

UACM

Universidad Autónoma de la Ciudad de México
Nada humano me es ajeno
Posgrado en Ciencias Genómicas

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEMBRANALES QUE PARTICIPAN EN EL
MECANISMO DE ADQUISICIÓN DE HIERRO CUANDO SE USA COMO
FUENTE Hb HUMANA EN *Streptococcus pneumoniae*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A:
Q. F. B. MARÍA ELENA ROMERO ESPEJEL

DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSE DE JESUS OLIVARES TREJO

MÉXICO D.F. SEPTIEMBRE 2012

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. Mavil López Casamichana

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Laura Itzel Quintas Granados

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

LECTORES DE TESIS

Dra. María Teresa Núñez Cardona

Profesora investigadora del departamento el hombre y su ambiente.
Laboratorio de ecología microbiana de la Universidad Autónoma
Metropolitana-Unidad Xochimilco

M. en C. Fernando Vargas Romero

Estudiante de Doctorado del departamento de microbiología del Posgrado de
ciencias de la salud animal de la Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Mavil López Casamichana

Profesora investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas de la
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Profesora investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas de la
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) para la realización del presente trabajo. (Proyecto número 139945 de Ciencia Básica).

Agradezco también al CONAcyT la beca para estudios de Maestría otorgada durante el periodo agosto 2010 a julio 2012.

El proyecto de investigación descrito en esta tesis contó con el respaldo académico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, a la cual agradezco profundamente por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo y desarrollarme dentro esta institución.

A mi comité tutorial y lectores de tesis, por su orientación y apoyo profesional, observaciones y críticas oportunas en la realización del presente proyecto.

A mis padres y hermanos por su comprensión y apoyo para lograr mis metas.

A mis amigos y compañeros por su amistad, consejos y apoyo incondicional.

Dedicatoria

A mis abuelos María Elena Espinoza Ramos y Francisco Romero Islas

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

LISTA DE ABREVIATURAS

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

1.1 Clasificación y descripción de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.2 Morfología de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.3 Epidemiología de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
1.5 HIERRO	5
1.5.1 Importancia del hierro en los sistemas biológicos	5
1.5.2 Importancia del hierro para los microorganismos	5
1.5.3 El hierro y el estrés oxidativo	6
1.5.4 Disponibilidad de hierro en el organismo humano	7
1.5.5 Clasificación de fuentes de hierro en el organismo humano	9
1.5.6 Mecanismos de adquisición de hierro desarrollados por los microorganismos patógenos para obtener hierro dentro del hospedero	15
1.6 Importancia del sistema Ton B para los receptores	16
1.7 Mecanismos de captación de hierro por microorganismos	16
1.7.1 Grupo 1. Sideróforos y hemóforos	17
1.7.2 Grupo 2. Receptores de hierro	18
1.7.3 Receptores para sideróforos y hemóforos	18
1.7.4 Receptores para transferrina y lactoferrina	19
1.7.5 Receptores de hemo y hemoglobina	19
1.7.6 Transporte del hierro a través de la membrana citoplasmática	20
1.7.7 Importancia de los transportadores ABC	21

2. ESTADO DEL ARTE	24
3. ANTECEDENTES PARTICULARES	25
4. IMPORTANCIA PARA CONTINUAR EL TEMA	28
II. OBJETIVOS	
1. OBJETIVO GENERAL	29
2. OBJETIVOS PARTICULARES	29
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Obtención de proteínas membranales de <i>S. pneumoniae</i> que unen el grupo hemo	32
1.1 Almacenamiento de la cepa R-6	32
1.1.2 Cultivo y crecimiento de <i>S. pneumoniae</i>	32
1.1.3 Estandarización de las curvas de crecimiento limitadas de hierro	33
1.1.4 Curvas de crecimiento restringidas de hierro y Suplementadas con diferentes fuentes de hierro	33
1.2 Fraccionamiento celular de proteínas de <i>S. pneumoniae</i>	34
1.2.1 Verificación del fraccionamiento celular	34
1.3 Determinación de la concentración de proteína	35
1.4 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes	35
1.4.1 Preparación de geles	37
1.4.2 Preparación de muestras para electroforesis en SDS-PAGE	38
1.5 Inmunodetección por Western Blot	39
1.6 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad	40
1.7 Tratamiento de proteínas membranales para electroforesis	40

1.8 Tinción de las proteínas con Sypro Ruby	41
2. Identificación de proteínas de unión al grupo hemo por espectrometría de masas	42
2.1 Identificación de proteínas por espectrometría de masas	42
3. Análisis de la capacidad de competencia de la vitamina B12 con el grupo hemo por su unión a la Hb	43
3.1 Pruebas de unión a Hb mediante el ensayo de Overlay	43
3.1.1 Ensayo de Overlay	43
3.2 Curva de crecimiento de <i>S. pneumoniae</i> en medio restringido de hierro suplementado con Hb y vitamina B12	44
3.2.1 Análisis de viabilidad celular de <i>S. pneumoniae</i> crecido en medio restringido de hierro y suplementado con Hb y vitamina B12	45

V. RESULTADOS

1. Obtención de proteínas membranales de <i>S. pneumoniae</i> que unen el grupo hemo	46
1.1 Crecimiento de <i>S. pneumoniae</i> en diferentes fuentes de hierro	46
1.2 Fraccionamiento de proteínas membranales en <i>S. pneumoniae</i> empleando Hb como fuente de hierro	48
1.2.1 Verificación del fraccionamiento de proteínas	48
1.3 Purificación de proteínas que unen el grupo hemo a partir de la Hb	50

2. Identificación de proteínas de unión al grupo hemo por espectrometría de masas	51
3. Análisis de la capacidad de competencia de la vitamina B12 con el grupo hemo por su unión a la Hb	54
3.1 Purificación de proteínas que unen el grupo hemo con diferentes eluyentes	54
3.2 Capacidad de competencia de la vitamina B12 con la Hb	55
3.3 Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos	57
3.4 Disminución de viabilidad celular empleando vitamina B12 en <i>S. pneumoniae</i>	57
VI. DISCUSIÓN	60
VII. CONCLUSIONES	63
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Morfología colonial y microscópica de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
Figura 2	<i>Streptococcus pneumoniae</i> microorganismo patógeno capaz de causar diversas infecciones y procesos invasivos severos	3
Figura 3	Reacciones óxido-reducción en presencia de hierro y generación de especies reactivas de oxígeno	6
Figura 4	Distribución y contenido de hierro en el organismo humano	8
Figura 5	Estructura de la Hemoglobina y del grupo hemo	12
Figura 6	Estructuras del grupo hemo y la vitamina B12	13
Figura 7	Mecanismo propuesto para la captación de vitamina B12 en bacterias Gram negativas	15
Figura 8	Mecanismo de acción para hemóforos y hemoproteínas	22
Figura 9	Crecimiento de <i>Streptococcus pneumoniae</i> en medio Todd-Hewit	25
Figura 10	Genes <i>pit</i> descritos para la captación de hierro en <i>S. pneumoniae</i>	26
Figura 11	Estrategia experimental desarrollada	31
Figura 12	Curva de crecimiento de <i>S. pneumoniae</i> empleando diferentes fuentes de hierro	47
Figura 13	Porcentaje de viabilidad celular determinada con el contador de células TC-10 Bio-Rad	48
Figura 14	Fraccionamiento celular de <i>S. pneumoniae</i>	49
Figura 15	Purificación de proteínas de membrana de <i>S. pneumoniae</i> que unen hemina	51
Figura 16	Purificación de proteínas membranales que unen hemina empleando diferentes eluyentes	55
Figura 17	Ensayo de Overlay y Coomassie para demostrar la competencia de la vitamina B12 con el hemo de la Hb	56

Figura 18	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de proteínas de <i>S. pneumoniae</i>	57
Figura 19	Porcentaje de viabilidad celular de <i>S. pneumoniae</i> empleando vitamina B12 y Hb	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación y características principales de las metaloproteínas que unen hierro y el grupo hemo	10
Tabla 2	Clasificación de los sistemas de adquisición de hierro por patógenos	17
Tabla 3	Proteínas que presentan similitud a PitADBC	27
Tabla 4	Composición de Caldo Todd Hewitt	33
Tabla 5	Cantidades de reactivos para preparar un gel de acrilamida al 12%	38
Tabla 6	Proteínas membranales que unen el grupo hemo en <i>S. pneumoniae</i> identificadas por espectrometría de masas	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Proteína de unión a ATP
ABS	Albúmina sérica de bovino
ATP	Trifosfato de adenosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Dithitritol
EDTA	Ácido Etilén Diamino Tetra-acético
ENI	Enfermedad Neumocócica Invasiva
FeCl ₃	Cloruro Ferrico
g	Gramos
h	Horas
Hb	Hemoglobina
Hb	Hemoglobina
Hem	Hemina
kDa	Kilodaltones
Lbp	Lactoferrin binding protein
m	Minutos
mL	Mililitros
mM	Mili molar
mm	milímetros
NaCl	Cloruro de Sodio
OMS	Organización Mundial de Salud
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer salino de fosfato
PBT	Periplasmic binding dependent transport
PCV7	Vacuna antineumocócica conjugada 7 valente
Pit	Pneumococcal iron transporter
PM	Peso molecular
Rf	Movilidad electroforética relativa

rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Tbp	Transferrin binding protein
TEMED	N, N, N', N'', Tetra Metilen Diamina
Tf	Transferrina
TH	Todd Hewitt
xg	Gravedades
μg	Microgramos

RESUMEN

La mayoría de los estudios de los últimos 40 años han permitido dilucidar que los microorganismos patógenos dependen de hierro para su sobrevivencia, replicación (Weinberg, 2008) e inclusive para llevar a cabo el proceso infeccioso (Simpson, 2000 y Liu y col, 2006). Sin embargo, este elemento generalmente se encuentra unido a metaloproteínas en el humano. Actualmente, se sabe que los microorganismos que infectan al hombre han desarrollado mecanismos basados en receptores expresados a nivel de membrana para obtener este elemento de las fuentes disponibles en el hésped (Simpson, 2000 y Wandersman y col, 2004). Uno de los patógenos de mayor incidencia en infecciones nosocomiales es *Streptococcus pneumoniae* que causa infecciones como otitis media, sinusitis o neumonía hasta enfermedades invasoras como meningitis (Thornton, 2010). Se sabe que este patógeno al igual que otros requiere de hierro y hasta el momento se han descrito tres operones con cuatro genes denominados *pit* que codifican para proteínas que se requieren para la captación de hierro (Brown, 2002). Sin embargo, se desconocen los mecanismos necesarios para la adquisición de hierro para este microorganismo, por lo que, el entendimiento de estos es de gran importancia para un mejor control y manejo de enfermedades causadas por este patógeno. En este trabajo se logró crecer a la cepa R6 y se observó la capacidad de utilizar la Hb como fuente de hierro, el microorganismo se cultivó en caldo Todd-Hewitt, posteriormente se adicionó un agente quelante de hierro para eliminar la disponibilidad de hierro libre. Después el medio se suplementó con diferentes fuentes alternas de hierro. Se realizó el fraccionamiento celular del microorganismo para obtener la fracción membranal y purificar está mediante una técnica de cromatografía por afinidad al grupo hemo y finalmente se realizó la identificación de las proteínas de interés. *S. pneumoniae* tiene mecanismos para obtener hierro a partir de hemoglobina y hemina, pero no de otras fuentes disponibles en el humano como transferrina. De las siete proteínas que se identificaron por espectrometría de masas, seis poseen capacidad de unir hemo y cuatro unen al grupo hemo y Hb, además se especula que dos proteínas funcionan como probables receptores para la captación de hemo.

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

1.1 Clasificación y descripción de *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae o neumococo (palabra derivada del griego, pneumon = pulmón y kokkos = grano) es un estreptococo α -hemolítico (De la Rosa y Prieto, 2003). *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) se clasifica según el manual de Bergey (2010) dentro de la familia *Streptococcaceae* y al género *Streptococcus*. Estas bacterias son anaerobias facultativas, catalasa negativo, crecen en medios enriquecidos con 10% de sangre y medio líquido Todd Hewitt (Toumanen *et al*, 2004).

1.2 Morfología de *Streptococcus pneumoniae*

Las colonias de *S. pneumoniae* crecen en medio sólido (base agar) suplementado con sangre de carnero; están rodeadas por una amplia zona verde intensa debido a lisis parcial de eritrocitos denominada como α -hemólisis (Fig. 1a), pueden presentar morfología mucóide, de color grisáceo, brillante y parecen gotas de aceite en la superficie del agar (Winn, 2008). Sus células se arreglan en pares o cadenas cortas y disponen de una cápsula gruesa de polisacáridos (Fig. 1b y 1c), en la tinción de Gram sus células aparecen como diplococos Gram positivos; presenta óvalos y extremos distales lanceolados y tiene un tamaño de 0.8 μm de diámetro y una longitud de 1.2-1.8 μm (Madigan *et al*, 2004).

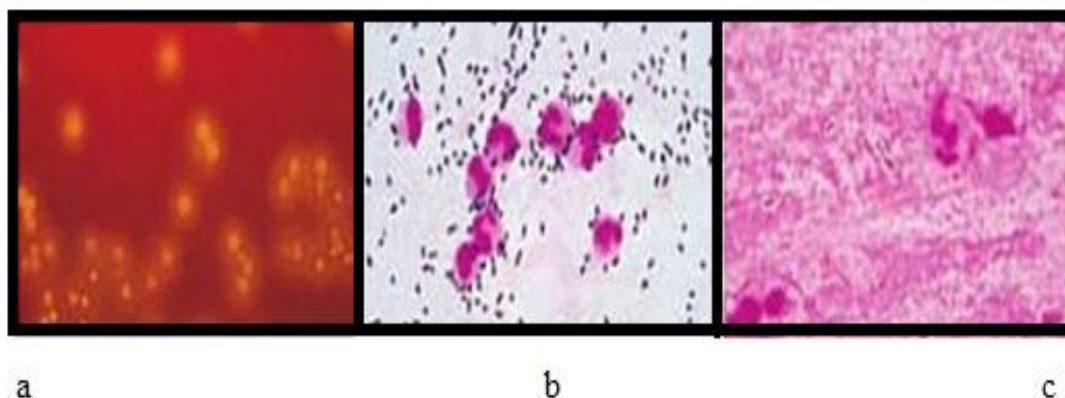


Fig. 1. Morfología colonial y morfología microscópica de *Streptococcus pneumoniae*. a) Colonias de *Streptococcus pneumoniae* con α -hemólisis, b) Tinción de Gram de *Streptococcus pneumoniae* aparece en parejas y c) encapsulados (modificada de Winn, 2008).

