



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS REGULADAS
POR HIERRO EN *Avibacterium paragallinarum*

T E S I S

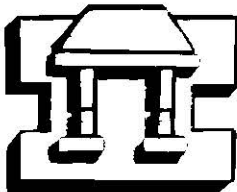
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

NORMA ALEJANDRA LARIOS TOLEDO

ASESOR DE TESIS: DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL



OCTUBRE 2006



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.

Proyecto financiado por:

PAPIIT/IN219203-3

PAPCA-UNAM.

DEDICATORIA

A mis padres, por ser el pilar que ha sostenido mi vida hasta hoy,
por haberme guiado con sus consejos y ejemplos, por haberme
apoyado en todo momento, son los mejores padres que pude tener,
y este es solo un pequeño pago por todo ese esfuerzo,
por todo esto y más MIL GRACIAS PAPAS.

A mis hermanos por haber compartido conmigo este sueño,
por apoyarme siempre y no perder la fe en mi, por escuchar
mis tristezas y alegrías y ser mis cómplices, GRACIAS.

LOS QUIERO MUCHO.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Erasmo Negrete Abascal, por compartir sus conocimientos conmigo, por la paciencia y confianza que me tuvo, pero sobre todo por ser un gran apoyo durante la realización de este proyecto, GRACIAS.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco, por el apoyo, la ayuda y los buenos consejos que me brindo, muchísimas gracias.

A mis revisores: Dr. Diego Julio Arenas Aranda, por sus consejos y apoyo, al Dr. Roberto Velasco García y al Biol. Héctor Barrera Escorcía, por sus sugerencias y revisión de este proyecto, gracias.

A Miguel por haber compartido todo este tiempo conmigo, por haber sido un apoyo muy importante en mi vida y en mi carrera, por compartir los buenos y malos momentos, por los sueños compartidos, por ser mi cómplice, mi novio, mi mejor amigo, mi pareja, por compartir tus conocimientos conmigo, por todo tu apoyo y cariño, pero sobre todo porque se que siempre puedo contar contigo y porque eres una persona muy importante en mi vida, GRACIAS, TE AMO.

A mis compañeros de laboratorio: Angélica, Alina, Marcela, Alberto, Octavio y Paulo, por haber compartido sus conocimientos conmigo y haberme ayudado en mi proyecto, pero sobre todo por su amistad brindada, gracias.

A mis compañeros de generación, muchas gracias por todos esos momentos tan buenos que compartimos, por todos sus consejos y apoyo que me brindaron, nunca los olvidare.

INDICE

1. RESÚMEN_____	1
2. INTRODUCCIÓN_____	2
2.1. Coriza infecciosa	2
2.1.1. Transmisión	2
2.1.2. Signos clínicos	3
2.2. Clasificación	3
2.2.1. Morfología y tinción	4
2.2.2. Requerimientos de crecimiento	4
2.2.3. Propiedades bioquímicas	5
2.3. Clasificación serológica	6
2.4. Inmunidad	7
2.5. Factores de virulencia	7
2.5.1. Lipopolisacáridos (LPS)	9
2.5.2. Hemaglutinina	10
2.5.3. Captación y transporte de hierro	10
2.5.4. Otros	10
2.6. Respuesta al estrés	11
3. ANTECEDENTES_____	13
4. JUSTIFICACIÓN_____	13
5. OBJETIVOS_____	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS_____	15
6.1. Bacteria	15
6.2. Tratamiento del material	15
6.3. Crecimiento de la bacteria	15
6.4. Condiciones para la expresión de proteínas inducidas por estrés por hierro	15
6.5. Electroforesis	16

6.6. Obtención de proteínas de membrana externa	16
6.7. Inmunoreconocimiento	17
7. RESULTADOS_____	18
7.1. Curva de crecimiento	18
7.2. Proteínas expresadas en extractos totales	19
7.3. Proteínas secretadas	21
7.4. Proteínas de membrana externa	22
7.5. Inmunoreconocimiento de OMPs	23
7.6. Inmunoreconocimiento de Proteínas secretadas	25
8. DISCUSIÓN_____	27
9. CONCLUSIONES_____	33
10. BIBLIOGRAFÍA_____	34

1. RESUMEN

La coriza infecciosa (CI) es una enfermedad respiratoria aguda de las gallinas causada por *Av. paragallinarum* (Avpg). Avpg expresa varios factores de virulencia involucrados en su patogenicidad, la gran mayoría de ellos no muy bien estudiados. La respuesta al estrés por falta de hierro ha sido poco estudiada en Avpg. En este trabajo se llevo a cabo la identificación por SDS-PAGE de proteínas expresadas por Avpg al crecerla en un medio restringido de hierro. Se observó una expresión diferencial de proteínas secretadas de 92, 93, 97, 98 y 115 kDa a las 5h de crecimiento, de 59, 92, 93, 97, 98 y 115 kDa a las 12h y de 47, 92, 93, 97, 98 y 115 kDa a las 24h; de proteínas de membrana externa de 49, 80, 93, 98, 112 y 161 kDa a las 5, 12 y 24h; y en extractos totales de 93, 97, 106 y 141 kDa a las 5, 12 y 24h de cultivo, al crecer a Avpg en presencia de dipirydyl 0.25 mM, un quelante específico de hierro. La presencia de dipirydyl en el medio tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano. Esta expresión diferencial no fue detectada cuando la misma bacteria se creció en un medio suplementado con 0.125 mM de citrato férrico, aún cuando el crecimiento se vio favorecido por esta adición. Al usar suero de aves vacunadas y desafiadas o de aves no vacunadas y desafiadas con Avpg las OMPs expresadas diferencialmente y reconocidas fueron 98 y 114 kDa en las muestras con dipirydyl pero no reconocidas por suero de aves libres de patógenos específicos (ALPES). Las proteínas secretadas expresadas diferencialmente en las muestras con dipirydyl fueron de 92, 93, 97, 98 y 115 kDa, sin embargo únicamente se observó inmunoreconocimiento con suero de aves no vacunadas y desafiadas de las proteínas de 92, 97 y 115 kDa y no se observó reconocimiento con el suero ALPES. La expresión de proteínas de Avpg inducidas por crecimiento en medio con bajo hierro podría ser importante para su patogenicidad.

3. ANTECEDENTES

Ogunnariwo y Schryvers, en 1992, examinaron cepas de Avpg y *Av. avium* para determinar los mecanismos de la adquisición de hierro por estas bacterias. Las cepas de Avpg expresaron cuatro proteínas de membrana externa reguladas por hierro de 53, 62, 66 y 94 kDa. Encontrando que las proteínas de 94 y 53 kDa eran receptores de ovotransferrinas, las cuales podrían estar implicados en la adquisición del hierro en Avpg.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el proceso de obtención de hierro en las bacterias es un mecanismo de virulencia dentro del hospedero, a que la CI es una enfermedad de gran impacto en la industria avícola, y a que no se conoce mucho acerca de otras proteínas expresadas que sean reguladas por hierro, así como tampoco se conoce si este tipo de proteínas sean inmunogénicas, en este trabajo se obtuvieron proteínas que modifican su expresión en Avpg cuando existe estrés por hierro.

