización, nutrición, evasión del sistema inmune y la inmunosupresión del hospedero (Persson y Bojesen, 2015).

En *G. anatis*, se han identificado algunos de sus factores de virulencia, como las fimbrias F17-like, la toxina GtxA, las vesículas de membrana externa, las metaloproteasas y la capacidad de la bacteria para la formación de biopelícula (Ojeda et al., 2020).

Las fimbrias F17-like permiten que la bacteria se adhiera a las células del hospedero, facilitando la colonización y la invasión de los tejidos. Las fimbrias son codificadas por un grupo de 4 genes en el que se encuentra el gen *flfG* que es responsable de la adhesión. La adhesina se ubica en el extremo de la fimbria y se encarga del reconocimiento y unión al receptor. Se unen a los receptores que poseen N-acetil-D-glucosamina en la superficie de la célula del hospedero (Persson y Bojesen, 2015).

Algunas cepas de *G. anatis* producen toxinas que dañan las células del hospedador y contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. La toxina RTX específica de *G. anatis* biovar hemolítico, GtxA, posee dos dominios: C-terminal y N-terminal. El dominio C-terminal es responsable de la función hemolítica, mientras que la función del N-terminal no es del todo clara, pero es necesaria para la

actividad hemolítica completa y la actividad leucotóxica (Kristensen, Frees, y Bojesen, 2010; Persson y Bojesen, 2015; S. Singh et al., 2016).

De igual manera las vesículas de membrana externa, son pequeñas estructuras esféricas que se desprenden de la membrana externa de bacterias Gram negativas, su función no se ha definido aunque se cree que puede estar relacionada con la adhesión y colonización, hemaglutinación, modulación de la respuesta inmune del hospedero, eliminación de sustancias antibacterianas, además de actuar como distractores de la respuesta inmune (Persson y Bojesen, 2015; Singh et al., 2016; Blanco, 2019). Están compuestas principalmente por lípidos de la membrana externa, proteínas, y a veces también contienen ácidos nucleicos y lipopolisacáridos (LPS), aunque puede variar dependiendo de la especie bacteriana y el entorno (Persson y Bojesen, 2015; Singh et al., 2016).

También produce metaloproteasas las cuales están involucradas en la modulación de la respuesta inmune del hospedero, puesto que actúa sobre inmunoglobulinas y las proteínas del sistema de complemento (García et al., 2005; Persson y Bojesen, 2015). Las cuales tienen la capacidad de degradar las IgG, por lo que, participan en la evasión del sistema inmune (García et al., 2005). Además de realizar otras funciones importantes como la colonización, adquisición de nutrientes e invasión a la circulación sistémica (Persson y Bojesen, 2015).

La presencia de una cápsula delgada en *G. anatis* es considerada otro factor de virulencia, puesto que, si la bacteria forma una cápsula, esta puede ayudar a evadir el sistema inmunitario del hospedador y resistir la fagocitosis, se cree que participa en la interacción contra células, mediando la adherencia, aunque su función exacta aún es desconocida (Persson y Bojesen, 2015).

La formación de biopelícula es considerada otro factor de virulencia, está relacionada con infecciones crónicas, el incremento de la resistencia a los antibióticos y la capacidad de adherirse a superficies inertes y tejido vivo (Vaca et al., 2011; Persson y Bojesen, 2015). Se puede clasificar a *G. anatis* en cepas que no producen biopelícula y cepas que producen biopelícula débil, moderada y fuerte (Johnson et al., 2013).

## **Biopelícula bacteriana**

Las bacterias tienen la capacidad de agruparse en cúmulos, adherirse a superficies y compartir los nutrientes disponibles entre sí. Estas comunidades, que constituyen masas de bacterias y sus productos extracelulares capaces de fijarse a superficies bióticas y abióticas generalmente húmedas y con materia orgánica, se denominan biopelículas y han sido comparadas con ciudades microbianas en las que los individuos cooperan en el mantenimiento de una infraestructura común que les beneficia a todos (Cardenas et al., 2014).

En microbiología médica, el concepto de biopelículas era completamente ajeno; sin embargo, en 1985, el Dr. John William Costerton (padre de la biofilmología) trajo este concepto al área médica y propuso que muchas de las infecciones crónicas podrían ser causadas por microorganismos que estuvieran creciendo en forma de biopelículas (Lappin et al., 2014).

Estas asociaciones bacterianas representan un mecanismo de adherencia y tienen importancia porque confieren resistencia a los desinfectantes y antibióticos. Esta característica es significativa, en especial cuando las biopelículas colonizan estructuras como dientes, catéteres, prótesis extensibles, lentes de contacto, y alvéolos, entre otros (Klausen et al., 2003).

Las biopelículas se rodean por una matriz extracelular compuesta por proteínas, ADN extracelular y exopolisacáridos. La matriz extracelular otorga a los microorganismos embebidos en ella la capacidad de evadir la respuesta inmune del huésped, así como inducir una respuesta inflamatoria crónica (Ortega y Hernández, 2018).

## **Formación de la biopelícula**

El proceso de formación de biopelícula es un proceso complejo, constante y dinámico que ocurre en cuatro fases: adhesión, agregación, maduración y dispersión. En cada una de las fases participan fuerzas fisicoquímicas y distintos mecanismos genéticos y moleculares que regulan la biosíntesis de la matriz extracelular (Ortega y Franco, 2014).

El desarrollo óptimo de la biopelícula depende de una serie de factores como los recursos y nutrientes presentes, las condiciones ambientales, las propiedades y metabolismo de las bacterias, la comunicación celular y la regulación genética (Sadekuzzaman et al., 2015).

Durante la fase de adhesión ocurren dos fenómenos que favorecen que los microorganismos se depositen sobre una superficie e inicien la formación de las biopelículas: atracción y adhesión (Peters et al., 1982). La atracción es un proceso reversible que ocurre cuando los microorganismos, en estado planctónico, son atraídos y depositados en superficies vivas e inertes mediante distintos tipos de fuerzas fisicoquímicas (Van der Waals, gravitacionales, electrostáticas, hidrofóbicas o movimientos Brownianos) (Grössner et. al., 2009).

Las fuerzas fisicoquímicas pueden ser propias de las paredes microbianas o de las superficies inertes. Una vez que las células microbianas se han depositado sobre una superficie, inmediatamente se inicia la fase de adhesión, la cual es irreversible. Posterior a la adhesión se inicia la agregación, que ocurre cuando se adicionan más células microbianas a los microorganismos que inicialmente se adhirieron (Ortega y Hernández, 2018).

Durante la agregación se generan elevadas concentraciones de metabolitos secundarios, producto del metabolismo microbiano, los cuales son útiles para la comunicación microbiana; esta última se denomina quorum sensing (QS). El QS es un sistema de comunicación que poseen las bacterias que sirve para inducir o reprimir la expresión de genes que codifican factores de virulencia o enzimas que participan en la biosíntesis de los principales componentes de la matriz extracelular, como exopolisacáridos y proteínas (Ortega y Hernández, 2018).

La tercera fase es la maduración; en ella, los microorganismos que ya se han agregado comienzan a multiplicarse, a la vez que hay una excesiva producción de EPS, proteínas y liberación de DNA extracelular, que servirán para la formación de la matriz extracelular y el crecimiento de las biopelículas. Está demostrado que cada especie bacteriana produce y libera exopolisacáridos específicos que otorgan propiedades fisicoquímicas muy diversas a la matriz extracelular (Ortega y

Hernández, 2018).

Una biopelícula madura es una estructura de tres capas: capa reguladora interna, capa basal microbiana media y capa externa habitada por la forma planctónica de microorganismos que están listos para salir de la biopelícula (Zhao et al., 2017).

Adicional a la secreción de exopolisacáridos, otro fenómeno que ocurre en la maduración es la liberación de DNA extracelular, que es útil para dar rigidez a las biopelículas y participa en la transferencia de genes de resistencia entre los microorganismos que se encuentran en el interior de las biopelículas. Por otra parte, se forman canales de agua a través y alrededor de las biopelículas, importantes para la excreción y el transporte de las moléculas del QS y del metabolismo (Ortega y Hernández, 2018). Por último, otros fenómenos que se llevan a cabo durante la maduración son los cambios morfológicos y metabólicos de los microorganismos en el interior de las biopelículas (Ortega y Hernández, 2018).

La dispersión es la última fase en el ciclo de formación de las biopelículas, algunos factores que son los principales responsables de la dispersión de la biopelícula madura incluyen la población superada, la competencia intensa, y la falta de nutrientes (Rabin et al., 2015). Este desprendimiento permite que las bacterias migren a otros sitios e inicien la formación de biopelícula en una nueva superficie. La degradación de la matriz extracelular es un proceso complejo que ocurre en dos pasos; en el primero de ellos, las bacterias se activan metabólicamente, y en el segundo, ocurre la expresión de genes que codifican para moléculas que pueden degradar la matriz extracelular (Ortega y Franco, 2014).

### **Composición de la biopelícula**

Aunque la composición de la biopelícula es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario de la biopelícula es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz está compuesta de exopolisacáridos (Lasa, 2005).

La matriz exopolimérica forma un andamio que mantiene unida la biopelícula y, por lo tanto, ayuda en la comunicación célula-célula y proporciona las fuerzas de

adhesión y cohesión necesarias para la formación de biopelícula. La matriz exopolimérica ayuda en el flujo de nutrientes, mantiene la disponibilidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) para la transferencia horizontal de genes (HGT) y actúa como una barrera protectora contra los biocidas oxidantes, los antibióticos, la radiación ultravioleta, la desecación y el sistema de defensa inmunitario del huésped (Flemming et al., 2000; Rather et al., 2021).

### **Polisacáridos**

Los polisacáridos constituyen una fracción mayoritaria de la matriz extracelular, y aparecen de forma ubicua en la biopelícula. El papel de los polisacáridos es actuar como un pegamento molecular necesario para la adhesión bacteriana entre sí y con las superficies bióticas y abióticas para la colonización, además de desempeñar un papel protector contra el sistema inmunitario y otras tensiones externas (Limoli et al., 2015). Varias interacciones como las descritas de Van der Waals, las fuerzas electrostáticas de atracción y repulsión, las fuerzas de atracción iónicas y los enlaces de hidrógeno, promueven la interacción de los polisacáridos consigo mismos o con las proteínas y los iones necesarios para mantener la estructura y la estabilidad de la matriz de la biopelícula (Lembre et al., 2012).

### **Proteínas**

Las proteínas presentes en la matriz extracelular poseen funciones que permiten el crecimiento de la biopelícula y la supervivencia de las células alojadas mediante el acceso a nutrientes o el mantenimiento de la integridad y la arquitectura de la biopelícula. Algunas proteínas ayudan en la degradación y dispersión de la matriz de la biopelícula, como las proteasas, que digieren las proteínas de la matriz (Martí et al., 2015).

### **ADN extracelular**

El ADN extracelular es un constituyente importante y mayoritario de la matriz extracelular, cumple funciones importantes en el desarrollo y estabilidad de la biopelícula. Participa en la adhesión de las bacterias a las superficies modulando la interacción de carga e hidrofobicidad, además asegura la alineación adecuada dentro de la biopelícula lo cual facilita la expansión de la misma y proporciona una transferencia horizontal de genes a las bacterias de la biopelícula (Bolívar et al.,

2021).

## **Agua**

En la matriz exopolimérica el agua se considera el componente más abundante de la biopelícula, cumple con funciones muy importantes como lo es el mantenimiento de la biopelícula hidratada, protege de la desecación; incluso durante las fluctuaciones del contenido de agua ambiental (Flemming y Wingender, 2010). El flujo y el mantenimiento de los nutrientes esenciales dentro de una biopelícula se atribuyen a la cantidad de agua disponible (Sutherland, 2001).