1.3 Epidemiología de *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae es uno de los patógenos más frecuentes de las infecciones adquiridas en la comunidad, tanto en la población pediátrica como en adultos (Butler, 2004; Gray *et al*, 1979). La colonización de la nasofaringe es un paso previo al desarrollo de enfermedad neumocócica y las tasas más elevadas de colonización se encuentran en los niños, especialmente en los de edad preescolar (Bogaert *et al*, 2004). En la población infantil, los aislados de neumococos que se encuentran colonizando la nasofaringe constituyen el reservorio ecológico principal a partir del cual surgen, se diseminan las resistencias del microorganismo y reflejan los aislados circulantes en la comunidad. La prevalencia puntual de portadores nasofaríngeos oscila entre el 27% en los países desarrollados y el 85% en los que están en desarrollo (Lencastre y Tomasz, 2002).

En niños menores de cinco años y en adultos mayores de sesenta años, *S. pneumoniae* causa infecciones como otitis media, sinusitis o neumonía (Fig. 2), que pueden ir acompañadas de otras enfermedades invasoras como meningitis y bacteremias (Thornton *et al*, 2010; Yaro *et al*, 2006).

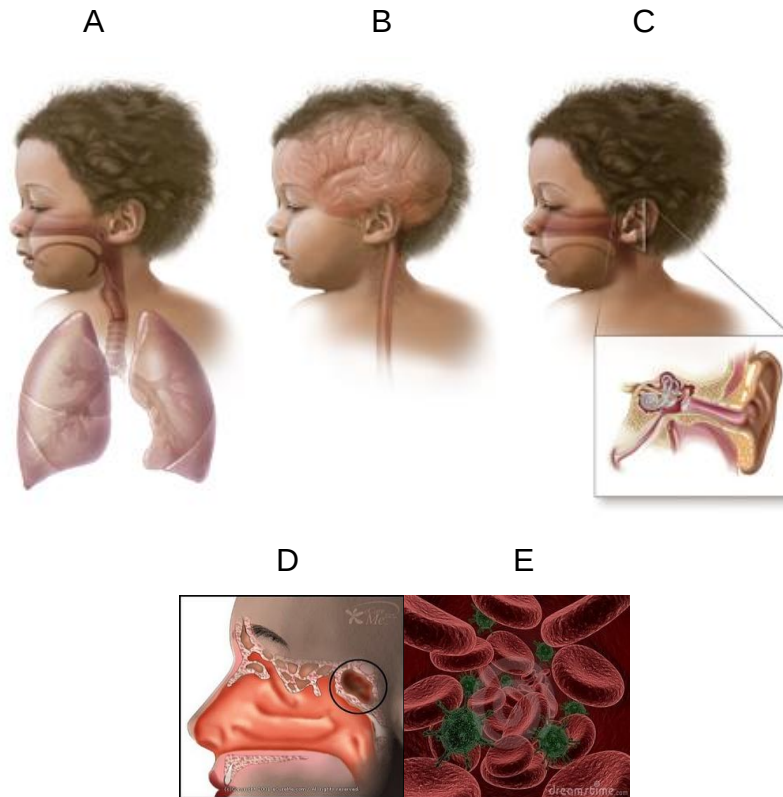


Fig. 2. *Streptococcus pneumoniae*, microorganismo patógeno capaz de causar diversas infecciones y procesos invasivos severos. Las enfermedades frecuentemente causadas por *Streptococcus pneumoniae*. A. Neumonía, B. Meningitis, C. Otitis media, D. Sinusitis y E. Bacteremias.

Existen diferentes clasificaciones serológicas para los neumococos, la americana asigna números cronológicamente considerando su aislamiento, mientras que la clasificación Danesa está basada en características antigénicas (Lund y Henrichsen, 1978). Existen 90 serotipos de *S. pneumoniae*, 23 de estos representan más del 88% de las bacteremias y meningitis por neumococos (Musher, 2000) y alrededor de la mitad han sido implicados en distintas enfermedades, lo que ha complicado el desarrollo de una vacuna con cobertura total para los serotipos existentes. La distribución de los serotipos patógenos varía a lo largo del tiempo y está en función de la edad, la enfermedad, su gravedad y la región geográfica. Antes de la introducción de las vacunas antineumocócicas conjugadas (PCV), el 70% o más de todas las Enfermedades Neumocócicas

Invasivas (ENI) en niños eran causadas por un número de serotipos que oscilaba a nivel mundial entre 6 y 11 (Johnson *et al*, 2010).

De los 8,8 millones de muertes de menores de cinco años que se produjeron en el mundo, durante el 2008, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que alrededor de 476 000, fueron causadas por infecciones neumocócicas (O'Brien *et al*, 2009). Se ha observado que las tasas de morbilidad y mortalidad son mayores en los países en desarrollo que en los industrializados y la mayoría de las muertes se producen en África y Asia. Antes de la inmunización generalizada con la vacuna antineumocócica conjugada 7 valente (PCV7), la incidencia anual media de Enfermedad Neumocócica Invasiva (ENI) en menores de dos años era de 44,4/100 000 en Europa, y de 167/100 000 en los Estados Unidos de Norteamérica (Isaacman *et al*, 2010; Black *et al*, 2008). En comparación, en África la incidencia anual de ENI en menores de dos años oscilaba entre 60/100 000 en Sudáfrica y 797/100 000 en Mozambique (Roca *et al*, 2006; Karstaedt *et al*, 2000; Cutts *et al*, 2005).

En México, las infecciones de vías respiratorias continúan siendo una de las 10 primeras causas de morbilidad y mortalidad en los menores de cinco años de edad. En las infecciones de origen comunitario los principales agentes etiológicos son virus y bacterias. Dentro de las bacterias, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catharralis* son las que se aíslan con mayor frecuencia (Echániz, 1997; Mulholland, 1999).

1.5 HIERRO

1.5.1 Importancia del hierro en los sistemas biológicos

El hierro se encuentra en la naturaleza en dos estados de oxidación, Fe^{3+} o Fe^{2+} . Este catión es esencial para los seres vivos debido a sus propiedades como elemento prostético altamente versátil para incorporarse a proteínas, por tanto funciona como un cofactor de proteínas hierro-azufre (Horton *et al*, 2002), siendo agente reductor en diversos procesos celulares como la respiración celular donde juega un papel importante en la transferencia de electrones, formando parte de moléculas clave como los citocromos, la ribonucleótido reductasa y otros componentes relacionados con el metabolismo y biosíntesis de macromoléculas como el DNA, por ejemplo, participa en la síntesis de bases pirimidicas y ácidos grasos (Crosa y Walsh, 2002; Ratledge y Dover, 2000; Köster, 2001).

1.5.2 Importancia del hierro para los microorganismos

La limitación de la disponibilidad de hierro inhibe el crecimiento de cualquier especie bacteriana; se sabe que las bacterias necesitan una concentración de hierro entre 10^{-6} y 10^{-8} M (Pradel *et al*, 2000). Sin embargo, la concentración en solución de hierro libre en el organismo humano suele ser de 10^{-18} M, valor muy inferior al requerimiento bacteriano (Ratledge y Dover, 2000).

El Fe^{2+} es soluble y accesible para las bacterias que tan sólo requieren su transporte a través de la membrana celular, sin embargo en presencia de O_2 y a $\text{pH} \geq 7$ se oxida a Fe^{3+} , volviéndose insoluble y no biodisponible para los patógenos (Andrews *et al*, 2003). Se sabe que las bacterias, emplean agentes quelantes ya sea unidos a su superficie celular o secretándolos al exterior como estrategias preferentemente empleadas para obtener este catión del medio (Guerinot, 1994).

1.5.3 El hierro y el estrés oxidativo

El hierro libre es extremadamente tóxico en condiciones aeróbicas y además es una fuente de radicales peligrosos para la célula, debido a que si hay hierro libre en el citoplasma celular se forman especies reactivas de oxígeno reducido como se muestra en la figura 3 existen especies como los radicales hidroxilos ($\text{OH}^\bullet$), aniones superóxidos (O_2^-) y peróxidos (RO_2), a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Touati, 2000).

Estos radicales libres pueden afectar los sistemas vivos dañando membranas lipídicas, proteínas y ácidos nucleicos (Zheng *et al*, 1999; Wandersman y Delepelaire, 2004), por lo que la célula debe eliminarlos antes de que causen daños significativos (Hansberg, 2002); como consecuencia, en presencia de oxígeno, el hierro es a la vez poco disponible y potencialmente tóxico (Andrews *et al*, 2003).

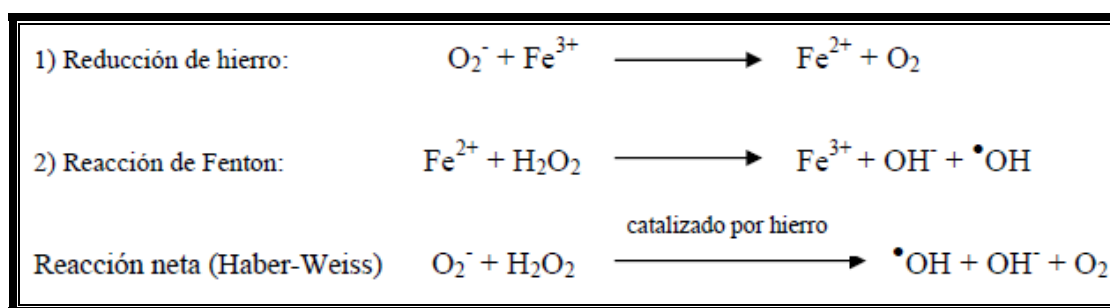


Fig. 3. Reacciones óxido-reducción en presencia de hierro y generación de especies reactivas de oxígeno (modificada de Andrews *et al*, 2003).

1.5.4 Disponibilidad de hierro en el organismo humano

Se sabe que cuando se lleva a cabo algún proceso de infección por diversos patógenos bacterianos, estos pueden adquirir directamente todos los nutrientes que necesita del huésped que infecta, con excepción del hierro libre (Ratledge y Dover, 2000). En los tejidos del huésped, el hierro no se encuentra de manera libre, sino que está unido a diversas proteínas, como a la hemoglobina la cual viaja en los glóbulos rojos y realiza el transporte de oxígeno (Tabla 1). En individuos sanos, aproximadamente el 65% de este elemento forma parte de la **hemoglobina**. También este elemento se puede almacenar intracelularmente; en forma de **ferritina**, principalmente en los hepatocitos, otra fracción es almacenada en macrófagos de hígado, bazo, médula ósea y en el músculo **mioglobina**. Una pequeña fracción del hierro corporal total, se halla en proteínas extracelulares como **transferrina o lactoferrina**. Cantidades más pequeñas de hierro se encuentran en diversas *hemoproteínas* (citocromos, catalasas, peroxidasas) y enzimas no relacionadas al grupo *hemo* como ribonucleótido, reductasas, metaloflavoproteínas y proteínas con núcleos hierro-azufre (Forrelat *et al*, 2000).

Como se observa en la figura 4A, del contenido total de hierro presente en el organismo humano, el 80% se encuentra como hierro funcional o activo, representando la Hb 65%, la mioglobina 10% y otras enzimas 5%; el 20% restante de hierro total forma el depósito de hierro (ferritina y hemosiderina) y sólo un pequeño porcentaje es requerido para el transporte de hierro (transferrina). En la figura 4B se muestra la distribución de hierro en diferentes órganos y tejidos en el organismo humano; su transporte es llevado a cabo por diferentes proteínas y enzimas, por ejemplo el hierro de la dieta es transportado por la transferrina al tejido muscular (mioglobina) y/o puede almacenarse hierro en el hígado (ferritina).

Fig. 4. Distribución y contenido de hierro en el organismo humano

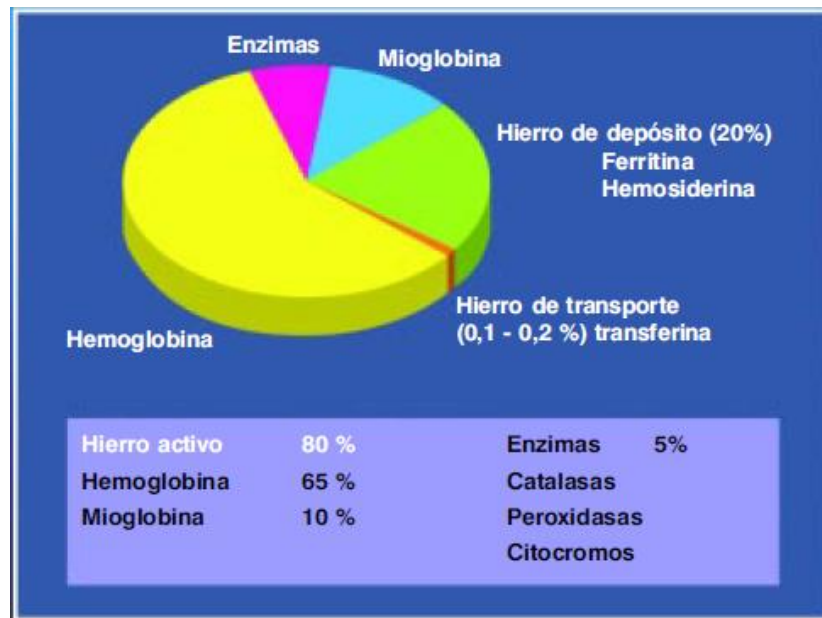


Fig. 4A. Distribución del contenido de hierro total en el organismo humano (Forrelat *et al*, 2000).

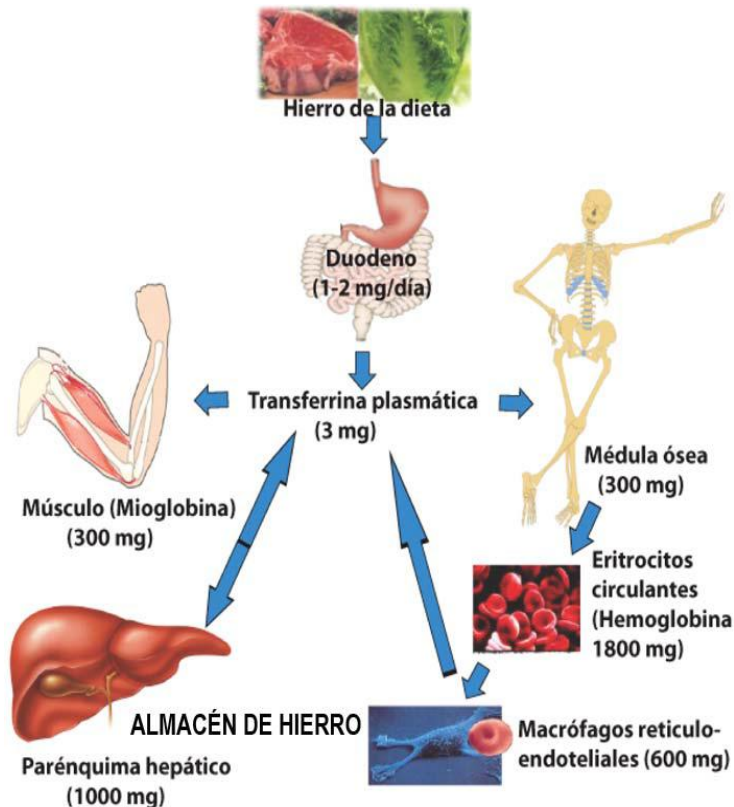


Fig. 4B. Distribución de hierro a los órganos y tejidos en el organismos humano (De la Garza *et al*. 2010).