5. OBJETIVO GENERAL

Obtención de proteínas reguladas por hierro en *Avibacterium paragallinarum*.

Objetivos particulares

- Determinar el efecto del hierro en el crecimiento bacteriano.
- Determinar el tiempo óptimo para la expresión de proteínas por estrés por hierro.
- Obtener proteínas de membrana externa.
- Determinar si las proteínas inducidas por estrés por hierro son inmunogénicas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Bacteria

Se trabajo con *Avibacterium paragallinarum* a6 (Avpg a6) aislada de aves con signos clínicos de CI y caracterizada bioquímica e inmunológicamente (Mena-Rojas y col., 2004) y proporcionada por el laboratorio de Biotecnología Veterinaria S.A. de C.V. (BiovetSA).

6.2. Tratamiento del material

Para eliminar el exceso de hierro en el material a emplear, éste se sumergió durante toda la noche (TN) en un recipiente con una solución de EDTA al 0.5%. Posteriormente, el material se enjuagó con agua desionizada (Zhao y col., 1995).

6.3. Crecimiento de la bacteria

Para el crecimiento de la bacteria, se preparó medio Infusión cerebro corazón (BHI) con agua desionizada en el material previamente tratado con EDTA. Se realizó un precultivo de Avpg a6 en un tubo con 5 ml BHI suplementado con 0.01% NAD⁺/ml, el cual se incubó durante 24h a 37° C en agitación. Se determinó la pureza del cultivo por siembra en placa en presencia de una cepa nodriza.

6.4. Condiciones para la expresión de proteínas inducidas por estrés por hierro

Para determinar el momento en el cual se expresaron las proteínas inducidas por estrés por hierro, se realizó una cinética de crecimiento tomando muestras cada hora durante las primeras 9h de crecimiento y posteriormente a las 12 y 24h. Matraces con BHI suplementados con 0.01% NAD⁺ y un inóculo del cultivo de TN de Avpg a6 al 1% se incubaron en agitación durante el tiempo estipulado anteriormente. Para determinar el efecto de la baja y alta concentración de hierro en el medio, los cultivos se incubaron en agitación durante 3h a 37° C a 150-200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.06-0.09₅₉₅. Enseguida se agregó a un matraz el quelante de hierro, dipiridyl, a una concentración final de 0.15, 0.20 y

0.25 mM; y a otro, citrato de amonio férrico, a una concentración final de 0.125 mM (Zhao y col., 1995). Un matraz sin otra adición que un inóculo de Avpg a6 y 0.01% NAD⁺ se usó como control. Muestras de 5 ml se tomaron cada hora; se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante libre de células se precipitó con sulfato de amonio al 70%, en refrigeración TN. Las proteínas que precipitaron se colectaron por centrifugación a 14,000 rpm/10 min, la pastilla se resuspendió en 100 µl de Tris 20 mM (Deneer y Potter, 1989).

Las células empastilladas se resuspendieron con 100 µl de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 y se hirvieron durante 5 min. Las muestras se cuantificaron por el método de Bradford.

6.5. Electroforesis

Para identificar las proteínas que nos interesaron y el tiempo de incubación en el que se expresaron dichas proteínas, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10, 12 y/o 15%. Al término de la electroforesis, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

6.6. Obtención de proteínas de membrana externa

Una vez que se identificaron el tiempo y la condición en la cual se logró la expresión de estas proteínas, se realizó el mismo procedimiento que en la cinética, pero con un volumen mayor de medio. Una vez obtenidas las células, se resuspendieron en 1 ml de HEPES 10 mM pH 7.4 adicionado con lisozima (0.5 mg/ml), se sonicaron durante 7 ciclos de 10 seg manteniendo las muestras en hielo. Después de la sonicación, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm/2 min, para desechar las células que no se rompieron, el sobrenadante se centrifugó a 14,000 rpm/30 min, la pastilla se resuspendió en 200 µl de HEPES 10 mM y se agregaron otros 200 µl de HEPES 10 mM con 2% de Tritón X-100, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm/30 min, se lavaron sin resuspender en 500 µl de HEPES 10 mM, se centrifugó 2 min a 14,000 rpm, la pastilla se resuspendió en 500 µl de HEPES 10 mM y se congelaron (Blackall y col., 1990).

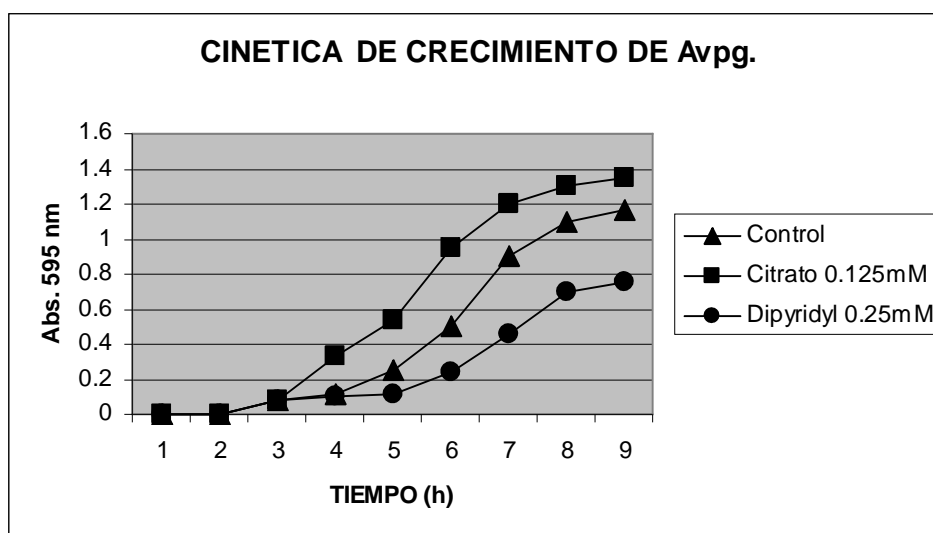
6.7. Inmunoreconocimiento

Para determinar si las proteínas que se expresaron por estrés por hierro eran inmunogénicas, las proteínas se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 12 y al 15%. Un gel se tiñó con el colorante de Coomassie y nos sirvió para tener el patrón de proteínas, otros se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 100 V, 100 mA, por 100 min. Una vez transferidas las proteínas, las membranas se bloquearon con PBS-Tween y 5% de leche durante 2h a temperatura ambiente, con agitación o TN a 4° C. Enseguida, las membranas se lavaron con PBS-Tween tres veces y se incubaron con el anticuerpo primario durante 2h a temperatura ambiente con agitación o TN a 4° C. Los anticuerpos que se utilizaron fueron: suero de aves vacunadas y desafiadas y aves no vacunadas y desafiadas con Avpg, suero de aves libres de patógenos específicos (ALPES) y antisuero anti-hemaglutinina (anti-HA, Instituto Kitasato). Las membranas se lavaron con PBS-Tween tres veces, se incubaron con el anticuerpo secundario, a las mismas condiciones ya mencionadas. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: cabra anti-conejo y conejo anti-pollo ambos conjugados con peroxidasa. Las membranas se lavaron con PBS-Tween tres veces y una última vez con PBS 1x. La reacción antígeno-anticuerpo se puso de manifiesto usando diamino benzidina y H₂O₂ como sustrato. La reacción se detuvo colocando las membranas en agua destilada (Towbin y col., 1979).