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), están formadas por exopolisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y otras biomoléculas, todas fundamentales para la estructura, función y dinámica de la biopelícula (Kumar y Anand, 1998). Hasta ahora, se ha identificado una amplia gama de biomoléculas. Estos se pueden agrupar en dos categorías principales: los primeros asociados con la superficie celular y los segundos secretados extracelularmente. Algunos ejemplos incluyen apéndices asociados a células como flagelos, pili tipo IV y proteínas amiloides funcionales que modulan adhesión bacteriana, la estabilidad mecánica y las respuestas autoinmunes.

Por el contrario, los exopolisacáridos bacterianos secretados, las proteínas, el ADN y el ARN liberados extracelularmente contribuyen con el andamiaje y la función de la matriz. Se descubrió que las proteínas y glicoproteínas del hospedero contribuyen a la estructura de la matriz y ayudan a la unión microbiana al mismo tiempo que sirven como fuente de nutrientes microbianos (García et al., 2020).

## **Estructura de la biopelícula**

La biopelícula bacteriana es una estructura compleja y dinámica compuesta por bacterias, matriz extracelular y otros componentes, que trabajan juntos para proporcionar un entorno favorable para el crecimiento y la supervivencia de las bacterias en condiciones adversas.

Las propiedades estructurales y bioquímicas de la biopelícula proporcionan las propiedades emergentes de ésta, incluida la adhesión a la superficie, las heterogeneidades espaciales y químicas, las interacciones polimicrobianas sinérgicas/competitivas, así como la resistencia antimicrobiana; estas propiedades

están relacionadas con la capacidad virulenta de las bacterias patógenas, sin embargo, la biopelícula también es una forma de vida común en ambientes fuera del hospedero (García et al., 2020).

## **Antecedentes**

Vaca y colaboradores en 2011 describen por primera vez la formación de una biopelícula por *G. anatis*. Los autores muestran la capacidad de adherencia de *G. anatis* a superficies inertes como vidrio y poliestireno, sus ensayos demuestran la disminución de esta adherencia al tratar a las bacterias con tripsina, al visualizar esta adherencia por microscopía electrónica de barrido después de 6 horas de cultivo, observan una matriz exopolimérica robusta lo que sugiere una biopelícula, las bacterias se encuentran entrelazadas por estructuras fimbriales abundantes y observan la secreción de microvesículas, este trabajo concluye que las formas fimbriales pueden ser de origen proteico y que participan en la adherencia, primer paso en la formación de la biopelícula.

Boukahil y Czuprynski en 2015 describen la formación de la biopelícula in vitro de *Mannheimia haemolytica*, esta bacteria miembro de la familia *Pasteurellaceae* es el principal causante de la fiebre de embarque en bovinos, una enfermedad pulmonar que puede ser mortal y causar fuertes pérdidas económicas para el productor. En este trabajo se describe la condición de formación de biopelícula, así como su composición y la proporción de los exopolímeros presentes en ella; encontrando que los medios enriquecidos como el medio infusión cerebro corazón y el crecimiento a 37°C después de 36 horas incrementa su formación. A través de tinciones y visualización en microscopio evidencian la presencia de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos.

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.

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, reportaron que la epinefrina modulaba la formación de biopelícula, mientras que la norepinefrina tuvo un menor efecto.

Rea en 2022 evalúa el efecto de diversas concentraciones de Epinefrina (E) o Norepinefrina (NE) en el crecimiento de *G. anatis*, así como su efecto en la expresión diferencial de proteínas. En su trabajo describe que 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. La presencia de hormonas provocó una disminución en la formación de biopelícula.

García y colaboradores en 2020 describen la caracterización de la formación de biopelícula por *Actinobacillus seminis* en ensayos in vitro de 48 h de incubación, reportando la formación de biopelículas que contenían una matriz extracelular compuesta principalmente de material fibrilar. A su vez, a través de la digestión enzimática de los componentes de la biopelícula, encontró que las proteínas eran su componente principal. En observaciones estructurales mediante microscopía electrónica de barrido se observó la presencia de una gran cantidad de material fibrilar en el que se encontraban inmersas las bacterias.

## **Justificación**

*G. anatis* es una bacteria importante en el sector avícola debido a su capacidad para causar enfermedades en aves de corral ocasionando pérdidas económicas significativas afectando al sector avícola, la salud aviar y potencialmente la salud pública. Este microorganismo responde 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.

Con este proyecto se pretende saber si las catecolaminas tienen algún efecto en la composición y estructura de la biopelícula de *G. anatis*. Siendo de importancia para el desarrollo de estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades aviares causadas por esta bacteria.

## **Hipótesis**

Las catecolaminas Epinefrina y Norepinefrina inducen cambios en la composición y la estructura de la biopelícula de *G. anatis*.

## **Objetivos:**

### **Objetivo general**

- Evaluar el efecto de las catecolaminas Epinefrina y Norepinefrina sobre la composición de la estructura de la biopelícula de *Gallibacterium anatis*.

### **Objetivos específicos**

- Determinar el efecto de la adición de E o NE (50  $\mu$ M) en la formación y dispersión de la biopelícula de *G. anatis*.
- Determinar el efecto de la adición de E o NE (50  $\mu$ M) sobre la composición y ultraestructura de la biopelícula de *G. anatis*.
- Determinar si existen cambios en los patrones de proteínas de la biopelícula de *G. anatis* en presencia y ausencia de E o NE (50  $\mu$ M).
- Determinar el efecto de las catecolaminas sobre la actividad proteolítica de *G. anatis* en zimogramas con gelatina porcina como sustrato.

## **Materiales y métodos**

### **Cepa bacteriana**

Se utilizó la cepa de *G. anatis* 12656-12 variedad hemolítica.

### **Medios de cultivos**

Para su mantenimiento, esta bacteria fue crecida en una placa de agar sangre 37° durante 24h. Para el desarrollo de los diferentes ensayos la bacteria *G. anatis* 12656-12 fue crecida en caldo BHI, y se administró NE o E a una concentración 50  $\mu$ M.

### **Formación de biopelícula y obtención de biomasa**

Para conocer el efecto de NE y E en las biopelículas de *G. anatis*, estas se indujeron durante 24, 48 o 72h. Para obtener la biomasa, estas se indujeron en 100 ml de medio BHI, adicionados o no con E y NE, la biopelícula fue recuperada por centrifugación y pesada, para conocer la cantidad de biopelícula formada.

### **Obtención de proteínas secretadas**

Los cultivos se centrifugaron a 10500 rpm durante 25 min a 8°C, al sobrenadante del cultivo se le agregó sulfato de amonio al 70% para recuperar las proteínas secretadas, dejando precipitar toda la noche. Posteriormente se centrifugaron nuevamente a 10500 rpm durante 30 min para recuperar las proteínas precipitadas, se resuspendieron en PBS y se mantuvieron en congelación hasta su uso.

### **Obtención de proteínas totales**

La biomasa recuperada por centrifugación se resuspendió en 1 ml de HEPES 20mM pH 7.4 con lisozima (1 mg/ml), las suspensiones se incubaron a 150 rpm a 37°C durante media hora, posteriormente se sonicaron durante 7 minutos en hielo. Después de la sonicación las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 3 minutos para separar las células enteras, se recuperó el sobrenadante (proteínas totales). La cuantificación de proteínas se realizó con el método de Bradford.

### **Separación electroforética de proteínas**

Para la observación de posibles cambios en los patrones de proteínas de las muestras obtenidas con hormonas y el control, se realizó una separación electroforética en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% cargando 10 µg de proteína por carril. Al término, los geles se tiñeron con una solución de Azul de Coomassie (R-250 0.1%, metanol 40% y ácido acético 10%) y posteriormente se empleó una solución de ácido acético al 10% para eliminar el exceso de colorante (Bautista, 2020).

## **Zimograma**

Para visualizar la actividad proteolítica se realizaron zimogramas en geles SDS-PAGE al 10% con 0.1% de gelatina porcina (De la Cruz, 2015). Posterior a la separación electroforética, los geles de sustrato se incubaron en agitación durante 1 h en una solución de tritón X-100 al 1.5%. Enseguida, los geles fueron incubados en Tris 20 mM CaCl<sub>2</sub> 10 mM toda la noche a 37°C para que las proteasas degradarán el sustrato. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y las actividades proteolíticas fueron observadas como zonas blancas contra un fondo azul (Negrete et al., 1999).

## **Formación de biopelícula**

Con la finalidad de evaluar los efectos de la NE y E sobre la formación de biopelícula, se utilizaron placas de polietileno estériles de 96 pozos. Se realizó el cultivo de la cepa 12656-12 en un tubo de 10 ml de medio BHI incubada a 37°C, se ajustó 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 180µl de medio BHI e inoculados con 20 µl de la suspensión bacteriana. Como control negativo se utilizó medios sin hormona.

La placa fue incubada a 37°C durante 24, 48 y 72 h, posteriormente el medio fue retirado de los pozos, a continuación, la biopelícula se fijó con 200µl de metanol por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la tinción con 150µl de cristal violeta Huesker's al 1% por 15 minutos.

La placa se lavó con agua corriente para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente se añadieron 150µl de ácido 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).

## **Dispersión de biopelícula**

Con la finalidad de evaluar el efecto de la NE y E en la dispersión de la biopelícula. La formación de biopelículas se indujo en placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos como se describió anteriormente, sin la adición de hormonas.

Posteriormente, una vez que se formó la biopelícula, el medio fue retirado de los pozos y se sustituyó por una solución de agua estéril con NE y E durante 1h. Se retiró la solución, y la placa se procesó como se describió anteriormente, la densidad óptica fue determinada en un lector de placas a 630 nm (Fredheim et al., 2009).

### **Digestión enzimática de biopelícula**

Con la finalidad de conocer las proporciones relativas de los exopolímeros presentes en la biopelícula. Una vez formada la biopelícula, el medio fue sustituido por tres soluciones enzimáticas: Amilasa, Tripsina y Dnasa a una concentración 10 mM durante 30 min. Se retiraron las soluciones enzimáticas y la biopelícula se procesó y cuantificó como se describió previamente (García et al., 2020).

### **Microscópica óptica**

Se indujeron biopelículas de *G. anatis* en cubreobjetos de vidrio dentro de placas de cristal que contenían medio BHI inoculado. En presencia o no de NE y E, por triplicado. Cada grupo experimental fue incubado durante 24, 48 o 72h.

Para observar la presencia de los diferentes polímeros extracelulares, las biopelículas producidas en cubreobjetos de vidrio se tiñeron con azul de Coomassie para evidenciar la presencia de las proteínas; azul Alcian para teñir carbohidratos y GelRed para teñir el ADN. Se visualizaron con un microscopio de contraste de fase Nikon alphaphotYS2. Las imágenes se fotografiaron con una amplificación de 4x. El ADN extracelular se visualizó en un transiluminador de luz UV (Boukahil y Czuprynski, 2015).

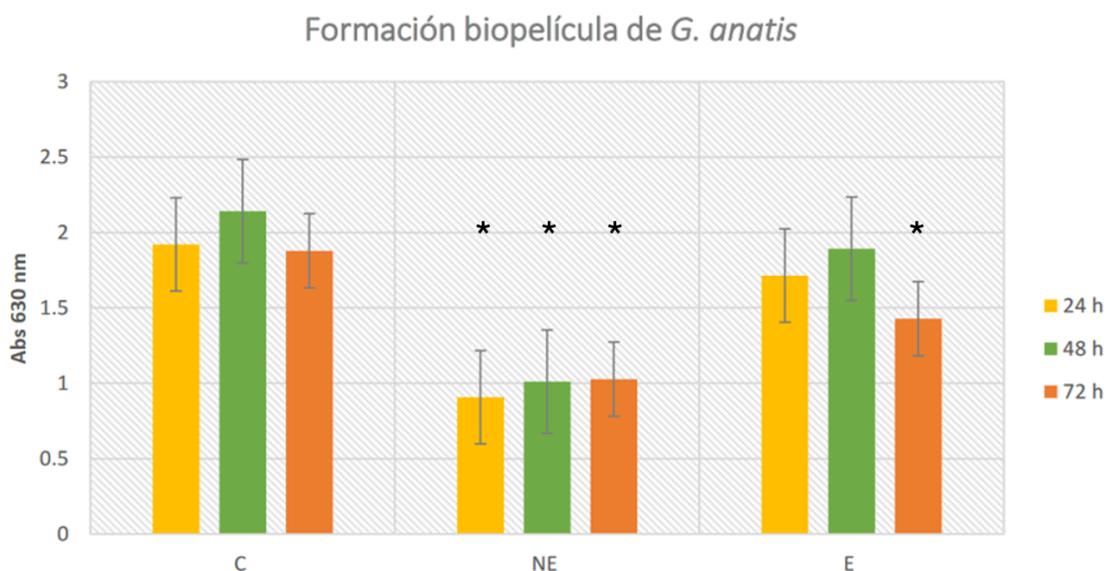
### **Microscopía electrónica de barrido**

Se indujeron biopelículas en portaobjetos de vidrio en el fondo de placas de plástico de 80x15 mm que contenían medio BHI inoculado. Las biopelículas se fijaron con glutaraldehído al 2% durante 1 h y se procesaron para ser visualizadas. Las muestras se recubrieron con oro y se examinaron con un microscopio electrónico de barrido (SEM) SEM JEOL JSM 6510LV a 25 kV.