De acuerdo con Baker *et al.* (2003), para evitar la toxicidad del hierro libre, la mayor parte de este elemento es captada por proteínas especializadas llamadas metaloproteínas que unen hierro libre (ferriproteínas) o acoplado al grupo *hemo* (hemoproteínas), que son fuentes de hierro disponibles en el hospedero (Tabla 1).

1.5.5 Clasificación de fuentes de hierro en el organismo humano

Las proteínas especializadas que se encuentran como fuentes de almacén en el organismo humano, se clasifican en dos grupos: proteínas que unen hierro (ferriproteínas) y proteínas que unen el grupo hemo (hemoproteínas). En la tabla 1 se presenta la clasificación y las características principales de las metaloproteínas que unen hierro y el grupo hemo; se indica el peso molecular aproximado de las proteínas en kDa, así como la función y localización en el cuerpo humano (Forrelat *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003).

Tabla 1. Clasificación y características principales de las metaloproteínas que unen hierro y el grupo hemo.

PROTEÍNAS QUE UNEN HIERRO LIBRE			
Proteína	Peso Molecular (kDa)	Función	Localización
Lactoferrina	80	Protege al organismo al quelar el hierro libre y tiene actividad bacteriolítica	Suero y mucosas
Transferrina	80	Transporta y almacena hierro	Suero
Ferritina	900	Almacena hierro y lo pone a disposición del organismo	Hígado
PROTEÍNAS QUE UNEN EL GRUPO HEMO			
Proteína	Peso Molecular (kDa)	Función	Localización
Mioglobina	17.8	Transporte de Oxígeno	Músculo
Hemopexina	60	Une hierro y lo entrega a los hepatocitos	Suero
Albúmina	68	Une átomos de hierro y acarrea grupos hemo	Suero
Hemoglobina	64.5	Transporta O ₂ y CO ₂	Eritrocitos
Haptoglobina	80-160	Une hemoglobina libre	Suero
Catalasa	244	Cataliza la descomposición del H ₂ O ₂ en H ₂ O y O ₂	Peroxisomas
Citocromos	Variable	Transporte de energía	Membrana citoplasmática/ mitocondrial

Una de las principales hemoproteínas, es la **hemoglobina** la cual es una proteína globular, presente en los hematíes en altas concentraciones (Tabla 1), encargada de fijar oxígeno en los pulmones y transportarlo por la sangre hacia los tejidos y células que rodean los capilares del sistema vascular. Al volver a los pulmones, desde la red de capilares, la hemoglobina actúa como transportador de CO₂ y de protones (Telen, 1994).

En la figura 5A se muestra que esta proteína es un tetrámero formado por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de tipo alfa y dos de tipo beta unidas entre sí de forma no covalente, cada una con un grupo prostético hemo. Un grupo prostético es la porción no polipeptídica de una proteína. **Hemina** es el nombre farmacológico, para el grupo **hemo**, el cual es una molécula de porfirina que contiene un átomo de hierro en su centro. El tipo de porfirina de la Hb es la protoporfirina IX; contiene dos ácidos propiónicos, dos vinilos y cuatro metilos como cadenas laterales unidas a los anillos pirrólicos en estructura. El Fe^{2+} del hemo puede formar seis enlaces de coordinación, cuatro de ellos, situados en el plano del hemo, se establecen con los nitrógenos de los anillos pirrólicos de la protoporfirina IX. Los otros dos, perpendiculares al plano del hemo, se establecen con el nitrógeno de la cadena lateral de la histidina F8 (histidina *proximal*) y con el oxígeno (Fig. 5B). A la misma cara del hemo, a la que se une el oxígeno, se aproxima la cadena lateral de la histidina E7 (histidina *distal*), que aunque no establece enlace con el Fe^{2+} , dificulta estéricamente la unión del CO al sitio del oxígeno (Perutz, 1976; Schultz, 1993; Telen, 1994).

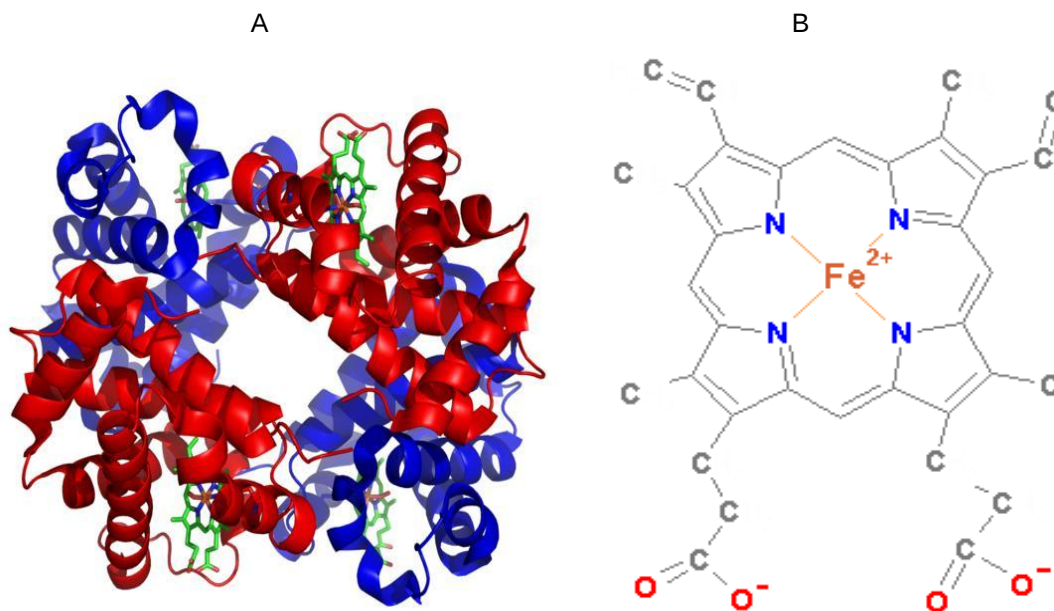


Fig. 5. Estructura de la Hemoglobina y del grupo hemo. A. Representación de la estructura cuaternaria de la Hb, las subunidades protéicas alfa y beta se muestran en rojo y azul, los grupos hemo, que contienen hierro, en verde. B. Estructura del grupo hemo, en rojo se señala el átomo de hierro y en azul los cuatro nitrógenos de los anillos pirrólicos con los que el Fe forma 4 enlaces de coordinación (Protein Data Bank www.pdb.org).

La vitamina B12 presenta una estructura que resulta de la unión asimétrica de 4 anillos pirrólicos, formando un grupo macrocíclico casi planar (núcleo corrina) en torno a un átomo central de cobalto (Co). En la figura 6 se observa que el anillo corrina es parecido al anillo porfirínico y se diferencia de éste por el carácter asimétrico de las uniones entre los grupos pirrólicos (Forrelat, 1999).

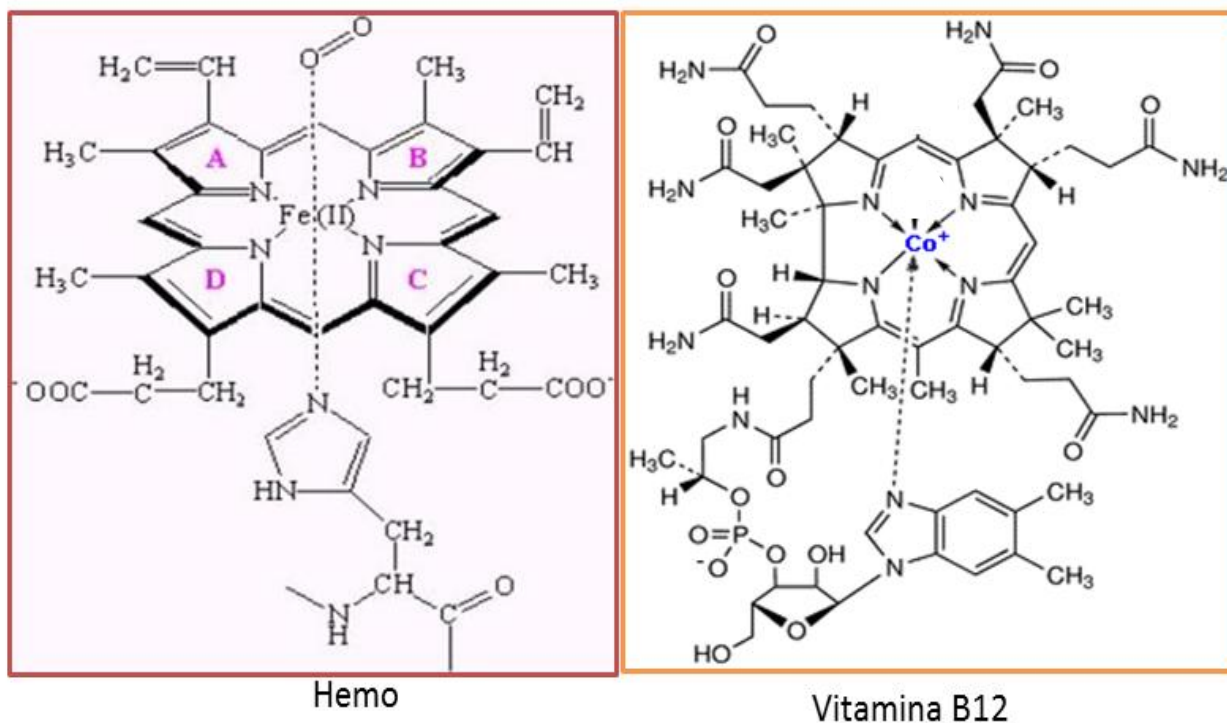


Fig. 6. Estructuras del grupo hemo y la vitamina B12 (Forrelat, 1999).

La vitamina B12 presenta una estructura similar a la del grupo *hemo* y tienen como precursor común al ácido aminolevulínico, además, éstas moléculas pueden ser captadas por transportadores ABC. Debido a lo anterior, se podría especular que ambas estructuras son muy similares con la diferencia del metal.

En la figura 7 se muestra el mecanismo propuesto para la captación de sideróforos y vitamina B12 en bacterias Gram negativas, debido a que este mecanismo aún no se ha descrito para los microorganismos Gram positivos. El mecanismo se lleva a cabo en cuatro pasos de la siguiente manera:

1. Se produce la unión del receptor de membrana externa y el complejo ferri-sideróforo (se han descrito receptores con el apo-sideróforo previamente unido).
2. Transducción de la señal. La unión de ligando provoca cambios conformacionales que tienen como resultado un cierre al ambiente extracelular y una mayor exposición del dominio amino-terminal al espacio periplasmático, aumentando la probabilidad de interacción con el complejo Ton.
3. La interacción con el complejo Ton induce cambios estructurales en el receptor, que resultan en la translocación del ferri-sideróforo al espacio periplasmático. Se desconoce si la interacción induce simplemente la apertura de un canal de difusión o si causa la salida de todo el dominio globular hacia el espacio periplasmático.
4. Las proteínas de unión periplasmática dirigen el complejo ferri-sideróforo a transportadores ABC-dependientes de membrana interna.

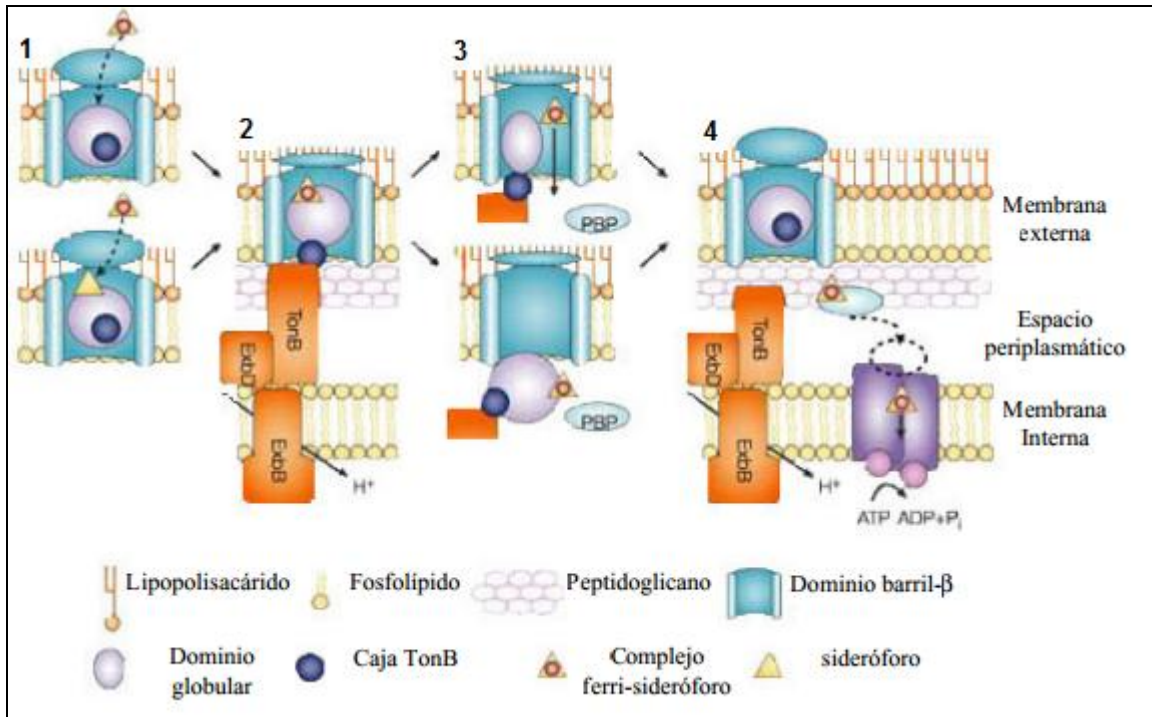


Fig. 7. Mecanismo propuesto para la captación de vitamina B12 en bacterias Gram negativas (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003).

1.5.6 Mecanismos de adquisición de hierro desarrollados por los microorganismos patógenos para obtener hierro dentro del hospedero

La mayoría de los estudios de los últimos 40 años han permitido dilucidar que bacterias, hongos y protozoarios dependen del hierro para sobrevivir y replicarse (Weinberg, 2008) e inclusive para llevar a cabo el proceso infeccioso (Simpson, 2000; Liu *et al*, 2006), sin embargo, si este elemento se encuentra unido a proteínas como la transferrina, lactoferrina o hemoglobina, ¿cómo se obtiene hierro dentro del humano? Actualmente, se sabe que los microorganismos que infectan al hombre han desarrollado mecanismos para obtener este elemento de fuentes disponibles en el hospedero como hemoproteínas y ferriproteínas (Simpson, 2000; Wandersman *et al*, 2004).