7. RESULTADOS

7.1. Curva de crecimiento

El inicio de la fase exponencial en los tres medios de cultivo ocurrió a las 3h postinoculación. La concentración de hierro en el medio de cultivo tuvo un efecto notable sobre el crecimiento de Avpg: las DO_{595} a las 9h post inoculación fueron 50% y 75% mayores en el medio control y en el suplementado con hierro, respectivamente, que en el medio con bajo hierro (Grafica 1) La concentración de dipirydyl que mostró resultados más evidentes fue de 0.25 mM.



Gráfica 1. Curvas de crecimiento de Avpg en medios con distinta concentración de hierro.

7.2. Proteínas expresadas en extractos totales

Los patrones de proteínas totales expresadas por las bacterias crecidas en medio control no difirieron de los de aquellas crecidas en medio suplementado con citrato de amonio férrico (Fig. 4), por lo que ya no se utilizó este último.

Al usar SDS-PAGE al 12% se observó una expresión diferencial de proteínas de aproximadamente 93, 97, 106 y 141 kDa en extractos totales de bacterias de 5h de crecimiento en presencia de dipirydyl (Fig. 5, líneas 3 y 4). Esta expresión diferencial se observó también a las 12h y a las 24h postinoculación (Fig. 6).

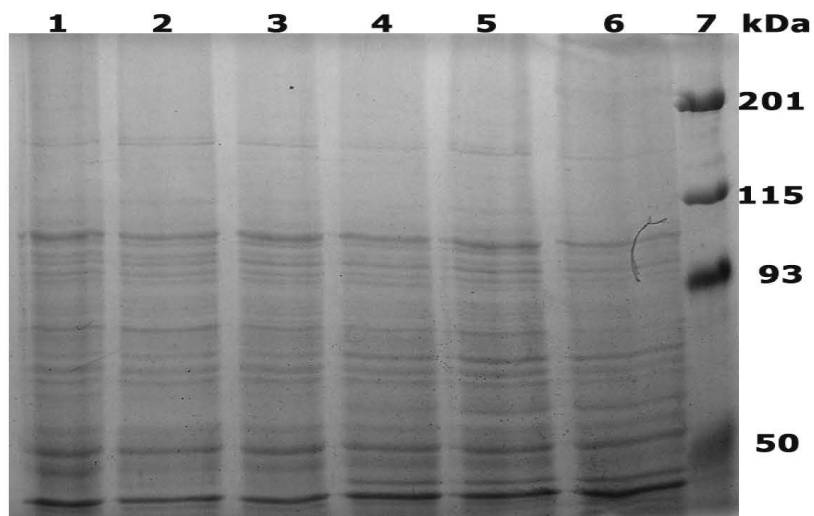


Fig. 4. SDS-PAGE al 10% donde se muestra el patrón de proteínas totales de bacterias crecidas a diferentes tiempos en presencia o ausencia de citrato férrico. Carril 1: Control 5h, 2: Citrato 5h, 3: Cont.6h, 4: Cit. 6h, 5: Cont. 7h, 6: Cit. 7h y 7: Marcadores de PM.

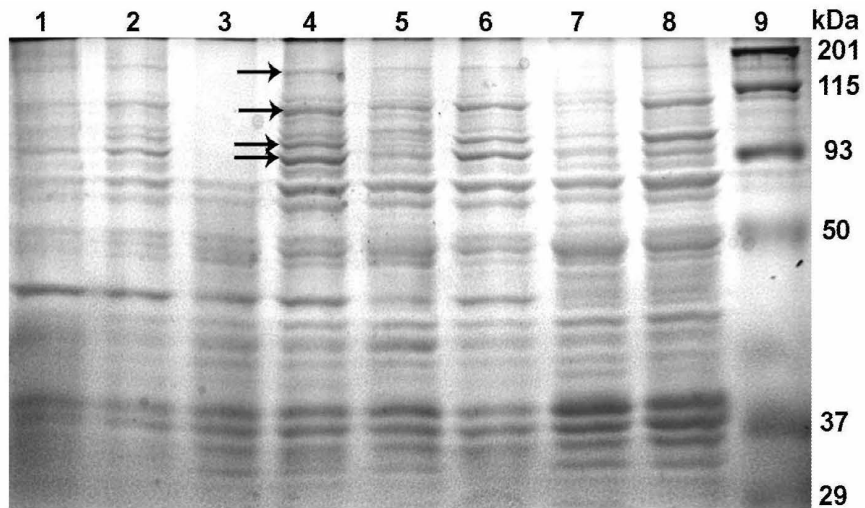


Fig. 5. SDS-PAGE al 12% donde se muestra el patrón de proteínas totales de bacterias crecidas a diferentes tiempos en presencia o ausencia de dipyrityl. Carril 1: Control 4h, 2: Dipyrityl 4h, 3:C5, 4:D5, 5:C6, 6:D6, 7:C7, 8:D7 y 9: Marcadores de PM

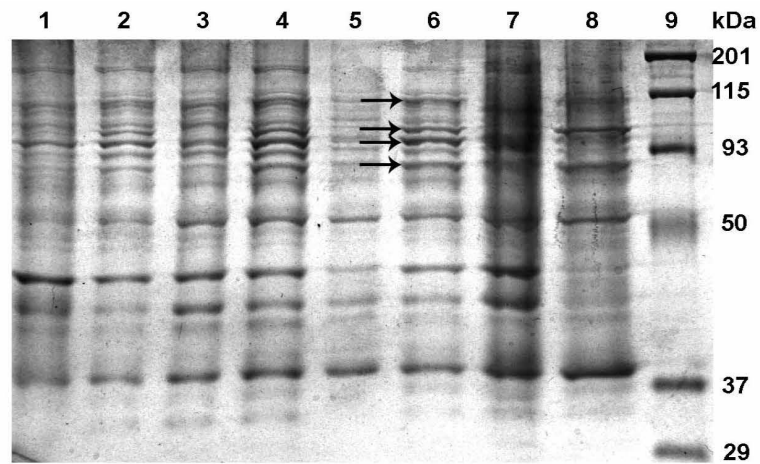


Fig. 6. SDS-PAGE al 12% donde se muestra el patrón de proteínas totales de bacterias crecidas a diferentes tiempos en presencia o ausencia de dipyrityl. Carril1: Control 8h, 2: Dipyrityl 8h, 3:C9, 4:D9, 5:C12, 6:D12, 7:C24, 8:D24 y 9: Marcadores de PM.