## Resultados

### Formación de biopelícula

La cantidad de biopelícula formada de *G. anatis* 12656-12 disminuyó, aunque no significativamente, con la adición de E. Sin embargo, la presencia de NE indujo una disminución considerable con respecto al grupo control (Figura 1).

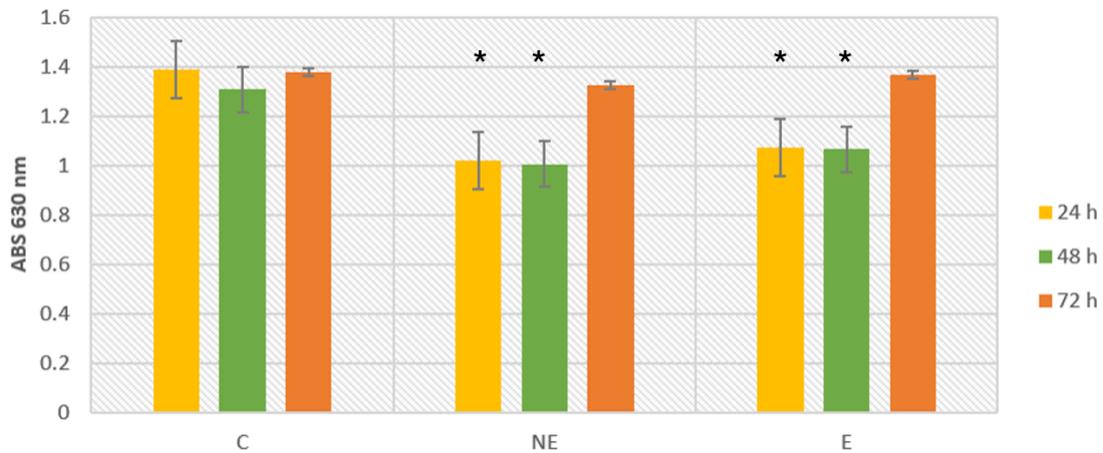


**Figura 1.** Formación de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 a las 24, 48 y 72 h en presencia y ausencia de catecolaminas. Control (C) sin adiciones, o con 50  $\mu$ M de Norepinefrina (NE) o Epinefrina (E), (\*) indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

### Dispersión de biopelícula

La adición de catecolaminas indujo una disminución en la cantidad de biopelícula de *G. anatis* tanto en presencia de NE como con E, a las 24 y 48 h, mientras que a las 72 h no hubo un cambio significativo con respecto el grupo control (Figura 2).

## Dispersión biopelícula de *G. anatis*

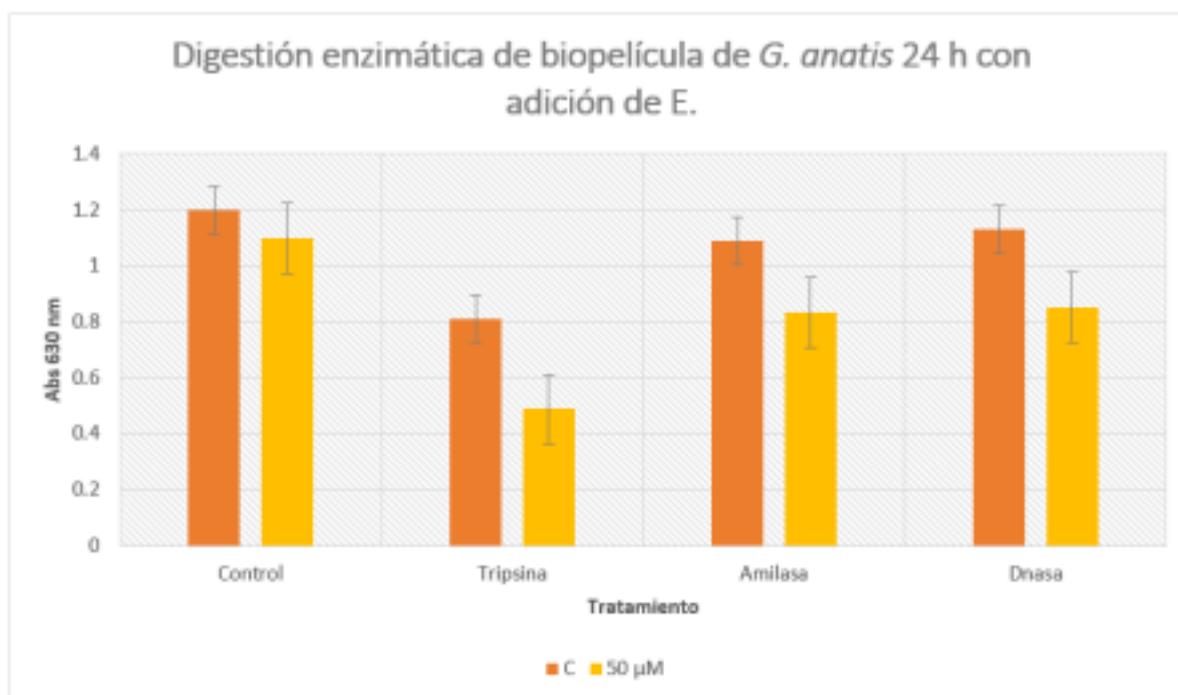


**Figura 2.** Dispersión de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 a las, 48 y 72 h en presencia y ausencia de catecolaminas. Sin adiciones de hormona el Control (C), con 50  $\mu$ M de Norepinefrina (NE) y Epinefrina (E), (\*) indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

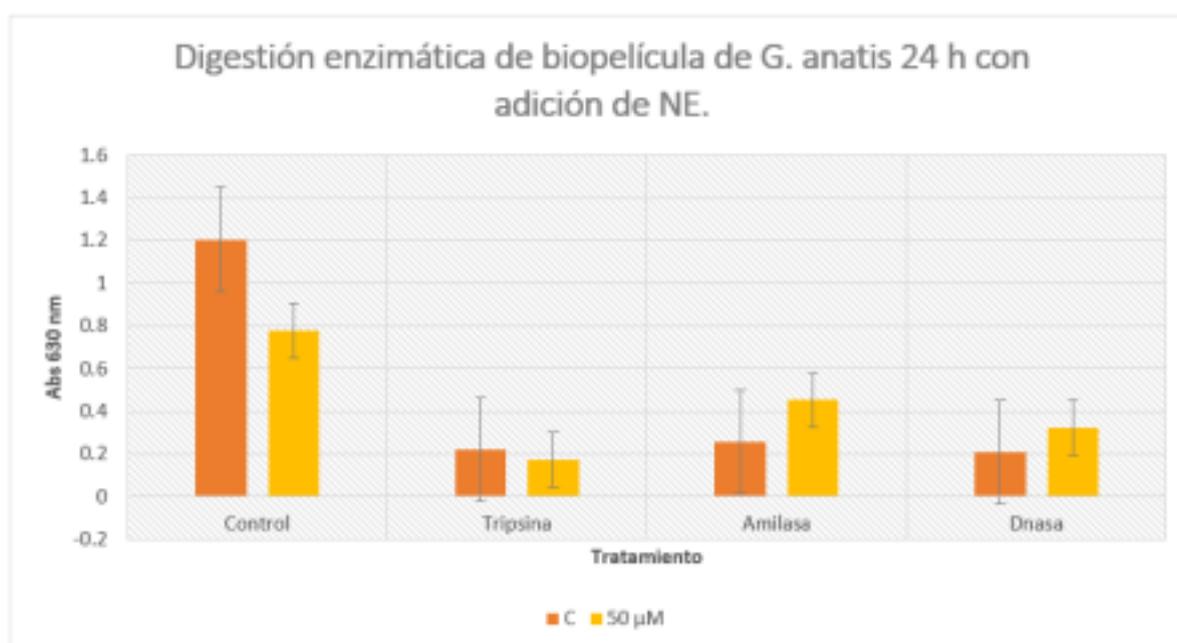
### Digestión enzimática

Para conocer las proporciones relativas de los exopolímeros presentes en biopelículas de 24, 48 o 72 h, estas fueron digeridas con Tripsina (Proteínas), Amilasa (Carbohidratos), o Dnasa (ADN).

A las 24 h en presencia de E, se observa un incremento en la proporción de proteínas, carbohidratos y DNA, siendo más evidente el incremento de proteínas (Fig. 3). Mientras que, con adición de NE, las tres enzimas empleadas reducen drásticamente la biopelícula, sugiriendo existe incremento homogéneo en la cantidad de exopolímeros presentes (Fig. 4).



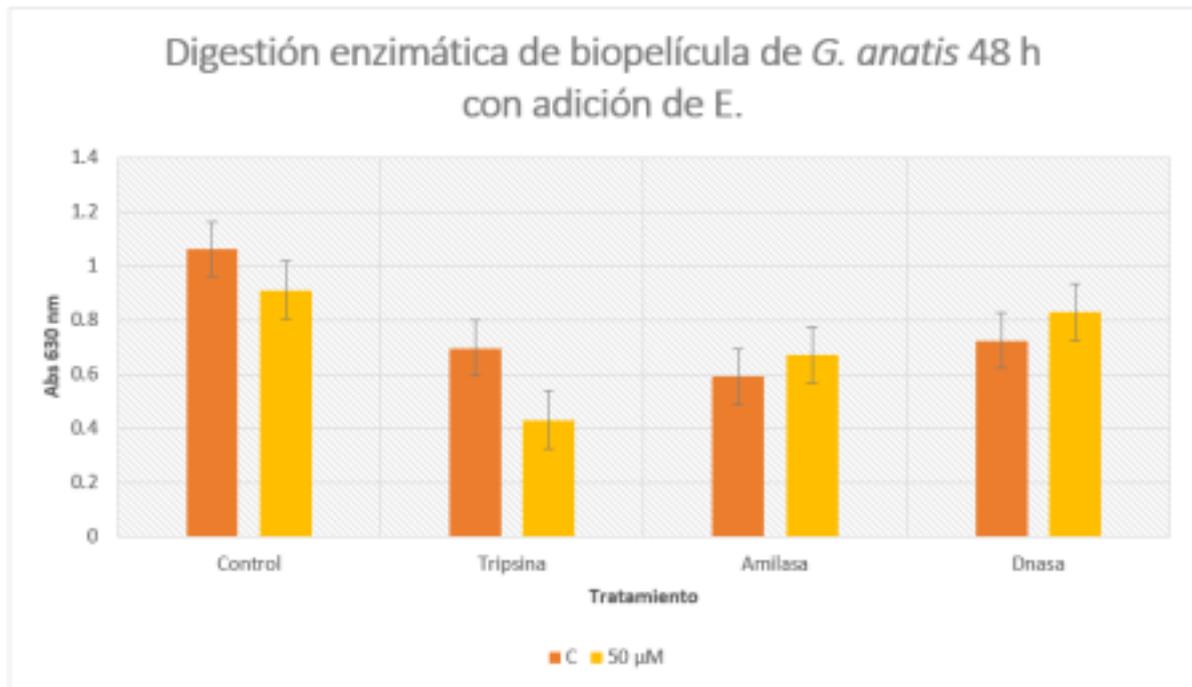
**Figura 3.** Digestión enzimática de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 de 24 h. Sin adiciones control (C), con 50 μM de epinefrina (E).