En las bacterias Gram negativas, el hierro biodisponible debe atravesar la membrana externa hasta el periplasma y posteriormente introducirlo al citoplasma a través de la membrana celular. Para ello, la célula posee receptores de membrana externa y un sistema (complejo Ton B) que le suministra la energía necesaria para el transporte del hierro al periplasma (Wandersman *et al*, 2004).

1.6 Importancia del sistema Ton B para los receptores

Las plantas, bacterias, hongos y levaduras emplean agentes quelantes orgánicos de hierro (sideróforos) para establecer relaciones de comensales y patógenos con el hospedero y para sobrevivir como organismos de vida libre. En bacterias Gram negativas, el transporte de sideróforos en el periplasma está mediado por receptores dependientes de un sistema conocido como TonB, el cual es un complejo de tres proteínas anclado en la membrana interna TonB, ExbB y ExbD que se acoplan al potencial quimiosmótico de la membrana citoplasmática con la captación de sideróforos a través de la membrana externa (Ferguson, 2002).

La proteína Ton B actúa en conjunto con las proteínas ExbB y ExbD. Este sistema de proteínas proporciona energía en forma de ATP a los receptores de membrana externa, por medio de una fuerza protón motriz, que es generada por las proteínas ExbB y ExbD y la energía que es proporcionada por el ATP provoca que el receptor libere su ligando hacia el espacio periplásmico (Wandersman *et al*, 2004).

1.7 Mecanismos de captación de hierro por microorganismos

En la tabla 2 se muestran los mecanismos de captación de hierro de que disponen las bacterias patógenas, tanto Gram negativas como Gram positivas, pueden o no depender directamente de moléculas protéicas. Los que implican la síntesis de proteínas, a su vez se clasifican en dos tipos: moléculas secretadas como los sideróforos y hemóforos o bien proteínas que son expresadas a nivel de

membrana externa para unir directamente la fuente de hierro (Wandersman *et al*, 2004; Weinberg, 2008).

Tabla 2. Clasificación de los sistemas de adquisición de hierro por patógenos.

Sistemas de adquisición de hierro	
Grupo 1	Grupo 2
*Sideróforos *Hemóforos	*Receptores -Sideróforos -Hemóforos -Transferrina -Lactoferrina -Hemo y hemoglobina

1.7.1 Grupo 1. Sideróforos y hemóforos

Los sideróforos son moléculas quelantes de hierro de bajo peso molecular <1 kDa, se caracterizan porque poseen una alta especificidad y afinidad hacia el hierro férrico (Andrews *et al*, 2003), actúan como agentes solubilizantes extracelulares de hierro a partir de minerales o compuestos orgánicos, tales como la transferrina (Crosa y Walsh, 2002), son sintetizados y secretados por los microorganismos patógenos para captar hierro del medio extracelular y ser reconocidos por receptores específicos de membrana que le permiten penetrar al interior de la célula y liberar a la molécula de hierro (Ratledge y Dover, 2000). Los hemóforos son proteínas de peso molecular aproximado a 10 kDa, su función es unir al grupo *hemo* de las hemoproteínas y conducirlo a una proteína de membrana externa, que lo transportará al interior de la célula (Genco y Dixon, 2001). El hemóforo mejor caracterizado es HasA de *Serratia marcescens*, el cual es secretado, en condiciones de restricción de hierro, para capturar el grupo *hemo* de la hemoglobina (Létoffé *et al*, 2001).

1.7.2 Grupo 2. Receptores de hierro

Los receptores de moléculas que transportan hierro se encuentran en la membrana de las bacterias Gram negativas o, en el caso de las bacterias Gram positivas, en la pared celular. Se inducen por la inanición de hierro y pueden unir sideróforos/hemóforos, transferrinas/lactoferrinas y/o hemo/hemoproteínas (Andrews *et al*, 2003).

1.7.3 Receptores para sideróforos y hemóforos

En las bacterias Gram negativas el mecanismo básico de captura de hierro, mediado por sideróforos, consiste en la unión del complejo ferrisideróforo a receptores de membrana externa esenciales para la expresión de factores de virulencia en algunas bacterias (Lefranc, 2004); seguido de su transporte activo hacia el espacio periplásmico mediante la energía provista por el complejo de la membrana citoplásmica TonB. Los sideróforos presentes en el espacio periplásmico son transportados contra gradiente de concentración por el complejo ABC hacia el citosol. El complejo ferrisideróforo es finalmente reducido o degradado en el citosol para liberar los iones Fe^{2+} (Wandersman *et al*, 2004). Los complejos TonB y ABC están vinculados a la virulencia en algunas bacterias que producen sideróforos para captar hierro (Takase *et al*, 2000; Reeves *et al*, 2000; Torres *et al*, 2001).

El mecanismo de captura de hierro en el que participan los hemóforos consiste en que estas moléculas extraen el grupo hemo de las hemoproteínas y lo dirigen a receptores de superficie para ser posteriormente internalizado al espacio periplásmico mediante el complejo TonB (Genco y Dixon, 2001). El transporte del complejo hemo del espacio periplásmico al citosol se lleva a cabo por la permeasa ABC. Al parecer, las proteínas periplásmicas no están implicadas en la captura del grupo hemo y su fijación con la permeasa ABC (Andrews *et al*, 2003).

Una vez en el citoplasma, el hemo es degradado por hemooxigenasas para liberar el Fe^{2+} (Genco y Dixon, 2001).

1.7.4 Receptores para transferrina y lactoferrina

El mecanismo directo de captura de Fe^{3+} fijado a la transferrina y/o lactoferrina que se conoce con mayor detalle es el de *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus* spp (Schryvers, 1999). En las neisserias patógenas, la fijación de Fe^{3+} unido a transferrina está mediada por el receptor de membrana denominado Tbp (del inglés transferrin binding protein) y por el receptor Lbp (del inglés lactoferrin binding protein). El Tbp está integrado por un complejo de proteínas TbpA y TbpB el cual se ha relacionado con la virulencia del neumococo. Este complejo receptor Tbp remueve los iones Fe^{3+} de la ferriproteína y permite su transporte contra gradiente de concentración a través de la membrana externa hacia el espacio periplásmico. La energía requerida para este transporte activo de Fe^{3+} mediado por Tbp deriva de la fuerza motriz de protones generada por el complejo TonB (Ferguson, 2002). Este último se encuentra formado por las proteínas integrales de membrana citoplásmica TonB, ExbB y ExbD y es crucial en la virulencia de algunas bacterias que captan transferrina como fuente de hierro (Takase *et al*, 2000).

1.7.5 Receptores de hemo y hemoglobina

En cuanto a la captación de hemina/hemoproteínas, se han descrito hasta el momento dos mecanismos básicos en bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* (ChuA), *Neisseria meningitidis* (HmbR), *Porphyromonas gingivalis* (HmuR) y *Yersenia pestis* (HmuR) (Wandersman *et al*, 2004) y son los siguientes:

1. El más común se basa en la unión directa y el procesamiento del grupo hemo o de la hemoproteína por un receptor de membrana externa dependiente de TonB. La hemina pasa al periplasma para ser transportada al citoplasma vía un sistema PBT (del inglés periplasmic binding dependent transport).
2. El otro sistema consta de una proteína soluble, llamada hemóforo, que interacciona con las hemoproteínas y transporta la fuente de hierro a la superficie celular, donde interacciona con los receptores los cuales internalizan a la hemina ayudados por un sistema dependiente de TonB (Ratledge y Dover, 2000).

Además de los mecanismos básicos, se sabe que algunos patógenos producen enzimas que aumentan la eficacia de estos sistemas, sintetizando proteasas que secretan al medio y degradan a las proteínas transportadoras de hierro del huésped (Genco y Dixon, 2001). Por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis* sintetiza la proteinasa Kgp, que se une a hemoglobina, hemopexina y transferrina y degrada estas fuentes de hierro.

1.7.6 Transporte del hierro a través de la membrana citoplasmática

En las bacterias Gram positivas, micobacterias y miembros del grupo micoplasma, ni el Complejo Ton, ni los receptores de membrana externa son necesarios. En este caso las proteínas de unión al hierro son lipoproteínas ancladas en la membrana citoplasmática, por lo tanto deberán atravesar la capa de peptidoglicano y esta membrana (Köster, 2001).

Una vez que el hierro se encuentra en el periplasma, debe entrar al citoplasma, lo cual se realiza a través de un mecanismo dependiente de ATP del tipo ABC (del inglés ATP-binding cassette), describiéndose distintas vías que implican la entrada de Fe^{2+} , Fe^{3+} y del ión férrico unido a sideróforos o al grupo hemo (Köster, 2001).

El sistema encargado del transporte de hierro a través de la membrana citoplasmática consiste en un mecanismo del tipo ABC, está integrado por lo siguiente:

- Una o varias proteínas periplásmicas de unión al sustrato que pueden ser solubles o bien encontrarse ancladas a la membrana citoplasmática en forma de lipoproteínas como sucede en el caso de las bacterias Gram positivas y en algunas Gram negativas. Actualmente no se sabe si la proteína de unión reconoce al sustrato (sideróforo, hemo o vitamina B12) cuando está unido al receptor o si, de alguna forma lo recoge del periplasma (Köster, 2001).
- Una o dos proteínas de membrana interna que forman la permeasa transmembranal.
- Una o dos ATP hidrolasas o ATPasas encaradas hacia el citoplasma que aportan la energía al sistema (Köster, 2001).

1.7.7 Importancia de los transportadores ABC

Como se muestra en la figura 8, cuando el grupo hemo ha sido incorporado hacia el espacio periplásmico, es transportado al interior de la bacteria a través de una permeasa tipo ABC, que consta de una proteína de unión periplásmica y de un complejo de membrana interna, la cual obtiene energía a partir de ATP por medio de una ATPasa ABC (Wandersman *et al*, 2004).

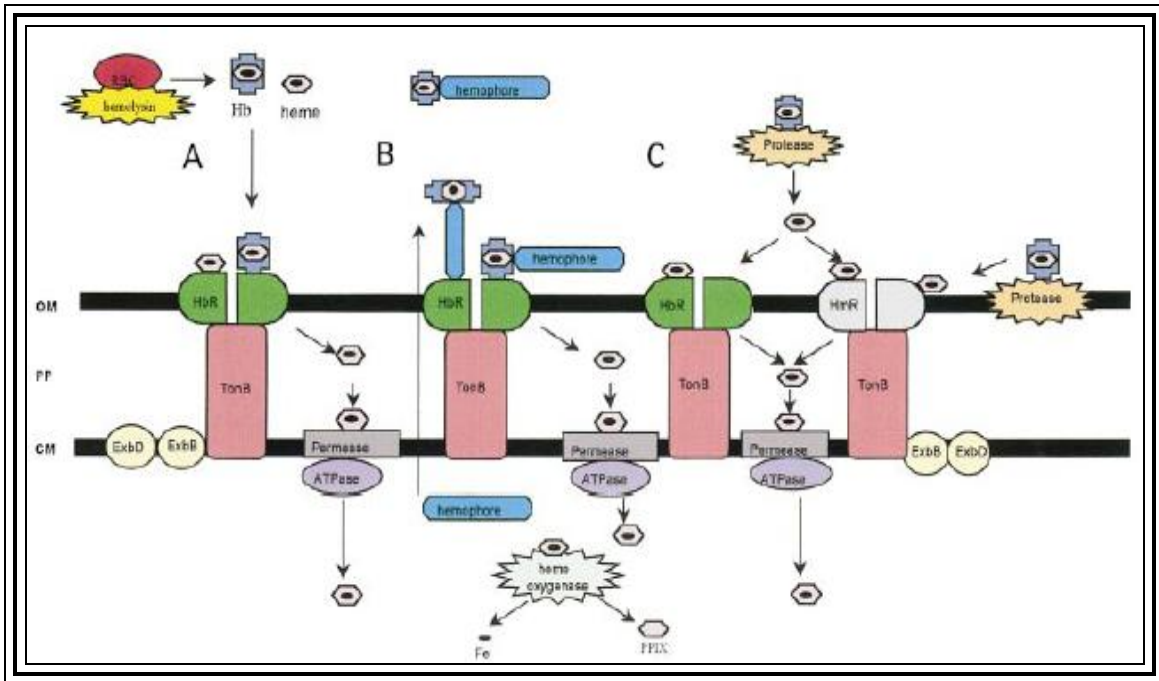


Fig. 8. Mecanismo de acción para hemóforos y hemoproteínas. Se representa: A. Receptor para hemoglobina y grupo hemo, B. Unión del grupo hemo a través de un hemóforo, C. Unión del grupo hemo a su receptor, OM. Membrana externa, PP. Espacio periplásmico y CM. Membrana citoplasmática (Genco y Dixon, 2001).

Los sistemas ABC de bacterias Gram positivas están menos estudiados, pero en general se parecen a los de las Gram negativas, aunque carecen del transportador libre periplásmico. Sin embargo, presentan una proteína con funciones equivalentes (captar el nutriente del exterior), pero que está anclada al lado externo de la membrana citoplásmica, cerca del heterodímero integral de membrana.

El mecanismo más descrito para los Gram positivos es el de *Staphylococcus aureus*, conocido como sistema Isd, el cual está compuesto por un grupo de siete proteínas denominadas Isd de la A a la G, que se encargan de unir hemoglobina y transportar el hierro ligado a la hemina a través de la pared bacteriana. Así, IsdB es la proteína responsable de unir la hemoglobina a la superficie bacteriana, IsdA e IsdB separan la hemina de la hemoglobina y la transfieren a IsdC. A su vez, ésta proteína que se encuentra localizada en la pared celular, transfiere la hemina a los

factores de translocación de membrana, IsdD, IsdE e IsdF, los cuales introducen el hemo al citoplasma. Finalmente, la proteína IsdG, localizada en el citoplasma, presumiblemente se encarga de liberar el hierro del hemo. Otras bacterias como *Bacillus anthracis* expresan proteínas Isd, así que es probable que también exista un sistema similar de adquisición de hierro en otras bacterias Gram positivas (Mazmanian *et al*, 2003).

2. ESTADO DEL ARTE

Las bacterias frecuentemente tienen múltiples mecanismos para la adquisición de hierro, el cual es un micronutriente esencial para su crecimiento y desarrollo durante el proceso infeccioso en el hospedero.

Se realizaron estudios interesantes en los cuales se demostró que *S. pneumoniae* crece en medios limitados de hierro, posteriormente suplementados con Fe^{2+} , Fe^{3+} y con hemoproteínas como hemoglobina y hemo, sin embargo *S. pneumoniae* no crece con proteínas que unen hierro libre como transferrina, lactoferrina y ferritina, hasta el momento no existen evidencias contundentes que demuestren que *S. pneumoniae* produzca sideróforos (Tai *et al*, 1997; Brown *et al*, 2002). Se han relacionado a este proceso tres operones con cuatro genes denominados *pit* (*pneumococcal iron transporter*), que codifican para proteínas con similitud a los transportadores ABC y son requeridos para la captación de hierro en bacterias Gram positivas y Gram negativas (Brown *et al*, 2002). No obstante, aún no se han descrito los mecanismos mediante los cuales este microorganismo patógeno adquiere el hierro.