7.3. Proteínas secretadas

El sobrenadante libre de células se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70% para concentrar las proteínas secretadas. Las proteínas secretadas expresadas diferencialmente a las 5h de crecimiento en muestras de bacterias crecidas en presencia de dipiridyl fueron de aproximadamente 92, 93, 97, 98 y 115 kDa; a las 12h de 59, 92, 93, 97, 98 y 115 kDa y a las 24h de 47, 92, 93, 97, 98 y 115 kDa (Fig. 7).

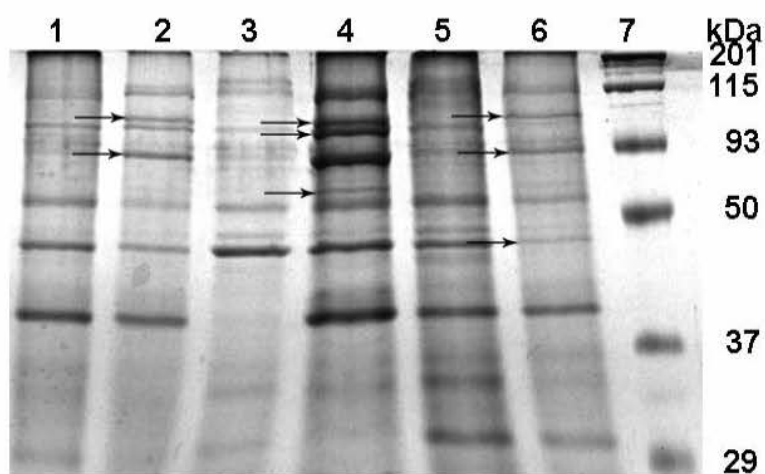


Fig. 7. SDS-PAGE al 12% donde se muestra el patrón de proteínas secretadas de bacterias crecidas en presencia o ausencia de dipiridyl a las 5, 12 y 24h de cultivo. Carril 1: Control 5h, 2: Dipiridyl 5h, 3:C12h, 4:D12h, 5:C24h, 6:D24h y 7: Marcadores de PM.

7.4. Proteínas de membrana externa.

Con respecto a las proteínas de membrana externa, las que se expresaron diferencialmente a las 5 y 12h en las muestras de bacterias crecidas en presencia de dipyriddy fueron de 49, 80, 93, 98, 112 y 161 kDa aproximadamente (Fig. 8). Una proteína de 49 kDa que se expreso en las muestras crecidas en presencia y ausencia de dipyriddy, no se expreso a las 24h en la muestra de bacterias crecidas en presencia de dipyriddy, pero se observó una proteína de aproximadamente 52 kDa (Fig. 8, carril 6).

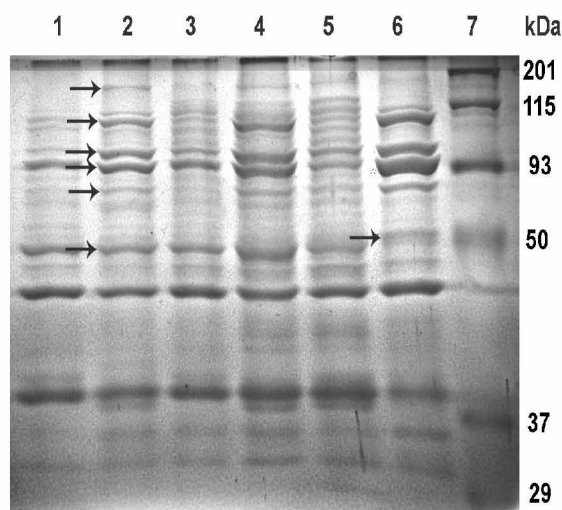


Fig. 8. SDS-PAGE al 12% donde se muestra el patrón de proteínas de membrana externa de bacterias crecidas en presencia o ausencia de dipyriddy a las 5, 12 y 24h de cultivo. Carril 1: C5h, 2: Dipyriddy 5h, 3:C12, 4:D12, 5:C24, 6:D24 y 7: Marcadores de PM

HA ha sido considerada el principal antígeno expresado por Avpg. Durante el desarrollo de este trabajo, no se observó algún cambio en la expresión de proteínas de alrededor de 39 kDa, que es el peso molecular reportado para esta proteína, tanto en extractos totales como en patrones de OMPs crecidos en presencia o no de dipyriddy (Fig. 5, 6 y 8).

7.5. Inmunoreconocimiento de OMPs.

Al emplear el suero de aves no vacunadas y desafiadas con Avpg (Fig. 9) se observó que hubo un reconocimiento de OMPs de aproximadamente 37, 39, 46, 49, 52 y 98 kDa en muestras de bacterias crecidas en ausencia y presencia de dipyriddy. Sin embargo, en las muestras de bacterias crecidas en presencia de dipyriddy se observó una expresión diferencial de dos proteínas más de 98 y 114 kDa aproximadamente.

Al emplear el suero de aves vacunadas (Fig. 10) las proteínas que se observaron fueron de aproximadamente 37, 39, 46, 49 y 52 kDa en las muestras de bacterias crecidas en presencia y ausencia de dipyriddy, sin embargo el reconocimiento fue más tenue que el mostrado con el suero de aves no vacunadas y desafiadas con Avpg. En las muestras de bacterias crecidas en presencia de dipyriddy se observaron dos proteínas más de 98 y 114 kDa aproximadamente. Al utilizar el suero ALPES (Fig. 11), se observó un reconocimiento muy tenue de las OMPs de aproximadamente 37, 39 y 46 kDa. Al emplear el suero anti-HA, no se observó diferencia en el reconocimiento en muestras de bacterias crecidas en presencia y ausencia de dipyriddy (Datos no mostrados).

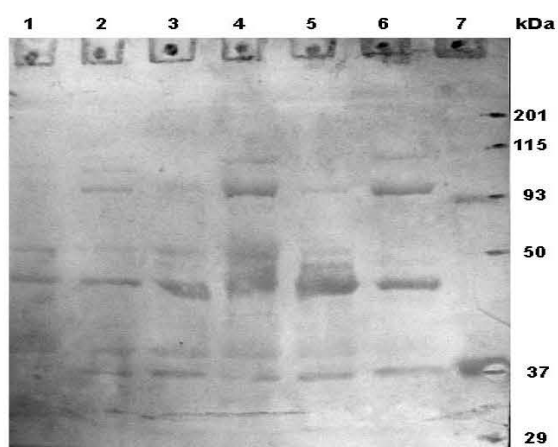


Fig. 9. Western blot donde se muestra el Inmunoreconocimiento de OMPs obtenidas de bacterias crecidas en presencia o ausencia de dipyriddy al usarse el suero de aves no vacunadas y desafiadas con Avpg.

Carril 1: Control 5h, 2: Dipyriddy 5h, 3:C124:D12, 5:C24, 6:D24 y 7: Marcadores de PM.