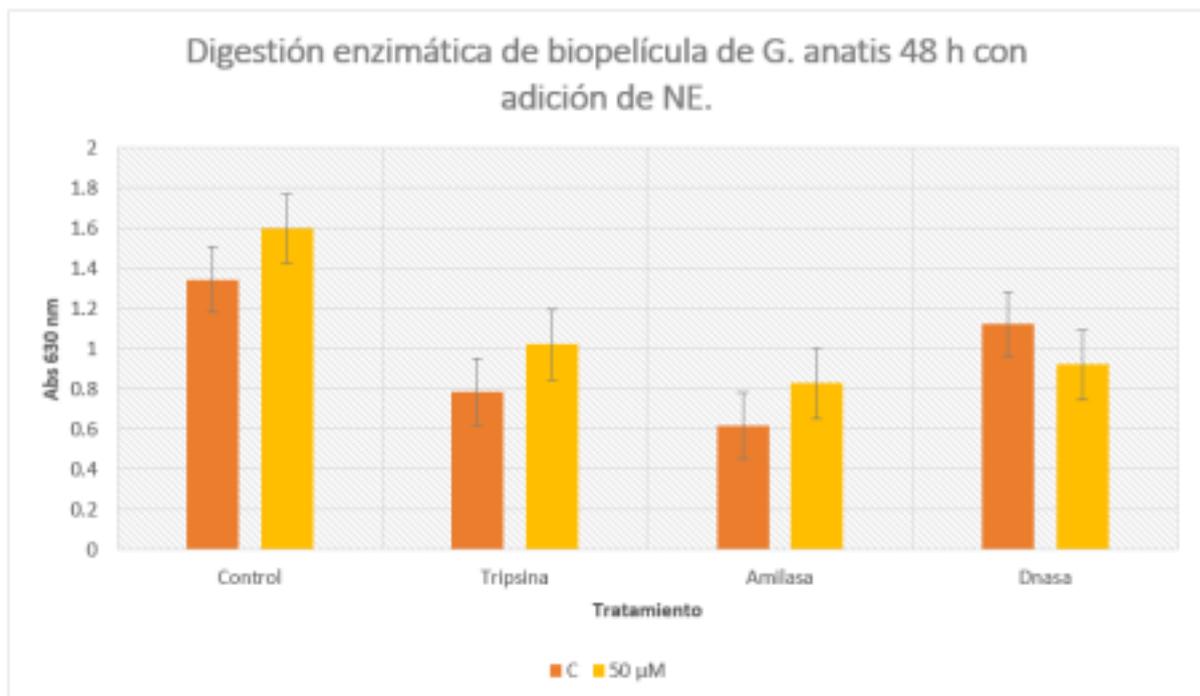
**Figura 4.** Digestión enzimática de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 de 24 h. Sin adiciones control (C), con 50 μM de norepinefrina (NE).

En biopelículas de 48 h, en presencia de E, la digestión enzimática con tripsina muestra una diferencia significativa con respecto al control, lo cual sugiere que hay una mayor presencia de proteínas, mientras que la cantidad de carbohidratos y ADN no cambia con respecto al control (Fig. 5). Por otro lado, en biopelículas inducidas en presencia de NE, no se observan cambios significativos, con respecto al control,

en las proporciones de los diferentes exopolímeros (Fig. 6).

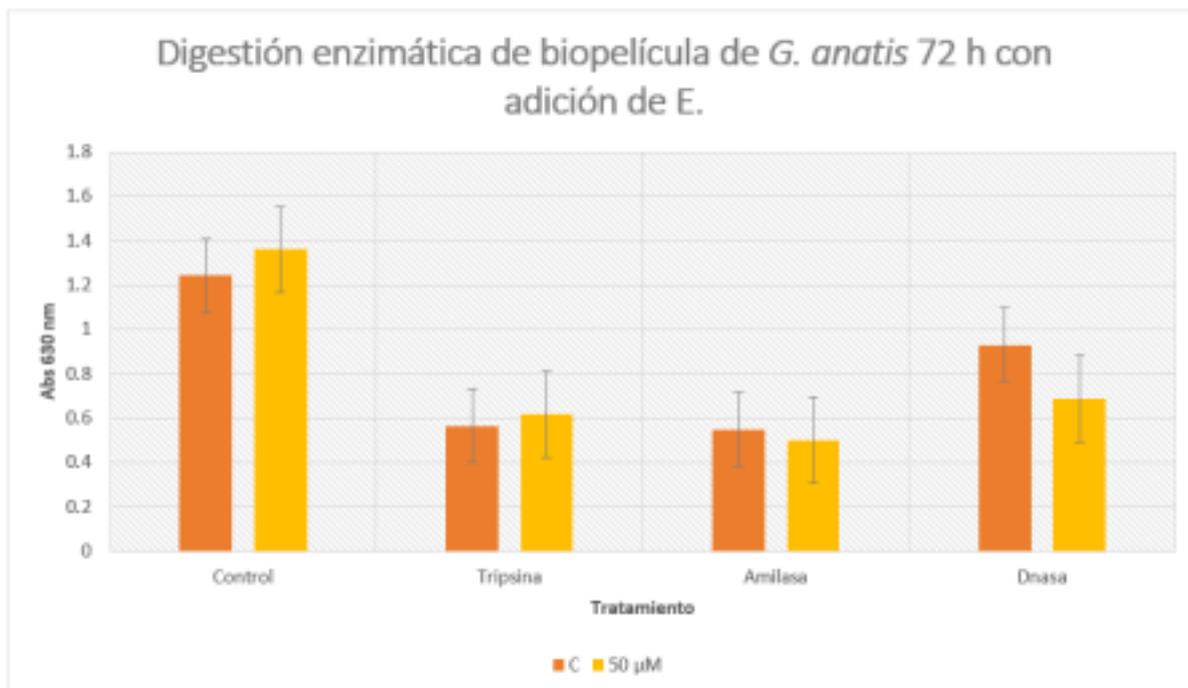


**Figura 5.** Digestión enzimática de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 de 48 h. Sin adiciones control (C), con 50  $\mu$ M de epinefrina (E).

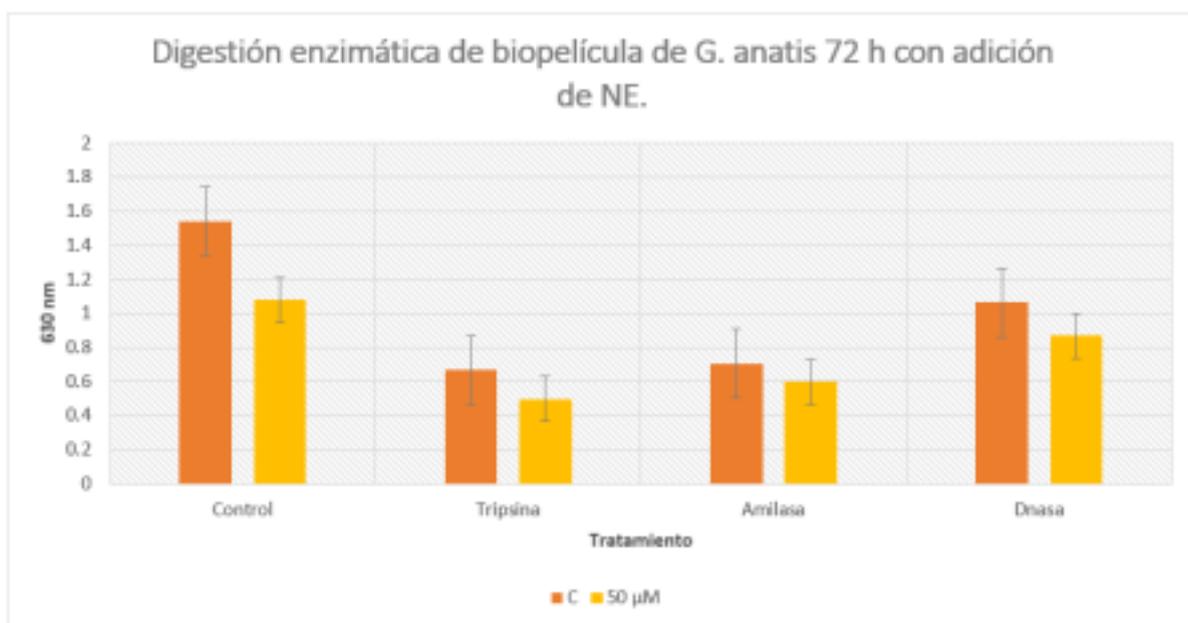


**Figura 6.** Digestión enzimática de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 de 48 h. Sin adiciones control (C), con 50  $\mu$ M de norepinefrina (NE).

En el caso de las biopelículas en presencia de E y NE a las 72 h, no se observa una disminución significativa en las proporciones de los diferentes exopolímeros entre ambas enzimas y sus respectivos controles (Fig. 7 y 8).



**Figura 7.** Digestión enzimática de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 de 72 h. Sin adiciones control (C), con 50 µM de epinefrina (E).

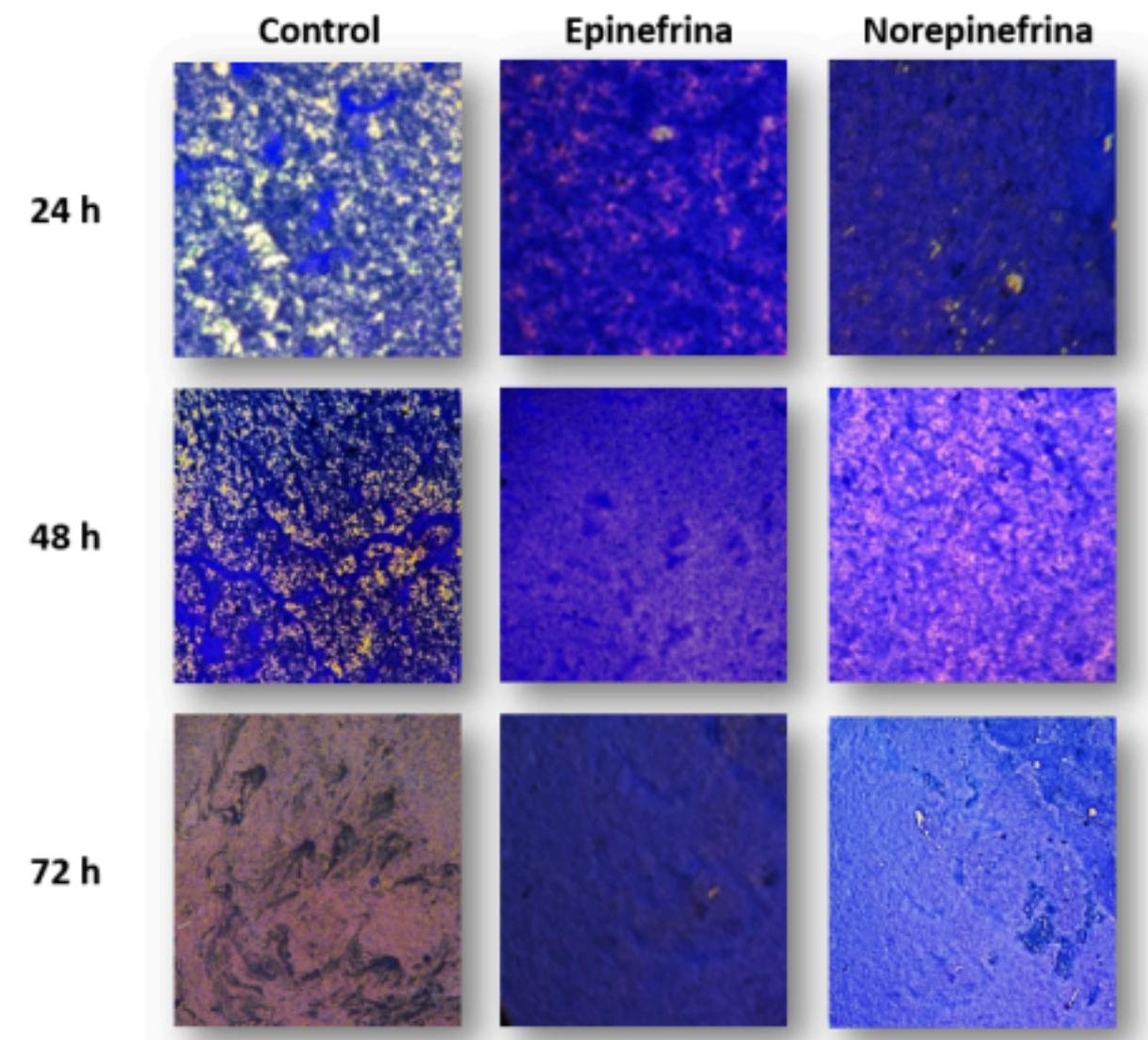


**Figura 8.** Digestión enzimática de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 de 72 h. Sin adiciones control (C), con 50 µM de norepinefrina (NE).