3. ANTECEDENTES PARTICULARES

En la figura 9 se observa el crecimiento de *S. pneumoniae*, limitado en un medio restringido de hierro libre, el cual posteriormente puede ser restaurado eficientemente por la adición de hemo y hemoglobina, ya que se ha observado que el patógeno emplea estas fuentes para obtener el hierro, pero no lo hace con transferrina, ferritina y lactoferrina (Tai *et al*, 1997).

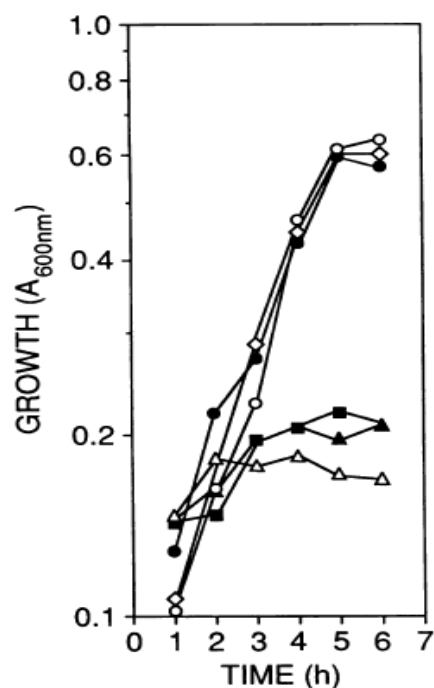


Fig. 9. Crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* en medio Todd Hewitt. Símbolos: ○, sin adición, △, adición de EDDA (700μM); ●, adición de EDDA más hemina (8μM), ◇, adición de EDDA más hemoglobina (2μM); ▲, adición de EDDA más transferrina (60 μg); ■, adición de EDDA más lactoferrina (60 μg) (Tai *et al*, 1993).

De acuerdo con Brown (2002), estudios realizados con *S. pneumoniae* han revelado que tiene al menos tres operones de genes denominados *pit* relacionados con la adquisición de hierro, posiblemente utilizando hemoglobina como principal fuente de hierro.

En la figura 10 se muestra una esquematización del operon *pit* donde se refleja la similitud de las secuencias de aminoácidos, obtenidas mediante Blast, que se predicen para cada gen. El segmento *pitA* codifica para un receptor de hierro el cual es una lipoproteína (PitA) de 339 residuos de aminoácidos, un gen ATPasa cuyo producto resulta ser (PitD) de 363 residuos de aminoácidos, y dos genes que codifican para proteínas permeasas transmembranales (PitB) de 208 residuos de aminoácidos y (PitC) de 274 residuos de aminoácidos.

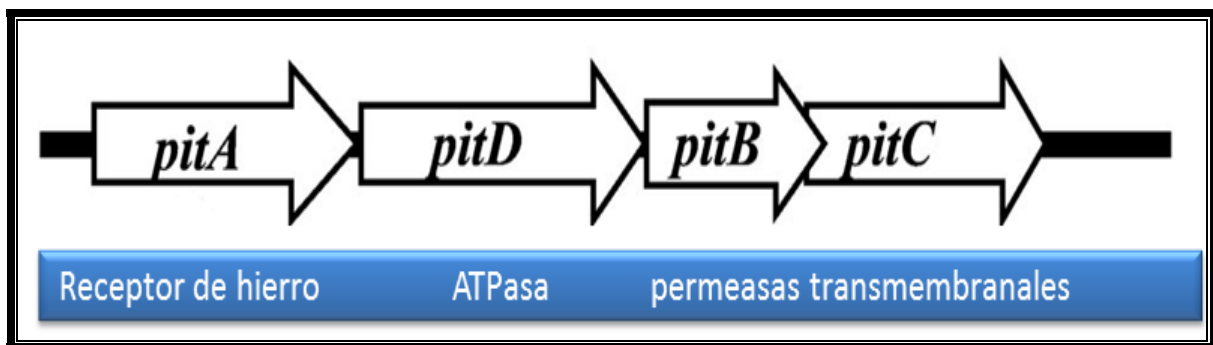


Fig. 10. Genes *pit* descritos para la captación de hierro en *S. pneumoniae* (Brown *et al*, 2002).

Brown 2002, realizó un análisis bioinformático en el cual detectó que los ortólogos más cercanos para las proteínas Pit putativas de *S. pneumoniae* son proteínas transportadoras de hierro que codifican para el locus *bit* de *Brachyspira hyodysenteriae* y *Streptococcus pyogenes* (Tabla 3).

Tabla 3. Proteínas que presentan similitud a PitADBC (Brown *et al* ,2002).

Proteína pit	Nombre de la proteína	Función	Organismo	% de Identidad	Longitud de aminoácidos comparados
Pit A	AE006550	Lipoproteína para captación de hierro	<i>Streptococcus pyogenes</i>	52/73	323
	BitA	Lipoproteína para captación de hierro	<i>B. hyodysenteriae</i>	42/63	306
	BitB	Lipoproteína para captación de hierro	<i>B. hyodysenteriae</i>	42/60	306
	BitC	Lipoproteína para captación de hierro	<i>B. hyodysenteriae</i>	42/61	306
	AfuA	Lipoproteína para captación de hierro	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	30/46	316
	AfuA	Lipoproteína para captación de hierro	<i>Haemophilus influenzae</i>	28/48	284
Pit D	Bit D	ATPasa	<i>B. hyodysenteriae</i>	51/68	366
	Malk	ATPasa	<i>Vibrio cholerae</i>	38/59	359
	PotA	ATPasa	<i>Borrelia burgdorferi</i>	42/65	294
Pit B	Bit E	Proteína transmembranal	<i>B. hyodysenteriae</i>	47/68	191
	HitB	Proteína transmembranal	<i>Haemophilus influenzae</i>	26/44	166
	AfuB	Proteína transmembranal	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	25/42	181
Pit C	Bit F	Proteína transmembranal	<i>B. hyodysenteriae</i>	48/74	189
	AfuB	Proteína transmembranal	<i>Haemophilus influenzae</i>	31/51	188
	AfuB	Proteína transmembranal	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	31/51	188

4. IMPORTANCIA PARA CONTINUAR EL TEMA

Streptococcus pneumoniae requiere de hierro para su crecimiento y sobrevivencia, este catión lo obtiene eficientemente de la Hb, sin embargo, aún se desconocen los mecanismos necesarios para su adquisición, de allí la importancia de estudiar estos eventos, pues el conocimiento de los mismos podrá auxiliarnos en la prescripción de tratamientos adecuados y en el control de infecciones causadas por este patógeno.

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Identificar proteínas membranales que participan en el mecanismo de adquisición de hierro cuando se usa como fuente a la Hb humana en *S. pneumoniae*.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

Obtener proteínas membranales de *S. pneumoniae* que unen el grupo hemo.

Identificar proteínas de unión al grupo hemo por espectrometría de masas.

Analizar la capacidad de competencia de la vitamina B12 con el grupo hemo por su unión a la Hb.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental utilizada para cubrir los objetivos planteados en este proyecto de investigación se desarrolló en cinco etapas las cuales se representan en la figura 11.

Etapa 1. *Streptococcus pneumoniae* se cultivó en medio de cultivo líquido Todd Hewitt, al medio se adicionó un agente quelante de hierro (dipirilo), para secuestrar todo el hierro del medio y posteriormente se adicionaron fuentes de hierro como hemina (Hem), hemoglobina (Hb) y transferrina (Tf), se realizaron curvas de crecimiento y se determinó la densidad óptica (D.O.) y la viabilidad celular del microorganismo.

Etapa 2. *Streptococcus pneumoniae* se cultivó en medio Todd Hewitt con adición de dipirilo y Hb durante siete horas, hasta obtener una D. O. de 0.9, posteriormente se procedió al fraccionamiento celular para la separación de las proteínas totales, obteniendo las proteínas de membrana y citoplasma.

Etapa 3. Las proteínas de membrana, se purificaron partiendo del extracto total de proteínas membranales, empleando una técnica de cromatografía de afinidad, en la cual se utilizó una columna de agarosa acoplada al grupo hemo, para obtener las proteínas que tienen la capacidad de unir hemo.

Etapa 4. Se realizó el ensayo de Overlay para evaluar si las proteínas que poseen la capacidad de unir hemo, pueden capturar el hemo de la Hb, en este experimento se empleó la vitamina B12, para determinar si existe una capacidad de competencia de la vitamina B12 y el hemo de la Hb.

Etapa 5. Se seleccionaron nueve proteínas obtenidas de la purificación de proteínas de membrana con capacidad de unir el grupo hemo, las cuales se identificaron por espectrometría de masas.

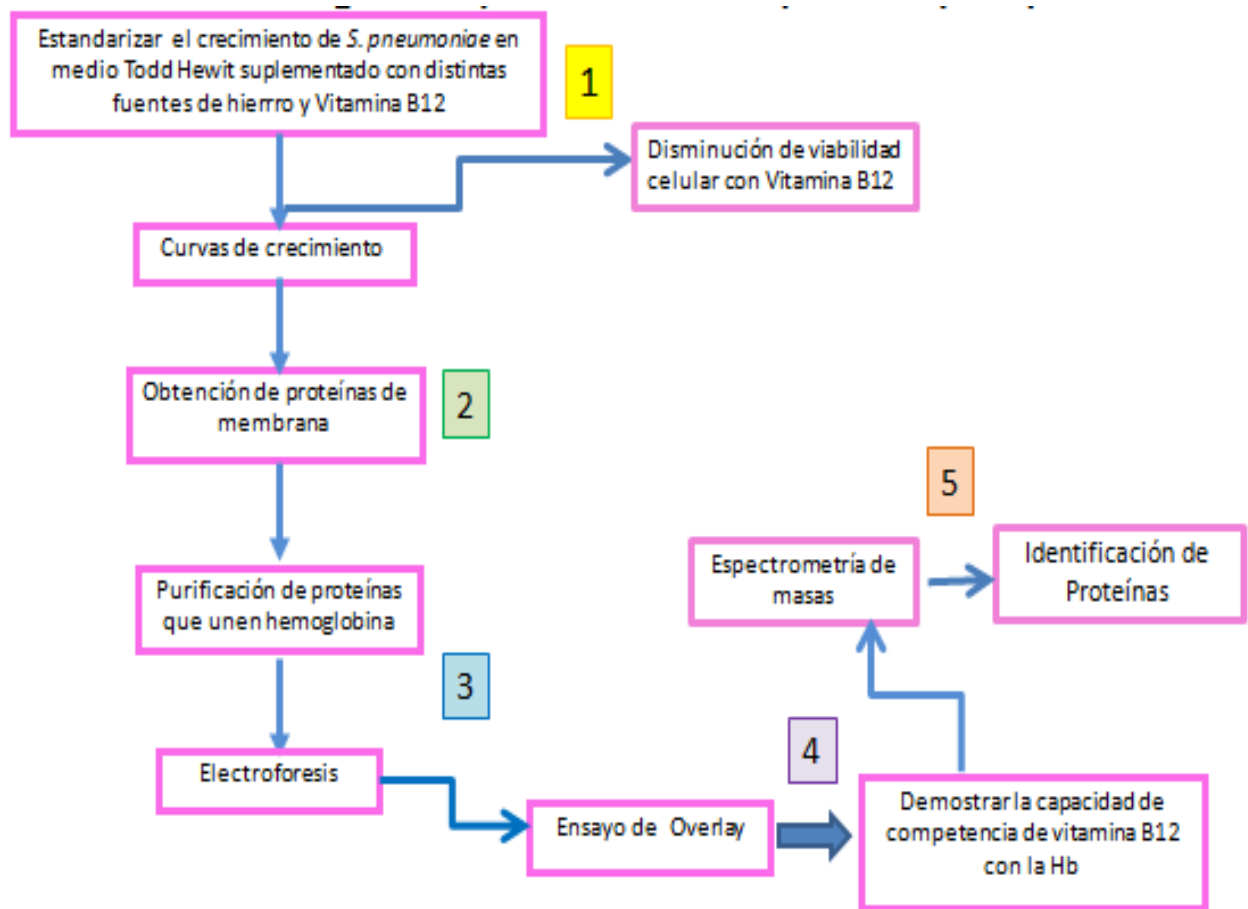


Fig. 11. Estrategia experimental desarrollada.

IV. MATERIALES Y METODOS

1. Obtención de proteínas membranales de *S. pneumoniae* que unen el grupo hemo.

1.1 Almacenamiento de la cepa R-6

La cepa R-6 de *S. pneumoniae* es una cepa no encapsulada derivada de la cepa de tipo capsular D39 y fue seleccionada para realizar el proyecto de investigación debido a que es una cepa no virulenta y su genoma ha sido secuenciado (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

La cepa se recuperó de un congelado en glicerol estéril al 50%, la cual se mantuvo almacenada a -70°C para su uso, por lo que fue descongelada para ser cultivada. Se realizaron observaciones directas de su morfología colonial y características microscópicas en células teñidas por la técnica de Gram, para evaluar la viabilidad celular y descartar la posible contaminación de la cepa, y de esta manera garantizar la calidad de los experimentos.

1.1.2 Cultivo y crecimiento de *S. pneumoniae*

La bacteria *S. pneumoniae*, se obtuvo de un congelado en glicerol estéril 50% del cual se tomó una muestra y se sembró en base agar suplementado con sangre de carnero al 5%, las cajas fueron incubadas con una atmósfera del 5% de CO₂ a 37°C durante 24 h. Al cabo de este tiempo se observó el crecimiento y se tomaron muestras para realizar nuevas resiembras en medio líquido Todd Hewitt (Tabla 4), suplementado con extracto de levadura al 5% que se incubaron bajo las mismas condiciones.

Tabla 4. Composición de Caldo Todd Hewitt.

Contenido de caldo Todd Hewitt:	
Carbonato de Sodio	2.5 g
Cloruro de Sodio	2.0 g
Dextrosa	2.0 g
Fosfato dipotásico	0.4 g
Infusión de corazón	3.1 g
Peptona especial	20.0 g

1.1.3 Estandarización de las curvas de crecimiento limitadas de hierro

En medio de cultivo Todd Hewitt, enriquecido con 5% extracto de levadura, se incubaron las cajas sembradas a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo fue adicionado con 2-2 dipirilo (agente quelante específico para hierro) en diferentes concentraciones desde 200µm a 800µm, con el objeto de determinar la concentración óptima (700µm), a la cual el hierro del medio es secuestrado en su totalidad. Posteriormente, se procedió a inocular el microorganismo bajo las condiciones mencionadas, para restringir el crecimiento de *S. pneumoniae* por limitación de hierro. El crecimiento fue monitoreado por densidad óptica (D.O.) durante siete horas, realizando lecturas cada hora. Se uso una longitud de onda (λ) de 600 nm, con lo que se consiguió establecer los tiempos de las diferentes fases de crecimiento: fase exponencial y fase estacionaria.