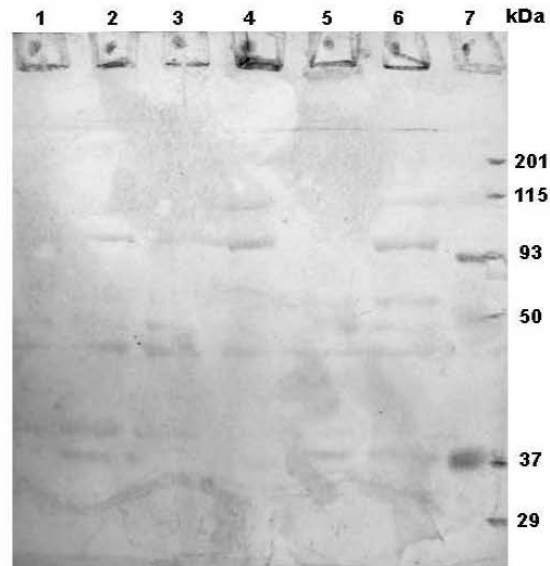


Fig. 10. Western blot donde se muestra el Inmunoreconocimiento de OMPs obtenidas de bacterias crecidas en presencia o ausencia de dipyrityl al usarse el suero de aves vacunadas y desafiadas con Avpg.
 Carril 1: Control 5h, 2: Dipyrityl 5h, 3:C12, 4:D12, 5:C24, 6:D24 y 7: Marcadores de PM.

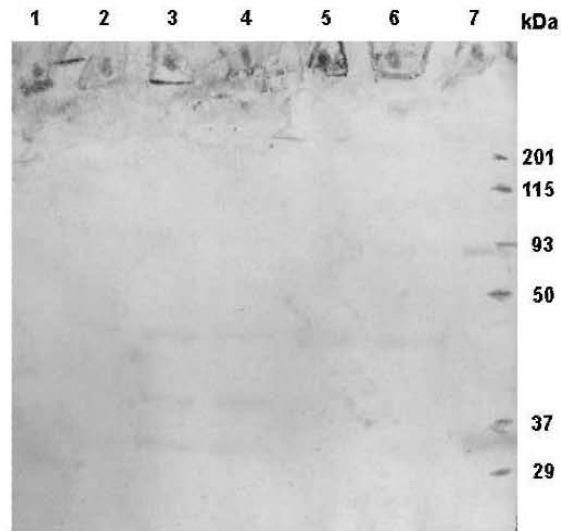


Fig. 11. Western blot donde se muestra el Inmunoreconocimiento de OMPs obtenidas de bacterias crecidas en presencia o ausencia de dipyrityl al usarse el suero de ALPES. Carril 1: Control 5h,
 2: Dipyrityl 5h, 3:C12, 4: D125:C24, 6:D24 y 7: Marcadores de PM.

7.6. Inmunoreconocimiento de Proteínas secretadas.

Al emplear el suero de aves no vacunadas y desafiadas con Avpg (Fig. 12) se observó que hubo un reconocimiento de proteínas secretadas de aproximadamente 46, 52, 93, 98 kDa en las muestras de bacterias crecidas en ausencia de dipiridyl y de 92, 97 y 115 kDa aproximadamente en las muestras de bacterias crecidas en presencia de dipiridyl.

Las proteínas de bacterias crecidas en presencia de dipiridyl que se expresaron diferencialmente y fueron reconocidas con el suero de aves vacunadas y desafiadas con Avpg (Fig. 13) fueron de 93, 98 y 115 kDa aproximadamente, sin embargo en las muestras de bacterias crecidas en ausencia de dipiridyl se observó la expresión de proteínas de 50, 93 y 98 kDa aproximadamente. Al utilizar el suero ALPES, no se observó reconocimiento de proteínas secretadas (Fig. 14).

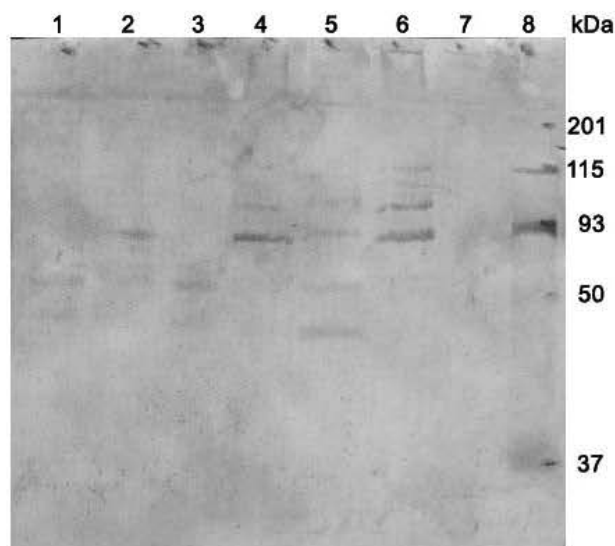


Fig. 12. Western blot donde se muestra el Inmunoreconocimiento de proteínas secretadas obtenidas de bacterias crecidas en presencia o ausencia de dipiridyl al usarse el suero de Aves no vacunadas y desafiadas con Avpg. Carril 1: Control 5h, 2: Dipiridyl 5h, 3:C12, 4:D12, 5:C24, 6:D24 y 8: Marcadores de PM.

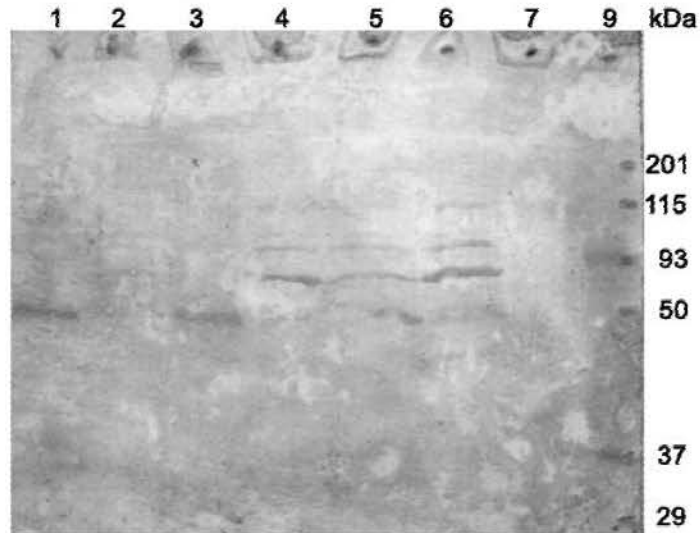


Fig. 13. Western blot donde se muestra el Inmunoreconocimiento de proteínas secretadas obtenidas de bacterias crecidas en presencia o ausencia de dipyriddy al usarse el suero de Aves vacunadas y desafiadas con Avpg. Carril 1: Control 5h, 2: Dipyriddy 5h, 3:C12, 4:D12, 5:C24, 6:D24 y 8: Marcadores de PM.