### Observaciones microscópicas

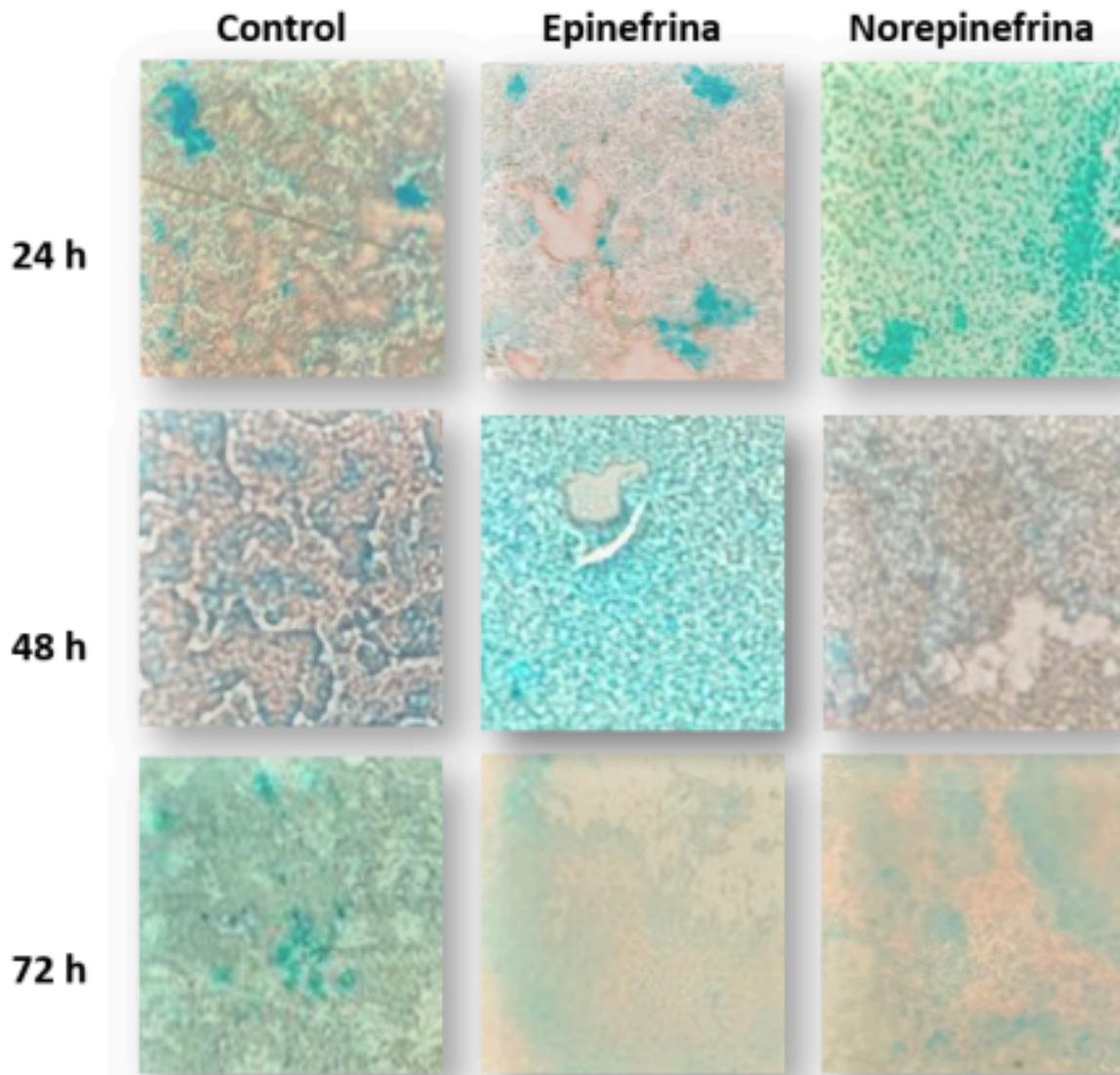
En biopelículas de los tres intervalos de tiempo (24, 48 y 72 h) probados, con la ausencia (C) o adición de catecolaminas (NE) y (E), se pueden observar cambios evidentes en la composición exopolimérica.

En la tinción con azul Coomassie para detectar proteínas, se observa una tinción más intensa de la biopelícula en presencia de NE y E (Fig. 9) lo que indica una mayor cantidad de proteínas.



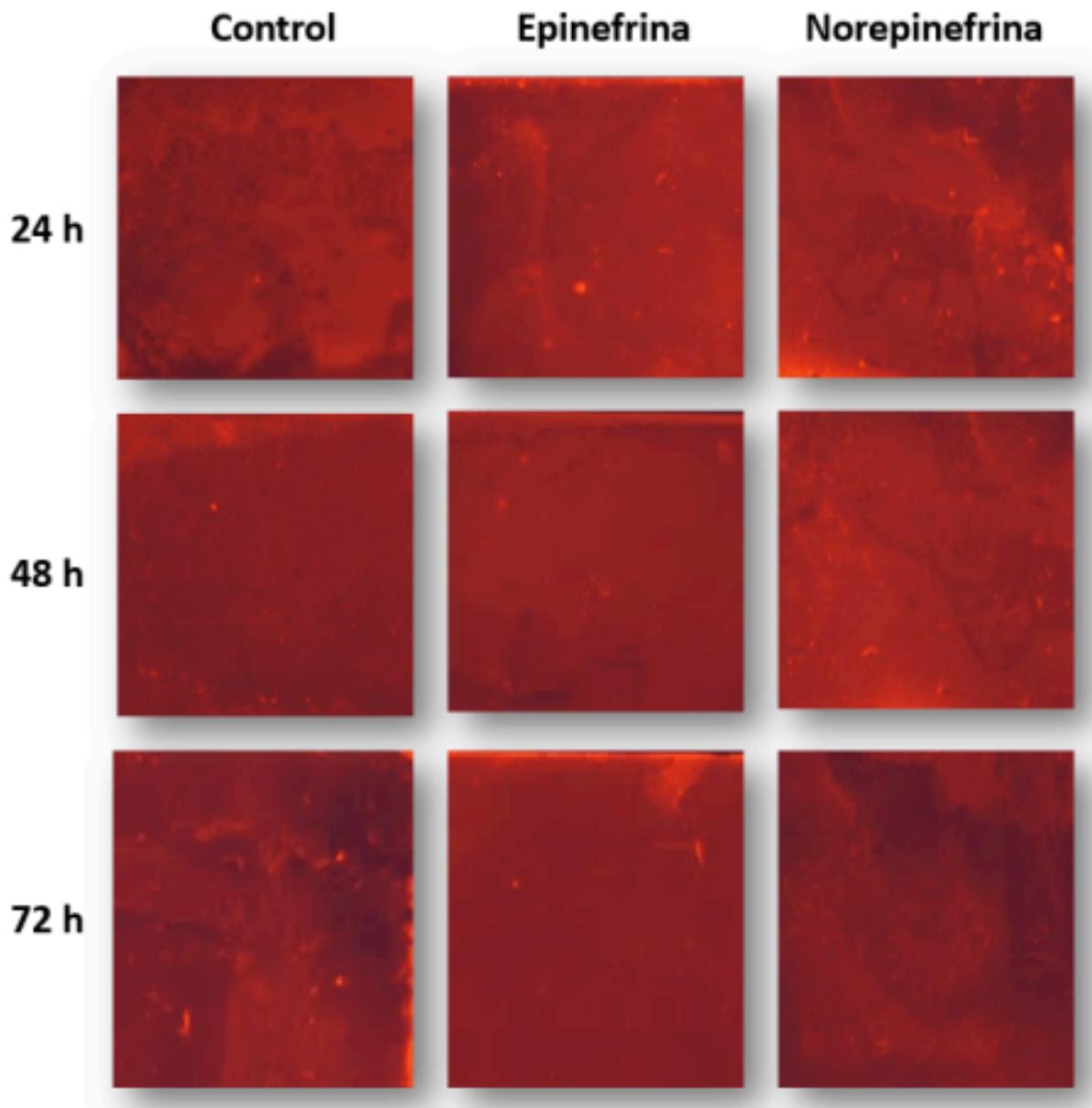
**Figura 9.** Biopelículas de *G. anatis* 12656-12 teñidas con azul de Coomassie a las 24, 48 y 72 h de formación en presencia o ausencia de NE y E. Imágenes observadas a una amplificación de 4x con un microscopio óptico.

Al teñir con azul Alcian para visualizar carbohidratos, se puede observar una mayor tinción en la biopelícula con NE a las 24 h, mientras que en presencia de E este incremento ocurre hasta las 48 h; a las 72 h se aprecia una disminución de la tinción con respecto al control (Fig. 10) en biopelículas con NE y E.



**Figura 10.** Biopelículas de *G. anatis* 12656-12 teñidas con azul Alcian a las 24, 48 y 72 h de formación en presencia o ausencia de NE y E. Imágenes observadas a una amplificación de 4x con un microscopio óptico.

Con la tinción para visualizar ADN presente en la biopelícula, no se observaron diferencias significativas entre los controles y las biopelículas en presencia de NE o E a lo largo del periodo de formación (Fig. 11).