1.1.4 Curvas de crecimiento restringidas de hierro y suplementadas con diferentes fuentes de hierro

Se observó que en el medio que contiene 2-2 dipirilo se inhibió el crecimiento de *S. pneumoniae* ya que este compuesto, fue capaz de capturar el hierro del medio, por lo que se emplearon diferentes fuentes de hierro para que se pudiera restablecer el crecimiento de la bacteria. El microorganismo fue sembrado en medio líquido Todd Hewitt enriquecido con 5% extracto de levadura y medio de

cultivo Todd Hewitt con 2-2 dipirilo y posteriormente, fueron incubados los cultivos a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% y se incubaron por un periodo de 16 horas. Durante este tiempo se permitió el crecimiento de la bacteria, posteriormente fue medida y ajustada la densidad óptica (0.1), se adicionó medio fresco y fueron incubados los cultivos nuevamente, monitoreando su crecimiento cada hora. A la tercera hora después de ser incubados los cultivos fueron suplementados con las diferentes fuentes de hierro. Las fuentes de hierro empleadas en el experimento fueron hemina 8µm, hemoglobina 2µm y transferrina 4µm.

1.2 Fraccionamiento celular de proteínas de *S. pneumoniae*

S. pneumoniae fue separado en fracciones subcelulares. La bacteria se cultivó en 20 ml de medio líquido Todd-Hewitt y su crecimiento se monitoreó hasta llegar a una densidad óptica (D.O.) de 0.9 a una longitud de onda (λ) de 600 nm y se aisló por centrifugación a 7 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue almacenado a -70°C. Los pellets celulares fueron resuspendidos en (250 µl) de solución TEP (25 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 1mM PMSF). La suspensión se sonó durante tres minutos con intervalos de 15 segundos con una amplitud de 60%. Las células rotas se eliminaron por centrifugación a 9 000 rpm durante 10 minutos, finalmente las membranas bacterianas y el citoplasma fueron separadas por una ultracentrifugación a 27 000 rpm durante cuatro horas. El sobrenadante de este último paso contiene la fracción citoplásmica en la cual se encuentran las proteínas solubles, mientras el pellet que se forma contiene la fracción de proteínas membranales.

1.2.1 Verificación del fraccionamiento celular

Una vez obtenidas las diferentes fracciones (proteínas totales, citoplásmicas y membranales), se determinó la concentración en las muestras y, posteriormente, se analizaron en geles de SDS-PAGE desnaturizantes al 12% y las proteínas se

visualizaron mediante tinción de azul de Coomassie. Finalmente las proteínas resueltas en el gel SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con el fin de fijarlas para las pruebas posteriores.

1.3 Determinación de la concentración de proteína

La concentración protéica de las proteínas fue determinada utilizando el método de Bradford. El método se basa en la formación de un complejo entre las proteínas y el colorante Azul Brillante G, lo que provoca un cambio en la absorbancia del colorante, de 465 a 595 nm. Se utilizó el protocolo para placas de 96 de pozos, ya que requiere poca cantidad de muestra (3-5 μ l). El reactivo de Bradford fue llevado a temperatura ambiente antes de ser utilizado, con previa agitación suave. Se prepararon estándares de proteína, utilizando la albúmina sérica bovina (500 μ g/ml). Se agregaron 5 μ l de cada uno de los estándares de proteína en cada pozo por separado. La muestra problema fue preparada con una concentración aproximada entre 0.1 y 1.4 mg/ml. Una vez preparadas las muestras, se agregaron 40 μ l del reactivo de Bradford a cada pozo con los estándares de proteína, muestra problema y blanco. Las mediciones se hicieron por duplicado. Una vez agregado el reactivo de Bradford, se colocó la placa en un agitador durante 30 segundos para mezclar el contenido de los pozos. Las muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos (el complejo colorante-proteína es estable hasta por 60 minutos). Transcurrido el tiempo de incubación se leyó la absorbancia de los pozos en un lector de microplaca a 592 nm. Se realizaron los cálculos correspondientes y se determinó la concentración protéica de la muestra.

1.4 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes

Se realizó la electroforesis para determinar el patrón electroforético de las proteínas, adicionalmente, mediante este análisis de electroforesis se logró estimar el peso molecular (PM) de las proteínas. El tamaño del poro de la matriz

de poliacrilamida que se utilizó dependió de las diferencias en tamaño de los componentes proteicos que se deseaban separar. La muestra que se analizó fue tratada previamente con un agente reductor, como el 2-mercaptoetanol y con Dodecil Sulfato de sodio (SDS) en presencia de calor.

El 2-mercaptoetanol reduce los posibles puentes disulfuro que las proteínas de la muestra y el SDS (detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas), eliminando sus estructuras secundaria y terciaria pero sin alterar los enlaces disulfuro y además confiere una carga negativa a cada proteína en proporción a su masa.

Durante la corrida electroforética las proteínas con mayor peso molecular migran más lento que las proteínas de menor peso. Cuando se comparó la movilidad electroforética de una proteína en particular con la movilidad electroforética de proteínas de PM conocido (marcadores de PM), se estimó el PM de la proteína en cuestión, un método empleado para estimar el PM de las proteínas es por medio de la movilidad electroforética relativa (R_f), la cual es inversamente proporcional al logaritmo del PM. Trazando un gráfico con estándares de PM conocido, se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido. El R_f se calcula dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de bromofenol (frente de corrida) o el largo del gel. Una vez que finalizó la corrida electroforética, las proteínas se visualizaron mediante la tinción con azul de Coomassie y se estimó el PM de las mismas. La técnica de SDS-PAGE posee un alto poder de resolución gracias a un sistema que utiliza dos amortiguadores y dos concentraciones de poliacrilamida diferentes en un solo montaje. Entre dos vidrios dispuestos de forma vertical con un espacio entre ambos de 0.5 mm a 1.5 mm, se preparó primeramente el gel separador, una vez que este polimerizó, se procedió a vaciar sobre él un segundo gel “gel espaciador”, con una concentración de poliacrilamida y amortiguador diferentes al gel separador. Este gel espaciador tiene dos propósitos: servir de soporte para cargar las muestras y concentrar a las proteínas

de la muestra en un solo punto, de forma tal que las proteínas entran al gel separador uniformemente y su movimiento dentro de él no se verá afectado por un retraso en la entrada al mismo. Cuando este gel polimerizó, se puso el sistema en contacto con el buffer de corrida. Una vez que las muestras se solubilizaron y cuantificaron se calentaron hasta ebullición por cinco minutos, se depositaron en los pozos correspondientes, se cerró el sistema eléctrico mediante la adición de más amortiguador y se aplicó voltaje. El azul de bromofenol presente en las muestras indicó el frente de migración, y por lo tanto el momento de detener la corrida. Una vez que se detuvo, el sistema se desensambló y el gel separador se recuperó para ser teñido con algún colorante que evidenciará las proteínas, como el azul de Coomassie o Sypro Ruby.

1.4.1 Preparación de geles

Se mezcló en dos tubos los reactivos necesarios para la preparación del gel separador y espaciador (Tabla 5), con excepción del persulfato de amonio y el TEMED, que se agregó en el momento antes de vaciar los geles. Se eliminó el aire de la mezcla mediante creación de vacío (el aire inhibe la reacción de polimerización) por 15 minutos y a temperatura ambiente. Se ensambló el molde para el gel utilizando vidrios de 1.0 mm. Se agregó a la mezcla correspondiente al gel separador, 50 μ l de persulfato de amonio. Con una pipeta para 10 ml, colocada en una de las esquinas superiores de los vidrios del molde para el gel, se añadió un total de 3.5 ml de esta mezcla. Inmediatamente se agregaron 200 μ l de isopropanol sobre el gel para evitar el contacto con el aire. Una vez que gelificó la mezcla correspondiente al gel separador, se descartó el isopropanol inclinando el molde ensamblado. Luego de esto se añadió al buffer espaciador 50 μ l de persulfato de amonio. Se vació la mezcla de la misma manera que el buffer separador. Se colocó inmediatamente el peine para 1.0 mm. Esta mezcla gelificó aproximadamente en 30 minutos. Una vez solidificado se procedió a quitar el peine deslizándolo suavemente y se lavó delicadamente con agua destilada para eliminar algunos residuos no gelificados.

Tabla 5. Cantidades de reactivos para preparar un gel de acrilamida al 12%.

	Gel Separador	Gel Espaciador
ddH ₂ O	3.2 ml	6.1 ml
Buffer	2.5 ml (pH 8.8)	1.5 ml (pH 6.8)
SDS 10%	100 µl	100 µl
Acrilamida (neurotóxica usar guantes)	4.2 ml	1.3 ml
TEMED	5 µl	10 µl
Persulfato de amonio*	50 µl *	50 µl*

1.4.2 Preparación de muestras para electroforesis en SDS-PAGE

Las proteínas de la fracción soluble y membranal fueron solubilizadas agregando buffer de muestra, se mezcló por agitación y se hirvió durante 10 minutos. Al cabo de este tiempo se detiene la reacción colocando el tubo en hielo. Finalmente, se cargaron las muestras en los pozos del gel (10 µl) con una micropipeta y puntas largas descartables para geles. Es fundamental realizar este paso sin que haya contaminaciones cruzadas entre los distintos pozos. Esto se evita depositando las muestras despacio pero de forma continua. También se debe incluir el marcador de PM en uno de los carriles laterales, como referencia. Se llenó la cámara con el amortiguador de corrida: 180 ml en el tanque inferior y 120 ml en el superior. El gel se colocó en la cámara y corrieron las muestras a 120 V (voltaje constante) hasta que el azul de bromofenol llegase casi al borde inferior del gel (aproximadamente 60 min). Los vidrios se separaron y se retiró el gel con cuidado. Se retiró el gel y se eliminó la parte del gel espaciador cortándolo con una espátula. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (10% de ácido acético, 40% de etanol y 0.05% de Coomassie azul brillante) durante 30 minutos, posteriormente, para decolorar los geles se destiñeron con una solución decolorante (30% de metanol, 10% de ácido acético en agua desionizada) con agitación constante durante 1 hora. Los resultados fueron interpretados fotografiando y analizando el gel.

1.5 Inmunodetección por Western Blot

Por medio de este experimento se corroboró el fraccionamiento de proteínas de membrana y citoplasma, empleando los anticuerpos requeridos para cada fracción celular.

Electrotransferencia. Para que las proteínas fueran accesibles a la detección por anticuerpos, fueron transferidas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa que se realizó por acción de un campo eléctrico (electrotransferencia). Este método utiliza corriente eléctrica y buffer de transferencia para llevar las proteínas desde el gel hacia la membrana. Para ello, se apiló en el orden descrito los siguientes elementos (del polo negativo o cátodo al positivo o ánodo): esponja, varios papeles de filtro empapados en buffer de transferencia, gel, membrana, se adicionaron más papeles de filtro empapados y finalmente otra esponja. Este montaje, llamado coloquialmente sandwich, se dispuso en el sistema de transferencia y se aplicó una corriente eléctrica de 100V durante una hora. De esta manera las proteínas del gel se desplazaron hacia el polo positivo y quedaron atrapadas por la membrana. Después de la transferencia, se procedió a la tinción del gel con Coomassie para comprobar que en efecto una parte importante del material proteico fue transferido a la membrana.

Bloqueo de las proteínas transferidas. Puesto que la membrana necesita unir proteínas de forma inespecífica, es preciso bloquear los lugares de unión que han quedado libres tras la transferencia. En caso contrario, el anticuerpo (de naturaleza protéica) empleado en la detección puede unirse a ellos, dificultando la distinción del complejo antígeno-antígeno que se forma con la proteína que se busca. En el bloqueo se incubó la membrana con leche en polvo libre de grasa al 5%, disuelta con un buffer de fosfatos con 0.1% de detergente (PBS-Tween 20) durante dos horas. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo primario durante una hora y después con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano durante una hora, se realizaron lavados con PBS-Tween en cada uno de los pasos de esta técnica. La presencia de las proteínas fue revelada mediante

quimioluminiscencia. El ensayo de quimioluminiscencia se realizó con el kit ECL (Amersham); las membranas se bañaron con esta solución durante tres minutos en un cuarto oscuro y con luz roja, se eliminó el exceso de solución y las membranas se cubrieron con un acetato, finalmente se colocaron encima placas autorradiográficas a diferentes tiempos de exposición y las placas se revelaron para observar los resultados.

1.6 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad

Las proteínas de unión a hemina se aislaron por cromatografía de afinidad para lo cual una vez obtenido el extracto de proteínas membranales se incubaron 200 µl de las proteínas de membrana con 200 µl de perlas de agarosa-hemina a una temperatura de 4°C durante toda la noche con agitación controlada. Posteriormente, se centrifugó la mezcla de proteínas y perlas a 4000 rpm durante dos minutos y se recuperó el sobrenadante que contiene las proteínas que no poseen afinidad por las perlas de agarosa hemina. El pellet obtenido fue lavado tres veces con el siguiente buffer (50mM de Tris-HCl, 200mM de NaCl y 5mM de EDTA) para lo cual se procedió a centrifugar durante 10 minutos a 4000 rpm y se colectaron los sobrenadantes de cada uno de los lavados. Después se adicionó al pellet un buffer de elución (Clorohidrato de Guanidina 6M) y se realizaron tres eluciones colectando los sobrenadantes que contienen las proteínas que se unieron a las perlas de agarosa hemo.

1.7 Tratamiento de proteínas membranales para electroforesis

Posteriormente se procedió a limpiar y concentrar las proteínas obtenidas en la purificación de proteínas que poseen afinidad al grupo hemo anteriormente descrita para lo cual se utilizó un kit (Clean-up) marca Bio-Rad, y se siguió el protocolo indicado, que consiste de los siguientes pasos: se tomó la muestra protéica resuspendida en (150 µl) con una concentración de (50 µg), posteriormente se le adicionó 300 µl del agente 1, se mezcló por un minuto y se

incubó en hielo durante 15 minutos , después se agregó 300 ml del agente 2 se mezcló durante un minuto, la mezcla fue centrifugada a 12000 rpm durante cinco minutos, se descartó el sobrenadante, sin remover el pellet, se centrifugó nuevamente de 15-30 segundos y se eliminó el sobrenadante cuidadosamente para no remover el pellet, se adicionaron 40 ml de solución de lavado wash, se mezcló y centrifugó 5 minutos y se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 25 ml de agua bidestilada, se colocó en vortex durante 20 segundos y se adicionó 1 ml de solución a -20°C y 5 ml de lavado 2, se mezcló y se incubó a -20°C , mezclando la solución en un vortex cada 10 minutos por 30 segundos, posteriormente se centrifugó a mas de 12000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación, se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos, finalmente se resuspendió el pellet con un buffer de rehidratación, se realiza la cuantificación de proteínas por el método colorimétrico de Bradford y se determinó la concentración de la muestra de proteínas, se adicionó buffer de muestra, se mezcló y calentó la muestra hasta ebullición y las proteínas se cargaron en el gel para su posterior análisis.