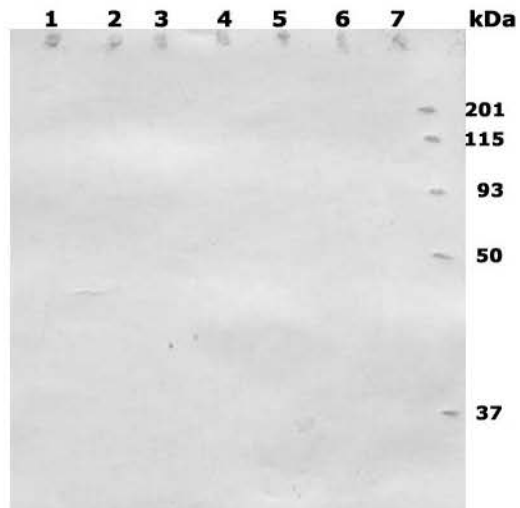


Fig. 14. Western blot donde se muestra el Inmunoreconocimiento de proteínas secretadas obtenidas de bacterias crecidas en presencia o ausencia de dipyriddy al usarse el suero de ALPES. Carril 1: Control 5h, 2: Dipyriddy 5h, 3:C12, 4: D125:C24, 6:D24 y 7: Marcadores de PM

8. DISCUSION

La mayoría de los componentes de la superficie bacteriana y aquellos liberados extracelularmente son antígenos y muchos de ellos son importantes en la virulencia de la mayoría de las bacterias (Reinhard, 1983) por lo que se consideran como determinantes en la patogénesis (Coyle y Pharm, 2003).

Avpg expresa varios factores de virulencia involucrados en su patogenicidad. Los más estudiados han sido la cápsula, la cual contiene antígenos de protección, entre los que se han estudiado y están localizados en la superficie de las bacterias: lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa (OMP), polisacáridos (Blackall, 1995).

Mena-Rojas y col., en el 2004, identificaron proteínas secretadas por Avpg en el rango de 20-120 kDa creciéndola en diferentes medios de cultivo: BHI, TSB y LBGP, y reportando una mejor expresión en TSB o en BHI. Estas proteínas fueron reconocidas por sueros de aves vacunadas o infectadas experimentalmente con Avpg, pero no por los sueros de aves ALPES indicando que se trataba de inmunógenos que podrían ser importantes en la protección contra la CI. Además, proteínas secretadas de 110 y 120 kDa fueron reconocidas por anticuerpos contra Apx1 y la leukotoxina de *M. haemolytica* sugiriendo la posible presencia de una proteína del tipo RTX entre las proteínas secretadas por Avpg.

Recientemente en el laboratorio se ha descrito la presencia de proteasas entre las proteínas secretadas por Avpg (Rivero-García, 2005) y la liberación de estructuras membranales (vesículas de membrana) las cuales podrían estar implicadas en la virulencia debido a que estas contienen entre otras cosas proteasas, las probables proteínas RTX de 110-120 kDa, entre otras (Ramón-Rocha y col., 2006).

Un nutriente esencial para el crecimiento de muchos organismos es el hierro, ya que participa en la cadena transportadora de electrones, en el proceso de respiración, catálisis enzimática y estabilidad de estructuras proteicas (Paustian y col., 2002). El hierro de los fluidos corporales no está libre, sino que forma complejos con proteínas del huésped transportadoras de hierro, transferrinas. Existen tres clases: Tf sérica (serotransferrinas), lactoferrinas (Lf) o lactotransferrinas (están en fluidos extracelulares), y ovotransferrinas (Abdallah y El Hage Chahine, 1999). En base a lo anterior, los mecanismos empleados para obtener hierro por un microorganismo patógeno son considerados un mecanismo de virulencia.

Al crecer Avpg en condiciones de restricción de hierro durante 24h, nos permitió observar en geles de poliacrilamida al 12% que a las 5h postinoculación, se expresaron diferentes proteínas de aproximadamente 93, 97, 106 y 141 kDa en extractos totales de estas bacterias, dichas proteínas no presentaron cambios en extractos totales de las bacterias crecidas en medio normal o rico en hierro, a pesar de que en este último su crecimiento se vio favorecido a diferencia del medio control y del medio suplementado con dipirydyl. La expresión de proteínas se encuentra regulada por factores ambientales. Este resultado podría indicarnos que estas proteínas se expresaban como una respuesta a la falta de hierro en el medio y por consiguiente que la expresión de estas proteínas se encontraba regulada por factores ambientales. Al analizar las muestras por SDS-PAGE, se pudo observar que la expresión de estas proteínas a las 5h, también se observaba a las 12 y 24h de cultivo.

Deneer y Potter, (1989) trabajando con *A. pleuropneumoniae* crecida en medios pobres en hierro, observaron la expresión de dos proteínas de membrana externa de 105 y 76 kDa que eran reguladas por hierro. Deneer y Potter sugirieron que estas proteínas podrían servir como receptores para los complejos sideroforo-hierro o actuar directamente como transportadores de hierro.

Ogunnariwo y Schryvers en 1992 encontraron que cuando Avpg fue crecida en condiciones de restricción de hierro expresó dos proteínas de 94 y 53 kDa las cuales fueron identificadas como receptores de ovotransferrina. En las muestras de OMPs de Avpg crecida en presencia de dipiridyl observamos dos proteínas con pesos aproximados de 93 y 52 kDa, las cuales podrían corresponder a las de 94 y 53 kDa descritas previamente por Ogunnariwo y Schryvers y que correspondían a receptores de ovotransferrina.

En este trabajo, se expresaron diferencialmente OMPs de aproximadamente 80, 93, 98, 113 y 161 kDa en bacterias crecidas en presencia de dipiridyl, conforme la bacteria tenía más tiempo de incubación, fue mayor la concentración de dichas proteínas, durante las primeras 12h, se expresó una proteína de aproximadamente 49 kDa en las muestras de bacterias crecidas en presencia y ausencia de dipiridyl, sin embargo esta proteína no se observó a las 24h en la muestra de bacterias crecidas en presencia de dipiridyl, pero se observó una proteína de 52 kDa aproximadamente, la cual podría corresponder a la proteína receptora de ovotransferrina que menciona Ogunnariwo y Schryvers en su trabajo.

Zhao y col., (1995) trabajando con dos cepas de *P. multocida* (A52 y B80) aisladas del pulmón de cerdo y crecidas en restricción de hierro, observaron la expresión de cuatro proteínas de membrana externa de 74, 82, 99 y 109 kDa en A52 y de 74, 82, 94 y 99 kDa en B80, las cuales fueron reguladas por hierro y detectadas por inmunoreconocimiento al usar sueros de animales vacunados con una vacuna polivalente de *P. multocida* que contenían los serotipos A y D.