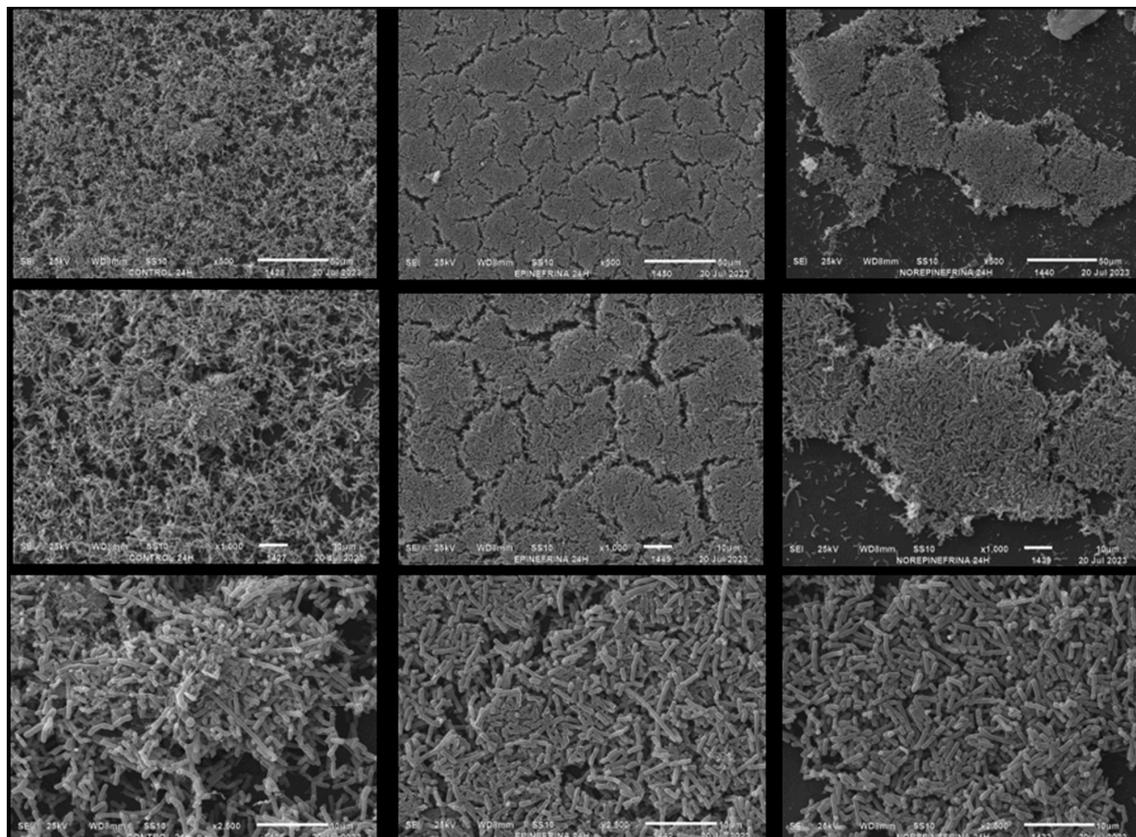
**Figura 11.** Biopelículas de *G. anatis* 12656-12 teñidas con GelRed a las 24,48 y 72 h de incubación en presencia o no de NE y E. Imágenes observadas en un transiluminador con luz UV.

### Microscopía electrónica de barrido

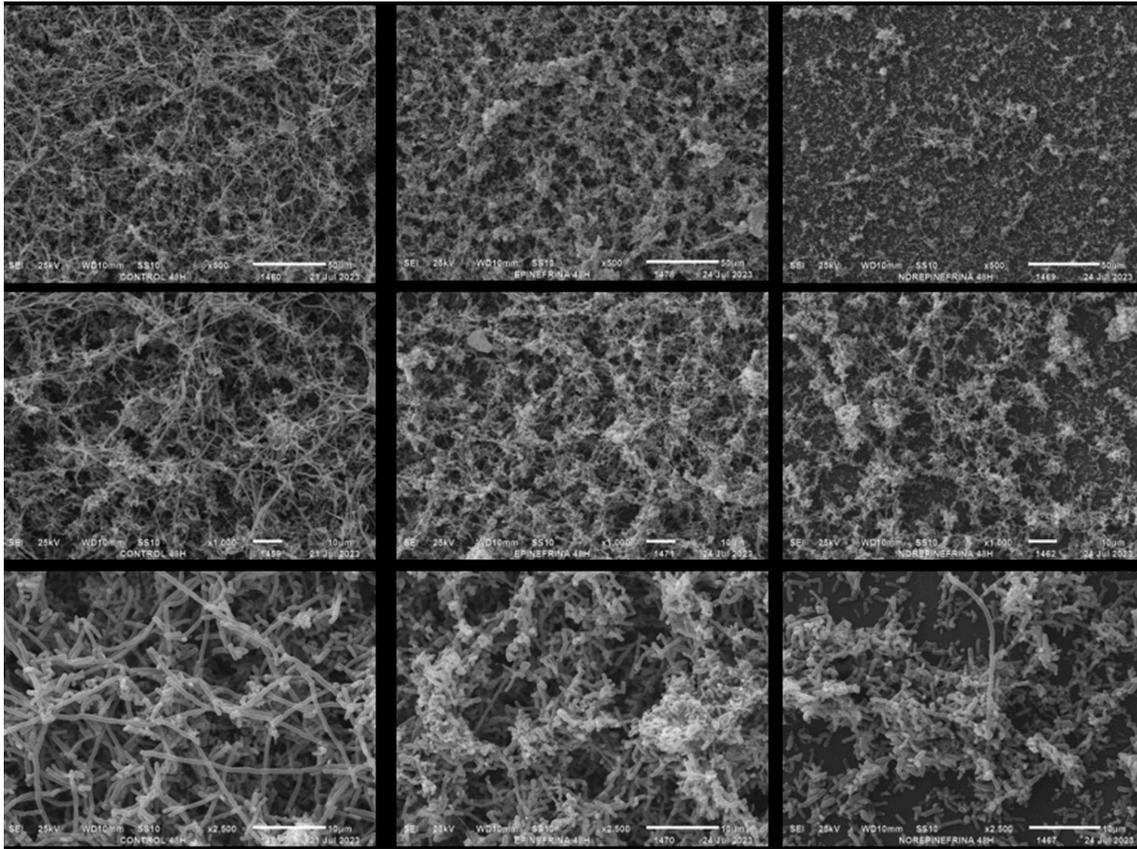
La apariencia general de la ultraestructura de la biopelícula de *G. anatis* formada fue observada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se realizaron observaciones a 500, 1000 y 2500 x, en biopelículas inducidas en presencia o no de NE y E. Dando como resultado biopelículas con diferente apariencia en su ultraestructura, a las 24 h se observan biopelículas con apariencia homogénea con algunas bacterias visibles bajo un manto de material extracelular, que presentan

huecos intersticiales que las separan (Fig. 12). En presencia de hormonas, se observa una compactación fragmentada de la biopelícula. En presencia de NE se aprecia una disminución de la cantidad de biopelícula.

A las 48 h, se observan biopelículas con material extracelular heterogéneo que aparece como láminas, hilos y gránulos y muchas células visibles con morfologías heterogéneas, que incluyen formas alargadas (Fig. 13). En presencia de hormonas, se aprecia una disminución de estas formas alargadas, en presencia de E y prácticamente su desaparición en presencia de NE. La disminución de la cantidad de biopelícula en presencia de NE, es más evidente.



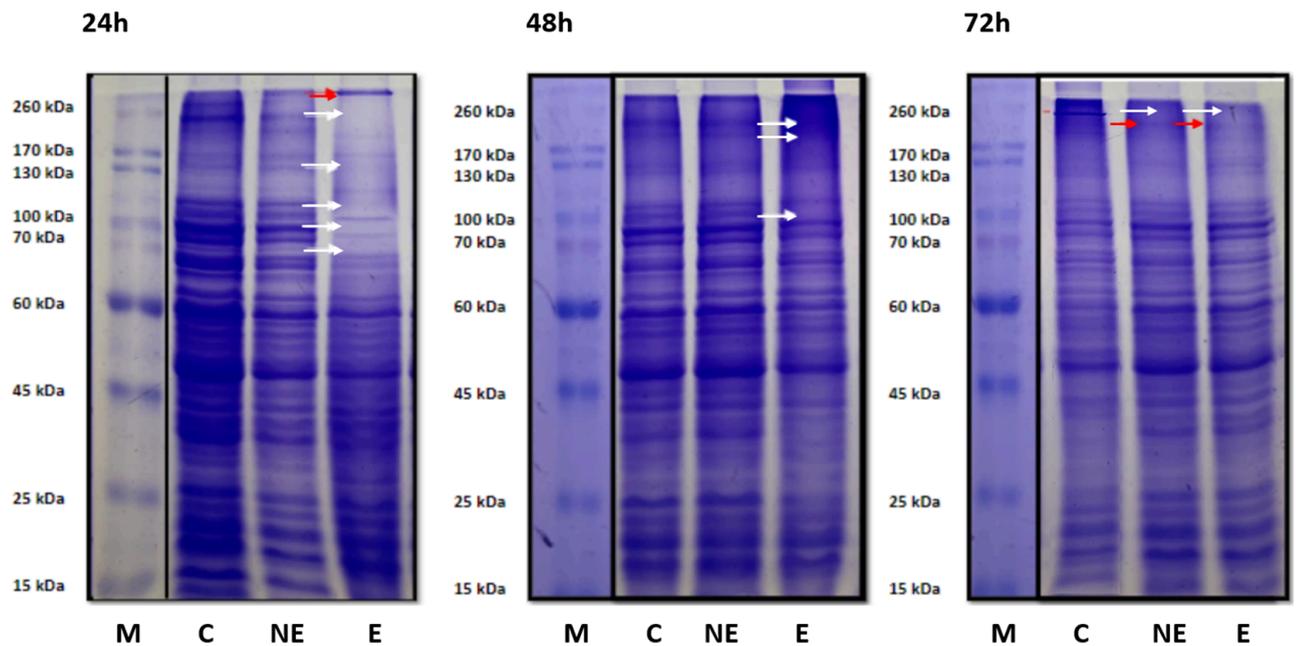
**Figura 12.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la biopelícula de *G. anatis* 12656-12 a las 24h de formación en presencia o no de NE y E.



**Figura 13.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la biopelícula de *G. anatis* 12656-12 a las 48 h de formación en presencia o no de NE y E.

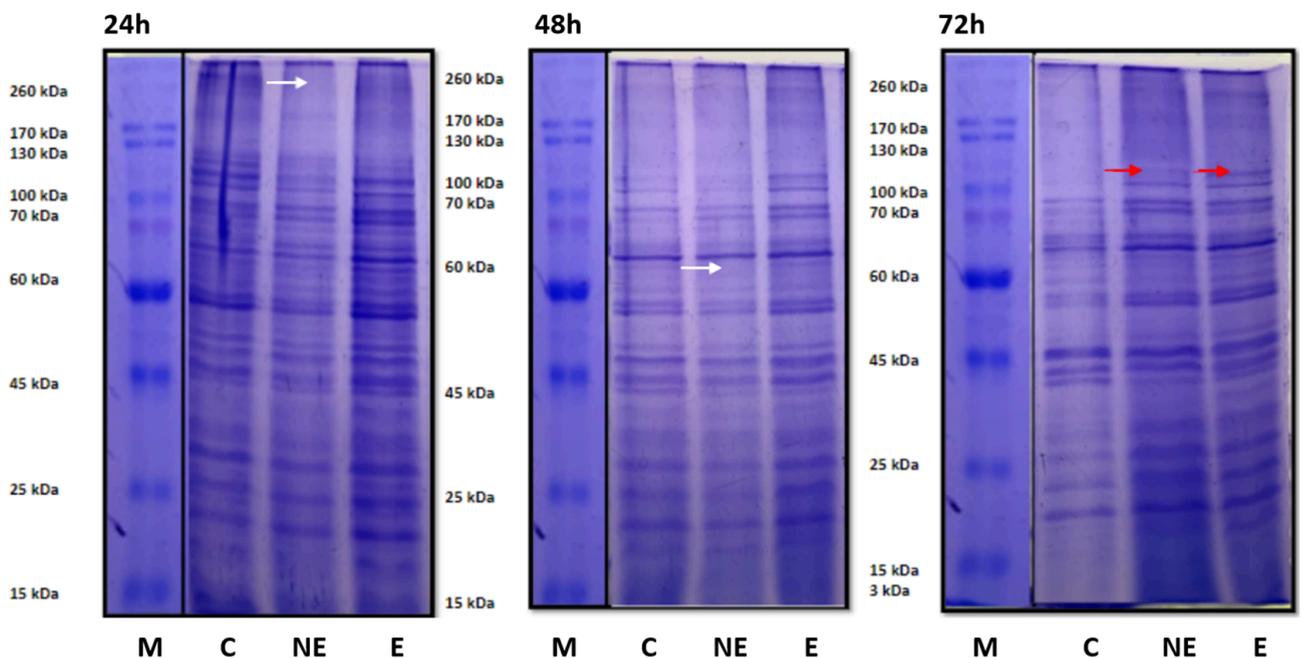
### Patrón de proteínas

En el patrón de proteínas totales se observa que la adición de catecolaminas induce la expresión y disminución de bandas. A las 24 h (Fig. 14) en presencia de E se induce la expresión de una banda en 260 kDa y una disminución de bandas aproximadamente en 70, 100, 130, 180 y 200 kDa. A las 48 h (Fig. 14) con E hay una disminución en bandas de 110, 130 y 200 kDa, mientras que a 72 h (Fig. 14) hay una expresión de bandas tanto para E como para NE en los 200 kDa.