1.8 Tinción de las proteínas con Sypro Ruby

Se procedió a teñir el gel para lo cual se realizaron dos lavados de 30 minutos con solución fijadora (50% de metanol y 7% de ácido acético en agua), posteriormente se adicionó la solución para tinción Sypro Ruby overnight, al siguiente día se lavó con una solución que contiene (metanol 10% y ácido acético 7%) durante 30 minutos, posteriormente se realizó un lavado de 15 minutos con agua estéril y finalmente el gel se escaneó en el fotodocumentador para analizar los resultados.

2. Identificación de proteínas de unión al grupo hemo por espectrometría de masas

2.1 Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Las proteínas reveladas mediante la tinción con Sypro que unen el grupo hemo, fueron escindidas del gel cortando las bandas de interés y se identificaron mediante espectrometría de masas.

La identificación de proteínas se realizó automáticamente mediante el sistema GPS (Global Protein Server) acoplado a los datos del TOF-TOF, combinando ambos tipos de espectros (MS-MS/MS) obtenidos para cada muestra y usando como motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience, UK) sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas. El análisis de identificación de proteínas LC-MS/MS se llevo a cabo por la institución *Protein Chemistry Core Facility*, en la Universidad de Columbia, en la ciudad de Nueva York.

Los péptidos resultantes de la digestión de proteínas (generalmente separadas mediante 1 D PAGE) se depositaron muestra a muestra sobre una placa MALDI junto con una matriz (α -ciano-4-hidoxicinámico) usando la estación Automática de Dispensación de Proteínas sobre Placa de MALDI (Pro MS MALDI, Genomic Solutions). Las muestras depositadas, se analizaron mediante espectrometría de masas MALDITOF/ TOF, obteniéndose un espectro de masas (MS) denominado “Huella Peptídica”.

3. Análisis de la capacidad de competencia de la vitamina B12 con el grupo hemo por su unión a la Hb.

3.1 Pruebas de unión a Hb mediante el ensayo de Overlay

Las proteínas membranales que tienen la capacidad de unir el grupo hemo fueron resueltas en el gel SDS-PAGE al 12% y posteriormente fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con el objetivo de fijarlas para las pruebas posteriores.

La inmovilización de las proteínas consiste en la transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa a través de una corriente eléctrica. Del lado negativo de la cámara se colocó dentro de un cassette en el siguiente orden: una esponja, un papel Whatman, sobre éste el gel de proteínas y sobre el gel la membrana de nitrocelulosa; se eliminaron las burbujas de aire, se colocó otro papel Whatman y finalmente otra esponja, y se procedió a cerrar el casete. Este se humedeció con el buffer de transferencia (Tris-base 25mM, glicina 40 mM, SDS 0.05% y metanol al 20%) y se corrió la transferencia a 400 mA durante toda la noche.

3.1.1 Ensayo de Overlay

La capacidad de competencia de la vitamina B12 con la hemoglobina por el sitio de unión a proteínas que unen hemoglobina se determinó mediante el ensayo de overlay. Las proteínas fueron resueltas en el gel SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, la cual se bloqueó con 5% de leche descremada-PBS-Tween por 2 horas, después se incubó con vitamina B12 durante toda la noche y al siguiente día se adicionó hemoglobina humana durante una hora, posteriormente se incubó con un anticuerpo primario anti-hemoglobina durante una hora y después se incubó con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa durante una hora, se realizaron lavados con PBS-Tween en cada uno de los pasos de esta técnica. El ensayo se reveló mediante quimioluminiscencia.

El ensayo de quimioluminiscencia se realizó con el kit ECL (Amersham), las membranas se bañaron con esta solución durante tres minutos en un cuarto oscuro y con luz roja, se eliminó el exceso de solución y las membranas se cubrieron con un acetato, finalmente se colocaron encima placas autorradiográficas a diferentes tiempos de exposición y las placas se revelaron para observar los resultados.

3.2 Curva de crecimiento de *S. pneumoniae* en medio restringido de hierro suplementado con Hb y vitamina B12

La bacteria *S. pneumoniae* se obtuvo de un congelado en glicerol estéril al 50% del cual se tomó una muestra y se sembró en base agar suplementado con sangre de carnero al 5%, las cajas fueron incubadas con una atmósfera del 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se observó el crecimiento del cual se tomaron muestras para realizar nuevas resiembras en medio líquido Todd Hewitt, suplementado con extracto de levadura al 5% y fueron incubadas bajo condiciones antes descritas. Posteriormente se adicionó al medio de cultivo, 2-2 dipirilo (agente quelante específico para hierro) para lo cual fueron empleadas diferentes concentraciones para realizar la determinación de la concentración óptima con la cual es secuestrado todo el hierro del medio. Se procedió a inocular el microorganismo bajo las condiciones mencionadas, para restringir el crecimiento de *S. pneumoniae*, por limitación de hierro y se monitoreó el crecimiento del microorganismo, durante siete horas, realizando lecturas cada hora a una longitud de onda (λ) de 600 nm.

3.2.1 Análisis de viabilidad celular de *S. pneumoniae* crecido en medio restringido de hierro y suplementado con Hb y vitamina B12

La viabilidad celular de *S. pneumoniae* crecido en diferentes medios con Hb y vitamina B12 a diferentes concentraciones fue determinada mediante la técnica de exclusión de azul de tripano.

Este es un colorante que permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas). La tinción se utilizó para determinar el número de células viables en cada uno de los medios utilizados. Para ello se tomó una muestra de 10 µl del cultivo y se adicionaron 10 µl de azul de tripano 0.4%.

La mezcla se colocó sobre la laminilla y se introdujo al contador de células (TC10 marca Bio-Rad). Se contó el número de células por ml y se calculó el porcentaje de viabilidad celular para cada condición del medio. El resultado obtenido corresponde al número de células viables.

A los datos obtenidos se les calculó la media y la desviación estándar con el programa Excel y se realizaron las gráficas en las que fue representado el crecimiento de las bacterias bajo las distintas condiciones.

V. RESULTADOS

1. Obtención de proteínas membranales de *S. pneumoniae* que unen el grupo hemo

1.1 Crecimiento de *S. pneumoniae* en diferentes fuentes de hierro

Para evaluar la capacidad de *S. pneumoniae* de utilizar la hemoglobina como fuente de hierro, se realizaron curvas de crecimiento. El microorganismo se cultivó en medio Todd- Hewitt, enriquecido con extracto de levadura al 0.5% a 37° C con una atmósfera del 5% de CO₂. Posteriormente se adicionó 2-2 dipirilo al medio y se dejó incubar bajo las mismas condiciones. De cada cultivo se monitoreo el crecimiento, midiendo la densidad óptica cada hora, por un periodo de tiempo de siete horas, los datos obtenidos fueron analizados y graficados.

Posteriormente se emplearon diferentes fuentes de hierro para poder restablecer el crecimiento de *S. pneumoniae*, ya que este fue cultivado en medio Todd Hewitt con la adición de dipirilo y se observó que no hay crecimiento del microorganismo.

Los resultados del experimento, muestran que *S. pneumoniae* utiliza eficientemente la hemoglobina, como fuente de hierro, como se había reportado en estudios anteriores; también puede emplear otras fuentes de hierro como la hemina y el FeCl₃; sin embargo, el crecimiento del microorganismo se observa disminuido con la transferrina, con un comportamiento similar al observado con el agente quelante (dipirilo), lo cual demuestra que *S. pneumoniae* no puede utilizar el hierro de la transferrina (Fig. 12).

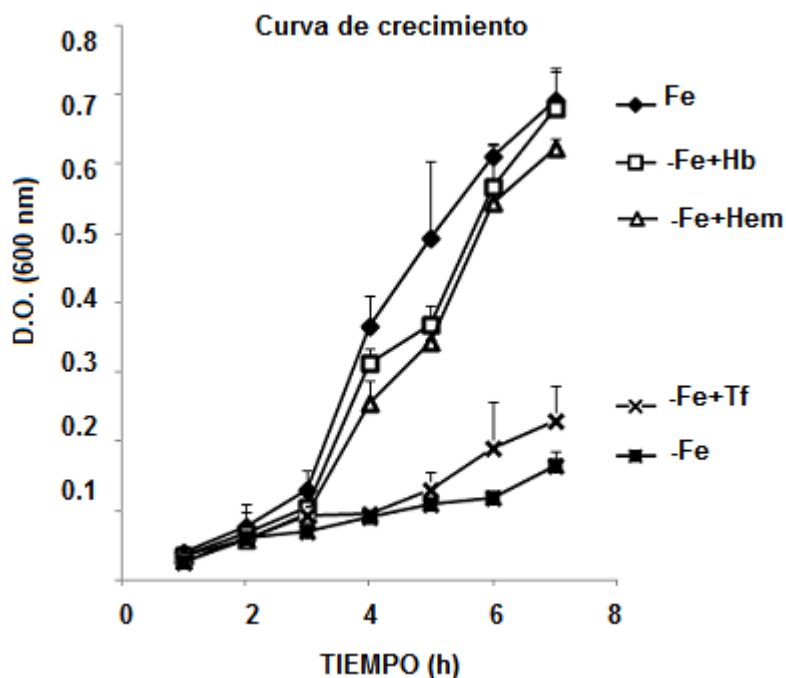


Fig. 12. Curva de crecimiento de *S. pneumoniae* empleando diferentes fuentes de hierro.

Crecimiento de *S. pneumoniae* en caldo TH. Símbolos: ◆ sin adición de dipirilo, ◻ adición de dipirilo más hemoglobina (2 μ M), ◻ adición de dipirilo más hemina (8 μ M), × adición de dipirilo más transferrina (4 μ M), ■ adición de dipirilo (700 μ M). El crecimiento celular se midió cada hora $A_{600 \text{ nm}}$. El experimento se realizó por triplicado y las barras verticales muestran la desviación estándar para cada uno de los puntos monitoreados.

Después de realizar las curvas de crecimiento, se hizo un ensayo de viabilidad celular para observar si tanto el crecimiento celular y la viabilidad del microorganismo disminuían al limitar el hierro en el medio basal Todd Hewitt, mediante el empleo del agente quelante dipirilo y empleando las mismas fuentes alternas de hierro (Fig. 13).

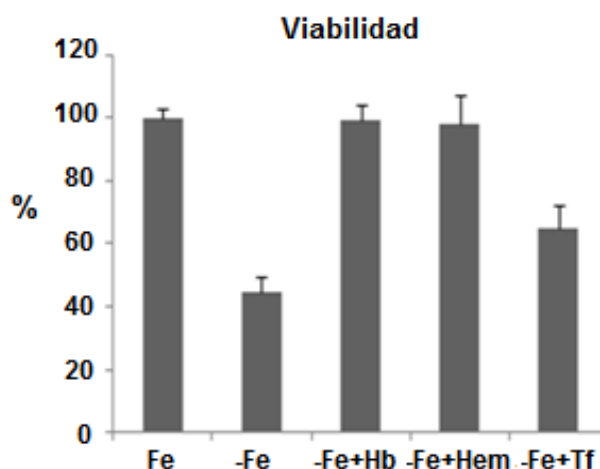


Fig. 13. Porcentaje de viabilidad celular determinada con el contador de células automatizado TC-10 Bio-Rad. Condiciones de medio: Fe, medio Todd Hewitt sin adición de dipirilo, -Fe, adición de dipirilo (700 μ M), -Fe+Hb, adición de dipirilo más Hb (2 μ M), -Fe+ Hem, adición de dipirilo más hemina (8 μ M), -Fe+Tf (4 μ M), adición de dipirilo más transferrina. El experimento se realizó por triplicado y las barras verticales muestran la desviación estándar para cada uno de los puntos monitoreados.

1.2 Fraccionamiento de proteínas membranales en *S. pneumoniae* empleando Hb como fuente de hierro

Una vez obtenidas las fracciones subcelulares, se procedió a realizar el análisis de la integridad de las mismas mediante SDS-PAGE. En el siguiente experimento (Fig.14A) se observan las muestras de proteína de las diferentes fracciones celulares.

1.2.1 Verificación del fraccionamiento de proteínas

Para la verificación del fraccionamiento celular se realizó el ensayo de Western Blot (Fig.14 B). En este experimento se empleó el anticuerpo primario para pneumolisina, una proteína abundante en citoplasma de peso molecular de aproximado de 53 kDa. Esta proteína se detectó en los extractos totales (línea 1) y en la fracción citoplásmica (línea 2). Tal y como se esperaba, nos se evidenció señal para la pneumolisina en las proteínas membranales (línea 3), con lo que se

verificó el correcto proceso de fraccionamiento subcelular de proteínas de este microorganismo.

De igual manera se realizó el ensayo de Western Blot (Fig.14C) empleando el anticuerpo primario para PspA, que es una proteína de membrana y a través del mismo detectó una banda de un peso molecular aproximado de 65 kDa, sólo en los extractos totales (línea 1) que no se observó en la fracción citoplásmica (línea 2), y sí se observó en la línea 3 donde se encuentran las proteínas membranales, con lo que se corroboró la integridad y no contaminación de la fracción protéica insoluble.

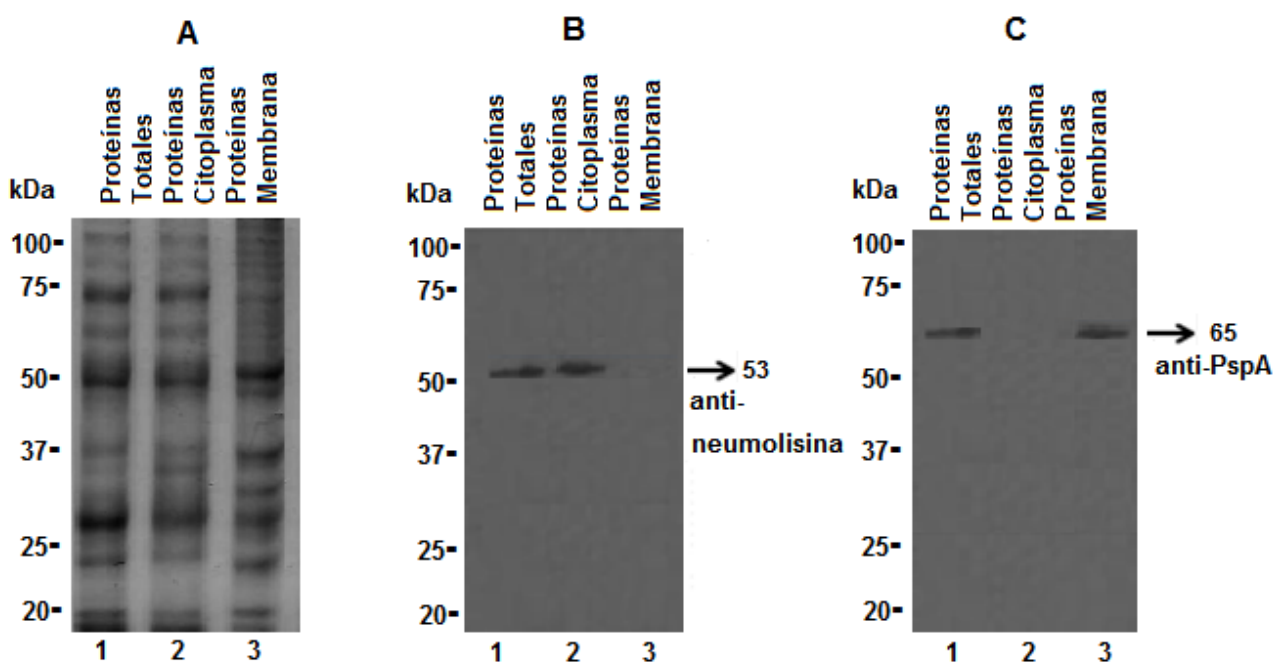


Fig. 14. Fraccionamiento celular de *S. pneumoniae*. Panel A: Fracciones subcelulares analizadas mediante un gel 12% SDS-PAGE tinción en Coomassie. Panel B: Inmunodetección por Western blot de la proteína citoplásmica neumolisina (53 kDa). Panel C: Inmunodetección por Western blot de la proteína membranal PspA (65 kDa). La posición del marcador de peso molecular es indicado en kDa.