Además de las proteínas que fueron identificadas como receptores de ovotransferrina, Ogunnariwo y Schryvers describieron dos proteínas de 62 y 66 kDa las cuales eran reguladas por hierro, sin embargo en este trabajo no se observaron dichas proteínas. Por el contrario, se observaron tres proteínas de aproximadamente 93, 98 y 113 kDa las cuales igualmente podrían estar reguladas por hierro, ya que solo se expresaron en muestras de bacterias crecidas en

presencia de dipyriddy y podrían también estar participando en los mecanismos de captación de hierro por Avpg.

La virulencia de *Staphylococcus aureus* es determinada esencialmente por las proteínas asociadas a la pared de la célula y las toxinas secretadas que se regulan y se expresan de acuerdo a las fases de crecimiento y/o condiciones de crecimiento. La expresión del gen es regulada por los factores específicos y sensibles, muchos de los cuales actúan a nivel transcripcional. Estos factores son regulados en gran parte por los sistemas reguladores de dos componentes, tales como el sistema agr, saeRS, srrAB, arlSR y lytRS, sistemas sensibles a señales ambientales. Las proteínas de unión de DNA, tales como SarA y los homólogos recientemente identificados de SarA (SarR, Rot, SarS, SarT, SarU), también regulan la expresión de factores de virulencia. Las múltiples vías generadas por estos factores permiten que la bacteria se adapte rápidamente a las condiciones ambientales y específicas, y desarrolle la infección (Bronner y col. 2004).

Deneer y Potter, (1989) trabajando con los serotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 7 de *A. pleuropneumoniae* crecida en medios pobres en hierro, observaron la expresión de dos IROMPs de 105 y 76 kDa que eran reguladas por hierro y fueron reconocidas por el suero de cerdo infectado con el serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*, lo cual sugirió que dichas proteínas pueden ser expresadas durante el crecimiento *in vivo* en el organismo y posiblemente expuestas en la superficie celular. Las IROMPs expresadas en los demás serotipos fueron igualmente reconocidas por el suero de cerdo, lo cual sugiere que la expresión de dichas proteínas no es específica del serotipo.

El análisis de inmunoreconocimiento nos permitió observar que Avpg crecida en restricción de hierro expresó OMPs que fueron reconocidas por los sueros de aves vacunadas y desafiadas y de aves no vacunadas y desafiadas con Avpg. Las OMPs inmunogénicas reconocidas con el suero de aves no vacunadas y desafiadas con Avpg en muestras de bacterias crecidas en presencia y ausencia

de dipyriddy fueron de aproximadamente 37, 39, 46, 49, 52 y 98 kDa, con el suero de aves vacunadas y desafiadas con Avpg el reconocimiento fue más tenue. Las OMPs de 98 y 114 kDa aproximadamente que se expresaron diferencialmente en los medios suplementados con dipyriddy fueron reconocidas con el suero de aves no vacunadas y desafiadas con Avpg, sin embargo también se observó un reconocimiento muy tenue de la proteína de 98 kDa en las muestras de bacterias crecidas en ausencia de dipyriddy, sugiriendo que aunque la proteína se expresa en condiciones normales, existe un incremento de su expresión como consecuencia de un estrés. Al emplear el suero ALPES se observó reconocimiento muy tenue de OMPs de 37, 39 y 46 kDa las cuales también fueron reconocidas tanto por los sueros de aves vacunadas como por los de infectadas, sugiriendo que aunque estas proteínas son inmunogénicas, podrían estar formando parte de bacterias no patógenas

Como se sabe la HA ha sido considerada el principal antígeno de Avpg, por lo cual en este trabajo se quiso observar si existía una expresión diferencial de esta proteína al crecer a la bacteria en medio pobre en hierro. La expresión de una proteína de aproximadamente 39 kDa que se observó sin cambio por SDS-PAGE tanto en extractos totales como en OMPs en presencia o no de dipyriddy nos sugirió que esta condición no afectaba su expresión. Para corroborar que se trataba de la HA se realizó un inmunoreconocimiento usando suero anti-HA, sin embargo no se observaron diferencias en el reconocimiento de la expresión de dicha proteína tanto en medios de bacterias crecidas en presencia y ausencia de dipyriddy, por lo que podemos concluir que la expresión de la HA no es afectada por la concentración de hierro en el medio. A la fecha no han sido descritas en Avpg las condiciones ambientales que afectan la expresión de esta proteína. Sin embargo Percival y col., en 1999, observaron que cuando *Porphyromonas gingivalis* era crecida a 41° C se producía una inhibición en la actividad de hemaglutinación de las células y una reducción con un anticuerpo monoclonal que reconoce los productos del gen implicados en la hemaglutinación.

Una expresión diferencial en el patrón de proteínas secretadas también fue observado al crecer Avpg en medio pobre en hierro indicando también una respuesta de la bacteria por este mecanismo.

En el análisis de inmunoreconocimiento con suero de aves no vacunadas y desafiadas con Avpg, las proteínas secretadas que fueron reconocidas y se expresaron diferencialmente en las muestras de bacterias crecidas en presencia de dipiridyl fueron de aproximadamente 92, 97 y 115 kDa, las cuales no fueron identificadas en las muestras sin dipiridyl. Proteínas secretadas de 46, 52, 93 y 98 kDa fueron reconocidas únicamente en muestras provenientes de bacterias crecidas en ausencia de dipiridyl. Las proteínas secretadas que se expresaron diferencialmente y fueron reconocidas con el suero de aves vacunadas y desafiadas con Avpg fueron de aproximadamente 93, 98 y 115 kDa en las muestras de bacterias crecidas en presencia de dipiridyl, sin embargo en las muestras de bacterias crecidas en ausencia de dipiridyl durante las primeras 12h se observó únicamente la expresión de una proteína de aproximadamente 50 kDa y a las 24h se observan las proteínas de 50, 93 y 98 kDa aproximadamente. Con el suero ALPES no se observó reconocimiento de proteínas secretadas. Estos resultados nos pueden sugerir que dichas proteínas pueden estar involucradas en la virulencia de Avpg.

9. CONCLUSIONES

La expresión diferencial de proteínas inicia a las 5h de cultivo.

Existe una expresión diferencial de proteínas secretadas, de membrana externa y del extracto total en bacterias crecidas en medio suplementado con dipiridyl.

Las proteínas de extracto total en bacterias crecidas en medio suplementado con citrato férrico, no mostraron diferencia en su expresión.

Las proteínas secretadas inmunogénicas expresadas diferencialmente en muestras de bacterias crecidas en presencia de dipiridyl con suero de aves no vacunadas y desafiadas con Avpg son de aproximadamente 93, 112 y 115 kDa.

Las OMPs de aproximadamente 52 y 93 kDa podrían corresponder con las proteínas de 53 y 94 kDa reportadas como receptores de ovotransferrina por Ogunnariwo y Schryvers.

Las proteínas inducidas por estrés por hierro son inmunogénicas y podrían participar en los mecanismos de captación de hierro.

10. Bibliografía

Abdallah, F. B. and El Hage Chahine, J. M. 1999. Transferrins, the mechanism of iron release by ovotransferrin. *European Journal of Biochemistry*. 263: 912-920.