**Figura 14.** Patrón de proteínas totales de muestras de biopelícula de *G. anatis* 12656-12 en gel SDS-PAGE al 10 %. MPM, Control, NE, E. A las 24, 48 y 72 h. Las flechas blancas representan la disminución de bandas y las flechas rojas la expresión de bandas.

En el patrón de proteínas secretadas se observa que la adición de catecolaminas induce la expresión y disminución de bandas. A las 24 h (Fig. 15) con adición de NE se observa una disminución de una banda a los 200 kDa y en NE la expresión de una banda en aproximadamente los 40 kDa. A las 48 h (Fig. 15) se observa una disminución en bandas de 65, 110 y 120 kDa, mientras que a 72 h (Fig. 15) hay una expresión de bandas a 110 y 120 kDa para NE y para E en los 45, 110 y 120 kDa.



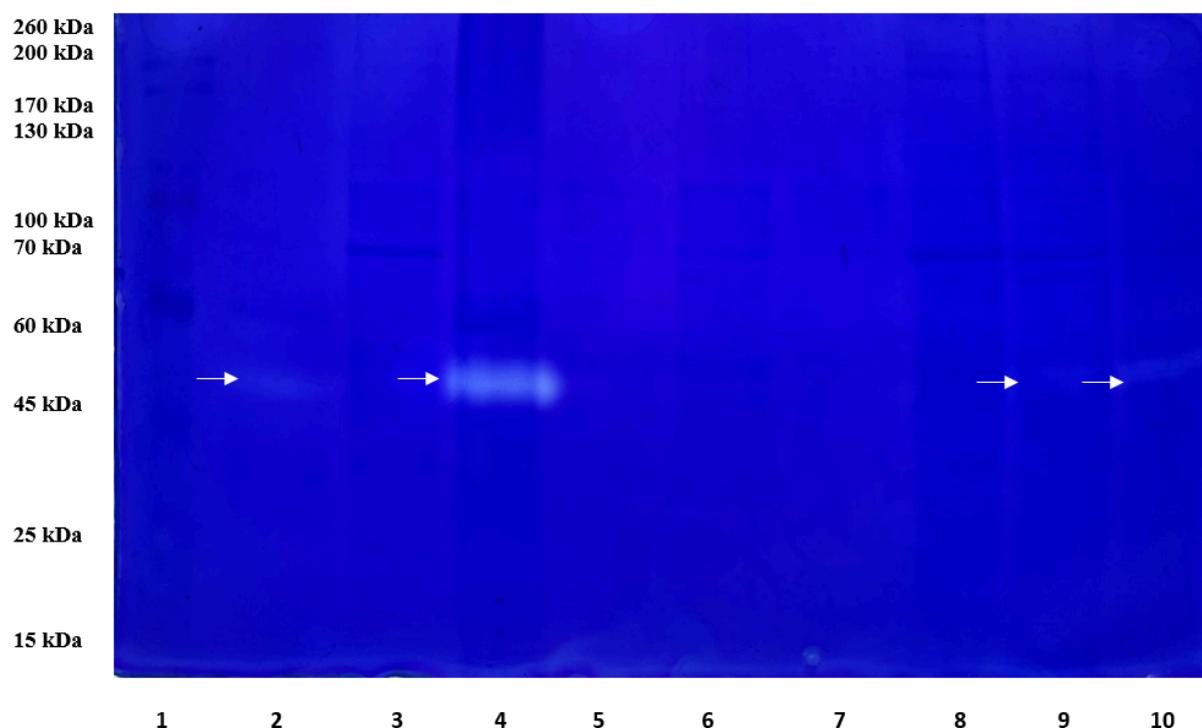
**Figura 15.** Patrón de proteínas secretadas de muestras de biopelícula de *G. anatis*

12656-12 en gel SDS-PAGE al 10 %. MPM, Control, NE, E. A las 24, 48 y 72 h. Las flechas blancas representan la disminución de bandas y las flechas rojas la expresión de bandas.

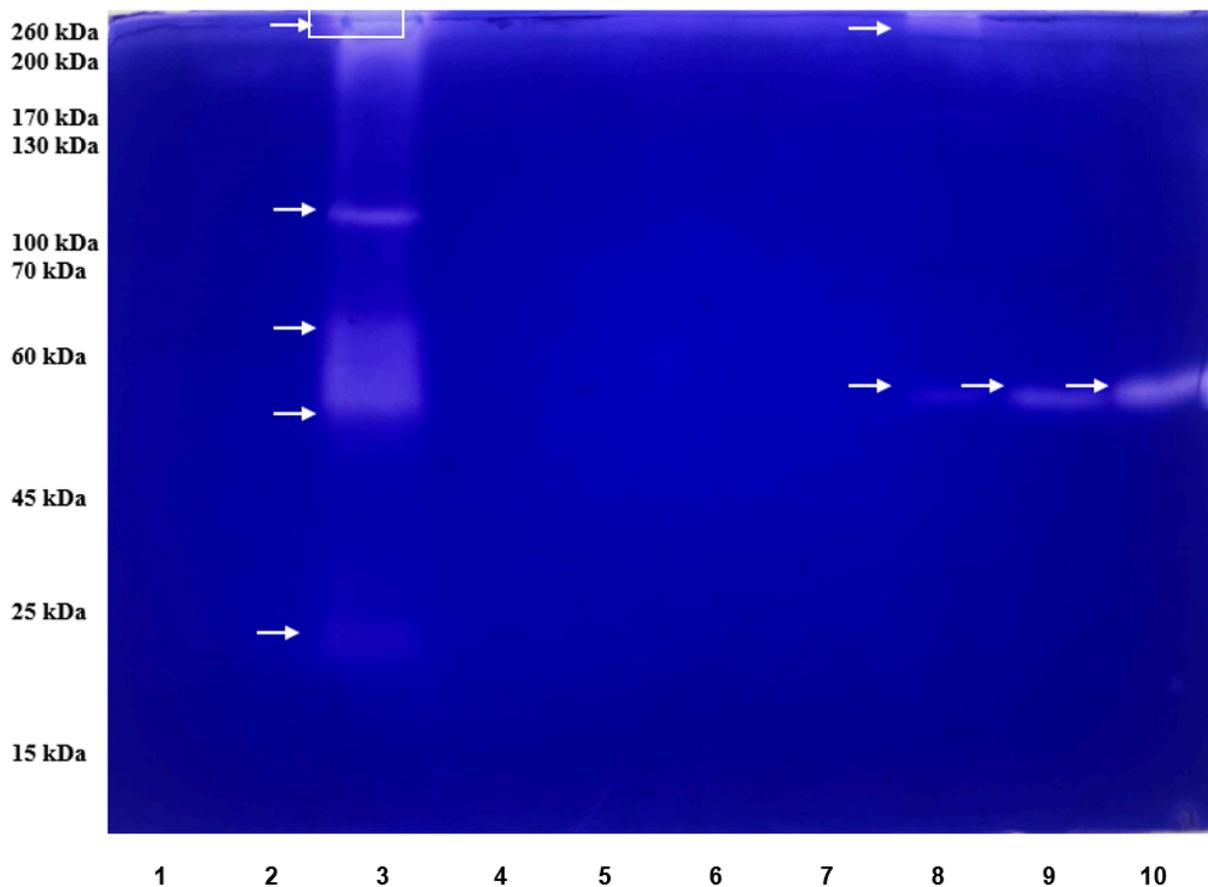
## Zimograma

Para determinar si la presencia de catecolaminas provoca cambios en la actividad proteolítica expresada en la biopelícula de *G. anatis*, las muestras de proteínas secretadas y totales fueron separadas por electroforesis en zimogramas con gelatina porcina al 1%.

En muestras de proteínas totales de *G. anatis* en 24 h en C y con adición de NE se observó actividad proteolítica en una banda de aproximadamente 45 kDa (Fig. 16). Esta misma banda de actividad se observa a las 72 h en muestras con NE. Con respecto a las proteínas secretadas en 24 h se observa actividad proteolítica con adición de NE en bandas de 20, 50, 65, 100 y 260 kDa. A las 72 h en la muestra C, se observa una banda de 260 kDa y a 55 kDa en las muestras C, NE y E (Fig. 17).



**Figura 16.** Zimograma 10% con gelatina porcina 1% de proteínas totales por *G. anatis* 12656-12, MPM (carril 1) a las 24 (carriles 2-4), 48h (carriles 5-7), 72h (carriles 8-10). Las flechas blancas indican los cambios observados.



**Figura 17.** Zimograma 10% con gelatina porcina 1% de proteínas secretadas por *G. anatis* 12656-12, MPM (carril 1) a las 24 (carriles 2-4), 48h (carriles 5-7), 72h (carriles 8-10). Las flechas blancas indican los cambios observados.

## Discusión

*G. anatis* es un microorganismo relevante en la industria avícola y en el sector de la salud animal (Ojeda, 2020), debido a que es un patógeno oportunista, que como se ha mencionado puede dispersarse en el organismo cuando se encuentra estresado e inmunodeprimido causando una variedad de enfermedades en aves tales como peritonitis, salpingitis, aerossaculitis, etc (Mendoza et al., 2014; Neubauer et al., 2009; Paudel et al., 2013; Paudel et al., 2014).

El estrés es una respuesta biológica adaptativa que prepara al organismo para enfrentar cualquier tipo de desafío, pero puede tener consecuencias negativas si se prolonga. En las bacterias las hormonas del estrés o catecolaminas pueden influir significativamente en la expresión de sus factores de virulencia. Se ha observado que las catecolaminas E y NE, influyen directamente en la colonización de bacterias

Gram negativas como *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Pseudomonas aeruginosa* (Kendall y Sperandio, 2016).

El incremento en la concentración de estas hormonas, además de disminuir la respuesta inmune de su hospedero, parece regular la expresión de los factores de virulencia, tal como describe Rea en 2022, reportando que las catecolaminas E y NE afectan el crecimiento y expresión de factores de virulencia de *G. anatis*.

Las biopelículas son estructuras microbianas complejas, incrustadas en una matriz extracelular de proteínas, ADN y carbohidratos, su formación es una estrategia adaptativa de muchas bacterias para protegerse de factores estresantes externos y protegerse del sistema inmune del hospedador y de los antimicrobianos (Venkatesan et al., 2015).

En el presente estudio se quiso saber si la E y NE inducen cambios en la composición y estructura de la biopelícula de *G. anatis*, se observó que la presencia de NE induce una disminución del 50% en la biopelícula en comparación con las biopelículas inducidas en presencia de E o sin catecolaminas (Fig. 1). Además, en las biopelículas preformadas, la adición de E o NE también disminuye la biopelícula, lo que sugiere una dispersión de la biopelícula (Fig. 2). También se ha descrito una dispersión de biopelículas a otros microorganismos en presencia de catecolaminas u hormonas sexuales (Pillai et al., 2018; Ramírez Paz y Puente et al., 2023).

Se ha descrito que los exopolímeros de biopelículas se producen en diferentes proporciones dependiendo de los microorganismos involucrados y de la etapa de formación de la biopelícula en que se encuentren. Estos exopolímeros se han visualizado sobre la biopelícula utilizando colorantes afines a las propiedades bioquímicas de cada molécula (Fig. 9, 10 y 11). Su digestión con tripsina (Fig. 3 y 5), sugiere que las proteínas son el componente principal en presencia de catecolaminas; un resultado similar se observó para carbohidratos teñidos con azul Alcian (Fig 10.), datos que concuerdan con los de García et al. en 2020, quién reportó que en la biopelícula de *A. seminis* las proteínas eran su componente principal.