Blackall, P. J., Christensen, H., Beckenham, T., Blackall, L. L. and Bisgaard, M. 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 353–362.

Blackall, P. J., Matsumoto, M. and Yamamoto, R. 1997. Infectious Coryza. In *Diseases of Poultry*. Calnek B. W., Barnes H. J., Beard C. W., McDougald L. R., Sayf Y. M., (eds) *Poultry Diseases*. 10th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa. 179-190.

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

Blackall, P. J. 1999. Infectious Coryza: Overview of the Disease and new diagnostic options. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 627-632.

Blackall, P. J. 1995. Vaccines against infectious coryza. *World's Poultry Science Journal*. 51: 17-26.

Boyce, J. D. and Adler, B. 2000. The Capsule Is a Virulence Determinant in the Pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infection and immunity*. 68: 3463–3468.

Bragg, R. R. 2002. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 2: Naturally occurring NAD⁺-independent field isolates. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 69: 171-175.

Bronner, S., Monteil, H. and Prévost, G. 2004. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews. 28: 183–200.

Coyle, E. A and Pharm, D. 2003. Targeting Bacterial Virulence: The Role of Protein Synthesis Inhibitors in Severe Infections. Insights from the Society of Infectious Disease Pharmacists. Pharmacotherapy Publications. 23: 638-642.

Delepelaire, P. and Wandersman, C. 2002. Protein Export and Secretion in Gram-negative Bacteria. Microbial Transport Systems. Edited by G. Winkelmann. 165-208.

Deneer, H. G. and Potter, A. A. 1989. Effect of restriction on the Outer Membrane Proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Infection and Immunity. 57: 798-804.

Diard, S., Toribio, A. L., Boum, Y., Vigier, F., Kansau, I., Bouvet, O. and Servin, A. 2006. Environmental signals implicated in Dr fimbriae release by pathogenic *Escherichia coli*. Microbes and Infection. 20: 1-8.

García, A., Angulo, E., Blackall, P., Ortiz, A. 2004. The presence of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Haemophilus paragallinarum* in Mexico. Avian Diseases. 48: 425-429.

Gatewood, M. D., Fendwick, B. W. and Chengappa, M. M. 1994. Growth-condition dependent expression of *Pasteurella haemolytica* A1 outer membrane proteins, capsule and leukotoxin. Veterinary Microbiology. 41: 221-233.

Guosong, Z. et al. 1995. Expression of iron-regulated Outer Membrane Proteins by Porcine strains of *Pasteurella multocida*. Canadian Journal of Veterinary Research. 59: 46-50.

Hantke, K. 2001. Iron and metal regulation in bacteria. Current Opinion in Microbiology. 4: 172-177.

Hobb, I. R., Tseng, Hsing-Ju, Downes, E. J., Terry, D. T., Blackall, J. P., Takagi, M. and Jennings, P. M. 2002. Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. Microbiology. 148: 2171-2179.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson educación, S. A., Madrid. 10th ed. 1011.

Mena-Rojas, E., Vázquez, C. C., Vaca, P. S., García, G. O., Pérez-Márquez, V., Pérez-Méndez, A., Ibarra-Caballero, J., de la Garza, M., Zenteno, E. and Negrete-Abascal, E. 2004. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110 kDa putative RTX-protein. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters. 232: 83-87.

Miflin, J. K., Horner, R. F., Blackall, P. J., Chen, X., Bishop, G. C., Morrow, C. J., Yamaguchi, T. and Iritani, Y. 1995. Phenotypic and molecular characterization of V-factor (NAD⁺)-independent *Haemophilus paragallinarum*. Avian Diseases. 39: 304-308.

Mogilnaya, O. A., Lobova, T. I., Kargatova, T. V. and Popova, L.Y. 2005. Biofilm formation by bacterial associations under various salinities and copper ion stress. Biofouling. 21: 247-55.

Mouahid, M., Bisgaard, M., Morley, A. J., Mutters, R. and Mannheim, W. 1992. Occurrence of V-factor (NAD⁺) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. Veterinary Microbiology. 31: 363-368.

Negrete-Abascal, E, Vaca, S., García-González, O. P., Tavares, F., Andrade, A., García, R. M., Monsalvo, A and de la Garza, M. 2002. Isolation of a putative *fliC* sequence in *Haemophilus paragallinarum* and *Pasteurella multocida*. International Pasteurellaceae Society Conference.

Ogunnariwo, J. A. and Schryvers, A. B. 1992. Correlation between the Ability of *Haemophilus paragallinarum* to acquire ovotransferrin-bound iron and the expression of ovotransferrin-specific receptors. Avian diseases. 36: 655-663.

Paustian, M. L., May, B. J. and Kapur, V. 2004. *Pasteurella multocida* gene expression in response to iron limitation. Infection and Immunity. 69: 4109-4115.

Percival, R. S., Marsh, P. D., Devine, D. A., Rangarajan, M., Aduse-Opoku, J., Shepherd, P., and Curtis, M. A. 1999. Effect of Temperature on Growth, Hemagglutination, and Protease Activity of *Porphyromonas gingivalis*. Infection and Immunity. 67: 1917–1921.

Ramón-Rocha, M. O., García-González, O., Perez-Méndez, A., Ibarra-Caballero, J., Perez-Márquez, V. M., Vaca, S., Negrete-Abascal, E. 2006. Membrane vesicles released by *Avibacterium paragallinarum* contain putative virulence factors. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters. 257: 63-8.

Rapp, V. J., Munson, R. S., Jr. And Rossi, R. F. 1986. Outer Membrane Protein Profiles of *Haemophilus pleuropneumoniae*. Infection and Immunity. 52: 414-420.

Ratledge, C. and Dover, L. G. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annual Review of Microbiology. 54: 881-941.

Reinhard, E. 1983. Biología farmacéutica. Citología, genética, fisiología. Ediciones Marzo 80. Manuel Company Edit. España. 25-26.

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: 893-6.

Serrano, V. A. 2004. Condiciones de motilidad *in vitro* de *Haemophilus paragallinarum*. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala. UNAM.

Terzolo, H. R. 2000. Revisión sobre coriza infecciosa: propuestas de investigación para su diagnóstico y control. *Revista de Medicina Veterinaria*. 81: 262-269.

Takagi, M., Hirayama, N., Simazaki, T., Taguchi, K., Yamaoka, R. and Ohta, S. 1993. Purification of hemagglutinin from *Haemophilus paragallinarum* using monoclonal antibody. *Veterinary Microbiology*. 34: 191-197.

Thanassi, D. G. and Hultgren, S. J. 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Current Opinion Cell Biology*. 12:420-30.

Todar, K. 2002. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76: 4350-4354.

Zhao, G., Pijoan, C., Choi, K., Maneswaran, K. S. and Trigo, E. 1995. Expression of Iron-regulated outer membrane proteins by porcine strains of *Pasteurella multocida*. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 59: 46-50.

<http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/Lects/Bacteria.htm#cap>. The bacteria.