La presencia de E induce una disminución en la expresión de proteínas totales en el rango de 70 a 200 kDa. Mientras que se observa la inducción en la expresión de proteínas secretadas de entre 110-120 kDa, en presencia de NE. Se precisa seguir estudiando estos cambios en los patrones de proteínas y tratar de identificar estas proteínas expresadas diferencialmente las cuales podrían estar participando en la dispersión de la biopelícula.

En los zimogramas realizados se observó actividad proteolítica de alto peso molecular y de 110, 65, 55, o 20 kDa en presencia de NE a las 24h. La banda de actividad proteolítica 55 kDa se incrementa a las 72h en presencia de E o NE. Este aumento de la actividad proteolítica podría estar relacionado en la participación de daño a tejidos y la dispersión de la biopelícula, tal como es el caso de *Porphyromonas gingivalis*, esta bacteria produce múltiples proteasas que son fundamentales para su colonización y persistencia en el ambiente oral, así como en la evasión de la respuesta inmune del hospedero y el daño al tejido periodontal. La actividad proteolítica de estas enzimas contribuye directamente a la destrucción del tejido conectivo y avance de la enfermedad.

Las principales enzimas proteolíticas que produce esta bacteria son las gingipaínas las cuales tienen un papel crucial en la patogénesis de la enfermedad periodontal al facilitar la colonización de esta bacteria, degradación de tejidos periodontales y la modulación de la respuesta inmune del hospedero. Además de mejorar las interacciones de *P. gingivalis* con otros patógenos periodontales, incluidos *Tannerella forsythia*, *T. denticola* y *A. actinomycetemcomitans*, para facilitar su supervivencia y formación de biopelículas (Xu et al., 2020).

Los cambios observados en la biopelícula de *G. anatis*, en presencia de hormonas, en cuanto a la morfología celular y el aspecto de la biopelícula, podría sugerir que las catecolaminas participan en la dispersión de la biopelícula y también en indicarle a la bacteria en donde se encuentra, pues el cambio en morfología celular: cambio de forma filamentosa a bacilo, es un cambio que se ha observado en *Candida albicans*, un hongo dimórfico patógeno oportunista de humanos, que cambia su morfología celular, como una forma de evadir la respuesta defensiva de

su hospedero y de dispersarse a otros tejidos, y esta respuesta está mediada por moléculas de QS producidas por bacterias (Bor et al., 2016).

La forma de vida en biopelícula de *G. anatis* descrita en este trabajo muestra las propiedades que puede adquirir una bacteria y brinda información con respecto a su estructura y composición, con lo cual es posible plantear preguntas de investigación futuras que contribuyan al entendimiento de la patogénesis de *G. anatis* tanto en el ambiente como en su hospedero.

### **Conclusiones**

- La adición de NE o E afecta la composición y estructura de la biopelícula de *G. anatis*.
- Las proteínas son el componente principal de la biopelícula de *G. anatis*.
- La adición de NE o E disminuye la formación de biopelícula de *G. anatis* e induce su dispersión.
- La presencia de NE o E cambia la morfología celular y de la ultraestructura de la biopelícula de *G. anatis*.
- La presencia de hormonas NE o E inducen cambios en los patrones de proteínas de la biopelícula de *G. anatis*.
- La presencia de NE o E induce la expresión de la actividad proteolítica de la biopelícula de *G. anatis*.

### **Perspectivas**

- Identificación y caracterización de algunas de las proteínas inmunogénicas de la biopelícula de *G. anatis* expresadas en presencia de catecolaminas.
- Identificación y caracterización de proteasas.
- Formación de biopelícula en cultivos celulares.

## Referencias

- Bisgaard M. (1993). Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 279:7-26.
- Blanco J. (2019). Estudio retrospectivo de *Gallibacterium anatis* en gallinas ponedoras y pollos de engorde, durante el período Enero 2013. *Universidad de San Carlos de Guatemala*.
- Bojesen, A. M., Nielsen, S. S., Bisgaard, M. (2003). Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. *Avian Pathology*, 32(5), 503–510.
- Bojesen, A. M., Nielsen, O. L., Christensen, J. P., Bisgaard, M. (2004). In vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens. *Avian Pathology*, 33(2), 145–152.
- Bolívar V., A.F., Torres C., M.I., Sánchez N., Y. Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* como mecanismos de resistencia y tolerancia a antibióticos. Revisión narrativa. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca*.
- Bor B., Cen L., Agnello M., Shi W., He X. (2016). Morphological and physiological changes induced by contact-dependent interaction between *Candida albicans* and *Fusobacterium nucleatum*. *Sci. Rep.* 14 (6), 27956. doi: 10.1038/srep27956
- Boukahil, I., Czuprynski, C.J. (2015) Characterization of *Mannheimia haemolytica* biofilm formation in vitro. *Veterinary Microbiology*, 175(1):114-22.
- Boyanova L. (2017). Stress hormone epinephrine (adrenaline) and norepinephrine (noradrenaline) effects on the anaerobic bacteria. *Anaerobe*, 44:13-19.
- Cambrónel 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.
- Cambrónel 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.
- Cárdenas P., M. E., Cruz y López, O. R., Gándara R., J. L., Pérez H., M. A. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos* 94. 35-43.
- Chávez F., Barrios R., Xóchihua J., Chávez J., León J., Yanes M., Escalante J. (2017). Resistencia antimicrobiana de *Gallibacterium anatis* aisladas de gallinas de

postura comercial en Sonora , México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(3), 305–312.

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.

El-Adawy, H., Bocklisch, H., Neubauer, H. *et al.* Identification, differentiation and antibiotic susceptibility of *Gallibacterium* isolates from diseased poultry. *Irish Veterinary Journal*, 71, 5 (2018).

Flemming, H.C., Wingender J, Griebe T, Mayer C (2000) Physico-chemical properties of biofilms. *Biofilms: recent advances in their study and control*, CRC press, 19–34.

Flemming, H.C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 8:623-33.

Fredheim E., G.A., Klingenberg, vbggv1| C., Rohde, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flægstad, T., y Sollid, JE (2009). Formación de biopelículas por *Staphylococcus haemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (4), 1172-1180.

García G., E., Vaca, S., Pérez M., A., Ibarra C., J., Pérez M., V., Tenorio, V. R., Negrete A., E. (2005). *Gallibacterium anatis* secreted metalloproteases degrade chicken IgG. *Avian Pathology*, 34(5), 426-429.

García J.F.M., Rojas, L., Zenteno, E., Vazquez, C., Negrete A., E. (2020). Characterization of *Actinobacillus seminis* biofilm formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(9):1371-1383.

Glaser, R., Kiecolt G., 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. Identification , differentiation and antibiotic susceptibility of *Gallibacterium* isolates from diseased poultry. *Irish Veterinary Journal*, 71(5), 1–10.

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.

Grössner, S. B., Teichmann J., Hannig M., Dörfer C., Wenderoth D.F., Ott S.J. Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clinical Oral Implants Research*. 2009; 20:817-26.

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.

Kendall, M. M., Sperandio, V. (2016). What a dinner party! Mechanisms and functions of interkingdom signaling in host-pathogen associations. *mBio*, 1;7(2):e01748.

Klausen M, Heydorn A., Ragas P., Lambertsen L., Aaes A., Molin S. y Tolker N., T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48:1511-1524.

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

Kristensen, Bodil M., Frees, D., Bojesen, A. M. (2011). Expression and secretion of the RTX-toxin GtxA among members of the genus *Gallibacterium*. *Veterinary Microbiology*, 21;153(1-2):116-23.

Kumar, C.G., Anand S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 42: 9-27.

Lappin-Scott H, Burton S, Stoodley P. (2014). Revealing a world of biofilms the pioneering research of Bill Costerton. *Natures Review Microbiology*.12:781-7.

Lasa, I., Pozo, J. L. del, Penadés, J. R., Leiva, J.. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163-175.

Lawal, J., Ndahi, J., Dauda, J., Gazali, Y., Gadzama, J., Aliyu, A. (2018). Survey of *Gallibacterium anatis* and Its Antimicrobial Susceptibility Pattern in Village Chickens (*Gallus gallus domesticus*) in Maiduguri, North-eastern Nigeria. *International Journal of Veterinary and Animal Medicine*, 1(1), 1–7.

Lembre, P., Lorentz, C. and Di Martino, P. (2012). Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World. In: Karunaratne, D.N., Ed., The Complex World of Polysaccharides, *InTech*, 371-392.

Limoli, D.H., Jones, C.J., Wozniak, D.J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology Spectrum*, 3(3):10.1128.

Martí, M., Trotonda, M.P., Tormo M., M.Á., Vergara I., M., Cheung, A.L., Lasa, I., Penadés, J.R. (2010) Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection*, 12:55–64.

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.

Michael G, B., Bossé JT, Schwarz S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Pasteurellaceae* of Veterinary Origin. *Microbiology Spectrum*, 6(3).

Miranda E., L.I., Ruíz R. M., Molina L., J, Parra R., I, González V., E, Castro A., N. (2017). Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 35(7):426-433 p.

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

Neubauer, C., De Souza, P., 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), 5097-5099.

Ojeda V., A. (2020). *Importancia de Gallibacterium anatis en Gallus gallus*. Trabajo de investigación-Bachiller, *Universidad Científica del Sur*, UCSUR-Institucional.

Ortega P., Franco C. R. (2014). Importancia médica del biofilm de *Staphylococcus epidermidis* en las infecciones de prótesis articular. *Investigación en Discapacidad*, 3, 106-113.

Ortega P., S., Hernández Z., E. (2018). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 75(2), 79-88.

Paudel, S., Alispahic, M., Liebhart, D., Hess, M., y 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), 57.

Peters, G., Locci, R., Pulverer, G. (1982). Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *The Journal of Infectious Diseases*, 146(4):479-82.

Pillai, D. K., Cha, E., Mosier, D. (2018). Role of the stress-associated chemicals norepinephrine, epinephrine and substance P in dispersal of *Mannheimia haemolytica* from biofilms. *Veterinary Microbiology*, 215:11-17.

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku, T. C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H. (2015) Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7:493–512.

Ramírez-Paz-Y-Puente G.A., Chávez-Flores CI, Montes-García JF, Sanchez-Alonso PG, Cobos-Justo ME, Vázquez-Cruz C, Zenteno E, Negrete-Abascal E. (2023). Testosterone and estradiol modify the expression of adhesins and biofilm formation in *Actinobacillus seminis*. *FEMS Microbiology Letters*, 17;370:fnad048.

Rather, M.A., Gupta, K. y Mandal, M. (2021) Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52,1701–1718.

Rea H., P. A. (2022). Efecto de la norepinefrina y epinefrina sobre la expresión de factores de virulencia de *Gallibacterium anatis*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

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

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

Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, MFR., y Ha, SD. 2015. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14 (4): 491-509.

Sánchez C. (2011). Bacterial pathogenesis: The importance of first impressions. *Nature Review Microbiology*, 9:630-631.

Singh, S., Singh, B., Sinha, D., Kumar, V., Vadhana, P., Bhardwaj, M., Dubey, S. (2016). *Gallibacterium anatis*: An Emerging Pathogen of Poultry Birds and Domiciled Birds. *Veterinary Science and Technology*, 7(3):324.

Sutherland I., W. (2001). The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9:222–227.

Tsiouris, V., Georgopoulou, I., Batzios, C., Pappaioannou, N., Ducatelle, R. (2015). The effect of cold stress on the pathogenesis of necrotic enteritis in broiler chicks. *Avian Pathology*, 44(6), 430–435.

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

Venkatesan N., Perumal G., Doble M. (2015). Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiology*, 10(11):1743-50.

Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R., Clark, N.C., McDougal, L.K., Flannagan, S.E., Kolonay, J.F., Shetty, J., Killgore, G.E., Tenover, F.C. (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*. 28;302(5650):1569-71.

Xu W., Zhou W., Wang H., Liang S. (2020). Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 120:45-84.

Zhao X., Zhao F., Wang J., Zhong N. (2017) Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv* 7:36670-36683.