1.3 Purificación de proteínas que unen el grupo hemo a partir de la Hb

Una vez obtenido el extracto total de proteínas membranales se purificaron las proteínas de unión a hemo, estas se aislaron por un método cromatográfico de afinidad empleando una resina de perlas de agarosa-hemina. Los resultados se muestran en la figura 15. En la línea 1 se muestran las proteínas contenidas en el extracto total de proteínas membranales, en la línea 2 se muestran las proteínas que no poseen afinidad por las perlas de agarosa-hemina; debido a que son las proteínas que no interaccionaron con las perlas de agarosa-hemina, de la línea 3 a la línea 5, se muestran los lavados realizados para eliminarlas proteínas inespecíficas y se observa que en el tercer lavado que se realizó en la línea 5 ya se ha eliminado todo lo inespecífico. En la línea 6 se muestra la elución realizada con clorohidrato de guanidina 6M, para la obtención de las proteínas de interés que son aquéllas que poseen afinidad por el grupo hemo. En la primera elución línea 6 se observan 9 bandas con masas moleculares aproximadas de 102, 80, 71, 67, 50, 45, 43, 37 y 22 kDa.

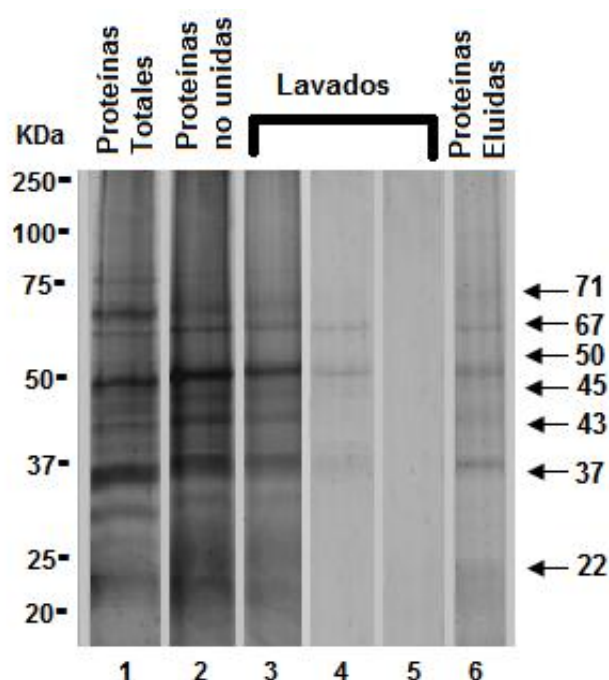


Fig. 15. Purificación de proteínas de membrana de *S. pneumoniae* que unen hemina. El experimento se realizó mediante un método cromatográfico de afinidad empleando una resina de perlas de agarosa-hemina resueltas en un gel al 12% SDS-PAGE en tinción con Sypro. Líneas 1: proteínas contenidas en el extracto total de proteínas membranales; 2, proteínas que no se unen a las perlas de agarosa-hemina; 3, 4 y 5, lavados realizados para eliminar las proteínas inespecíficas (proteínas que no unen el grupo hemo); 6, proteínas eluidas con clorohidrato de guanidina 6M.

2. Identificación de proteínas de unión al grupo hemo por espectrometría de masas

En la tabla 6, se muestran las proteínas de membrana que poseen capacidad de unir hemo. De las nueve proteínas purificadas mediante la columna de hemina, se mandaron a identificar siete de las más representativas.

Tabla 6. Proteínas membranales que unen el grupo hemo en *S. pneumoniae* identificadas por espectrometría de masas.

Peso molecular (kDa)	No. de acceso en NCBI	Proteína identificada	Longitud de aminoácidos	Función	% Cobertura	Mascot score
22	gij15901633	Proteína general de estrés 24	202	No descrita.	63	665
37	gij15900732	Lipoproteína	350	No descrita.	34	350
43	gij15901337	Factor de elongación Tu	398	Pertenece a la familia de factor de elongación de unión a GTP.	48	807
45	gij353807173	Proteína de unión maltosa/maltodextrina	418	Transportador transmembranal de maltosa.	40	839
50	gij116516325	Glutamina sintetasa, tipo I	448	Cataliza la unión de serina a RNAt.	36	338
67	gij116516239	Producto de gen glpO	608	No descrita.	50	1279
71	gij15902056	Proteína de división celular FtsH	652	Metalopeptidasa dependiente de ATP.	24	191

Mediante el análisis de espectrometría de masas se logró la identificación de siete proteínas de membrana de *Streptococcus pneumoniae*: *proteína general de estrés 24*, *lipoproteína*, *factor de elongación Tu*, *proteína de unión maltosa/maltodextrina*, *glutamina sintetasa tipo I*, *producto de gen glpO* y la *proteína de división celular FtsH*, que fueron previamente purificadas mediante la cromatografía de afinidad con la capacidad de unir hemo.

La proteína de 22 kDa se identificó como una *proteína general de estrés 24*, de la cual no se había descrito una función, sin embargo, en el presente estudio se demostró que esta proteína tiene la capacidad de unir hemo y Hb y además esta proteína se logró inhibir con la vitamina B12 por lo que se especula que ésta funciona como un probable receptor para la captación de hemo.

La proteína de 37 kDa se identificó como una *lipoproteína*, hasta el momento se desconoce la función de la misma, pero en este estudio se logró demostrar que esta proteína al igual que la *proteína general de estrés 24* de 22 kDa, presentan la capacidad de unir hemo y Hb y esta *lipoproteína* también se inhibió con la vitamina B12 por lo que se propone como receptor de hemo. Además al comparar las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas *proteína general de estrés 24* y

lipoproteína, con otros receptores de hemo, se encontró el motivo relacionado con la unión a hemo.

La proteína de 43 kDa se identificó como un *factor de elongación Tu*, se describe que esta proteína pertenece a la familia de factor de elongación de unión a GTP.

La proteína de 45 kDa se identificó como *proteína de unión maltosa/maltodextrina*, se describe que esta proteína es un transportador transmembranal de maltosa y la proteína de 50 kDa que se identificó como una *Glutamina sintetasa tipo I*, con la función de catalizar la unión de serina a RNAt, estas dos proteínas al igual que la *proteína general de estrés 24* y *lipoproteína*, presentan la capacidad de unir hemo y Hb.

La proteína de 67 kDa se identificó como un *producto de gen glpO* y su función aún no es conocida.

La proteína de 71 kDa se identificó como una *proteína de división celular FtsH* y funciona como una metalopeptidasa dependiente de ATP.

En base a las técnicas empleadas y a los experimentos llevados a cabo en este estudio, al menos seis de estas proteínas poseen la capacidad de unir el grupo hemo y se relacionan con el mecanismo de adquisición de hierro.

3. Análisis de la capacidad de competencia de la vitamina B12 con el grupo hemo por su unión a la Hb.

3.1 Purificación de proteínas que unen el grupo hemo con diferentes eluyentes

En el siguiente experimento de purificación se muestran las eluciones del extracto total de proteínas que tienen afinidad por el grupo hemo o por el hierro de alguna de las distintas fuentes empleadas, para lo cual se realizó el proceso de purificación con las perlas de agarosa-hemina en las condiciones descritas en la metodología, pero con la utilización de diferentes eluyentes (Fig.16). En el panel A se observa en la línea 1 se muestra la elución realizada con Clorohidrato de Guadinina (6M), en la línea 2 se muestra la elución con hemina, en la línea 3 se muestra la elución con la fuente de hierro FeCl_3 . En el panel B se cargaron los distintos eluyentes empleados para demostrar que las bandas eluidas en el panel A no estén presentes como proteínas contenidas en los eluyentes.

Anteriormente se había demostrado que el Clorohidrato de guanidina es un buen eluyente, ya que presenta las características adecuadas para lograr desprender las proteínas que poseen afinidad por el grupo hemo y no queden retenidas en las perlas, en este experimento se demostró que también se pueden emplear como eluyentes otras fuentes que contienen el grupo hemo o hierro.

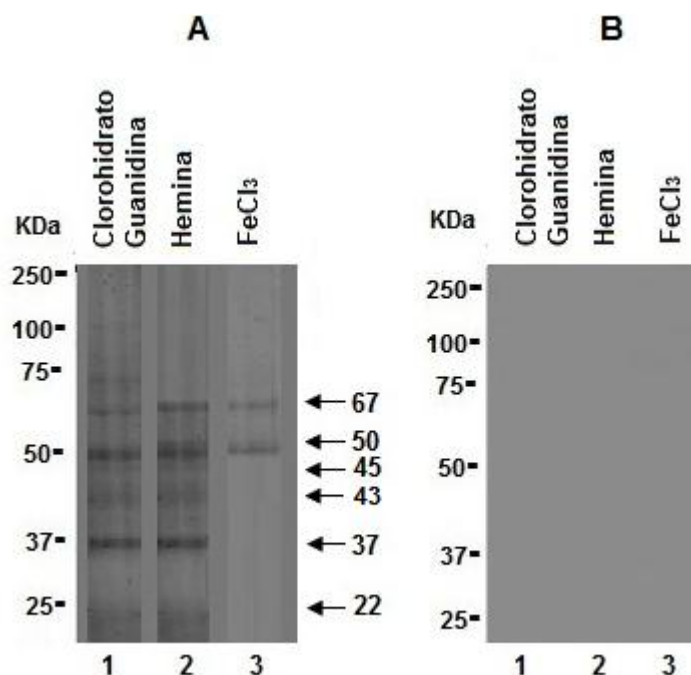


Fig. 16. Purificación de proteínas membranales que unen hemina empleando diferentes eluyentes analizados mediante 12% SDS-PAGE teñido con Sypro. Panel A: líneas 1 Elución con Clorohidrato de Guanidina (6 M); 2, hemina (0.15 μ M); 3, FeCl_3 (0.15 μ M). Panel B: se cargaron los distintos eluyentes empleados en este experimento.

3.2 Capacidad de competencia de la vitamina B12 con la Hb

Para demostrar la capacidad de competencia de la vitamina B12 con la hemoglobina por el sitio de unión a proteínas que unen hemo se realizó el ensayo de overlay.

Las proteínas resueltas en el gel SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue incubada con vitamina B12 (1000 μ g) durante toda la noche y al siguiente día se adicionó Hb (50 μ g). Posteriormente se adicionaron los anticuerpos primario (α -globina conejo) y secundario (α conejo HR), y el ensayo se reveló mediante quimioluminiscencia. En la figura 17 se presentan los resultados obtenidos; en el panel A se observa la elución de las proteínas que unen el grupo hemo resueltas mediante un SDS-PAGE al 12% teñido con Sypro Ruby; en el panel B se observa la membrana que se incubó con Hb, y en el panel C se

muestra la membrana incubada con vitamina B12, y posteriormente con Hb bajo las mismas condiciones. Este experimento confirmó que las proteínas eluidas anteriormente mostradas mediante SDS-PAGE son las que tienen afinidad por el grupo hemo con pesos aproximados: 22, 37, 45 y 50 kDa e identificadas mediante la espectrometría de masas como: *proteína general de estrés 24*, *lipoproteína*, *Glutamina sintetasa tipo I* y *proteína de unión maltosa/maltodextrina*, también presentan la capacidad de unir Hb. Además también se demostró que la vitamina B12 tiene la capacidad de competir con el hemo presente en la Hb por los sitios receptores que unen Hb en *S. pneumoniae*, como se observa en la figura 17 C. Las proteínas identificadas como *proteína general de estrés 24* y *lipoproteína* con pesos moleculares de 22 y 37 kDa respectivamente, se inhiben por la capacidad de competencia de la vitamina B12, por lo que se propone que estas proteínas de membrana funcionen como receptores de hemo.

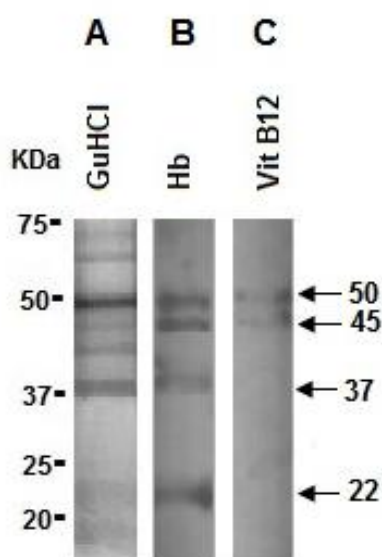


Fig. 17. Ensayo de Overlay y Coomassie para demostrar la competencia de la vitamina B12 con el hemo de la Hb. Panel A, muestra la elución de proteínas membranales que unen el grupo hemo analizado mediante SDS-PAGE al 12% teñido con Sypro Ruby. En el Panel B, se observa la elución de las proteínas que unen el grupo hemo a partir de Hb y en el panel C, se muestra la elución de las proteínas que se inhiben o bloquean al emplear un exceso de vitamina B12 para competir con el hemo de Hb.

3.3 Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos

El ensayo de Overlay interesantemente evidenció la inhibición de dos proteínas: *proteína general de estrés 24* y *lipoproteína* con pesos moleculares de 22 y 37 kDa, por lo cual se realizó un alineamiento múltiple, comparando las secuencias de aminoácidos de la región amino terminal de estas proteínas identificadas de *S. pneumoniae* y algunos receptores descritos para unir el grupo hemo: un receptor (Shr) de *S. pyogenes* y un receptor de *H. influenzae*, con el objeto de encontrar la presencia de los motivos que participan en la unión a hemo, en las secuencias de aminoácidos de las proteínas identificadas en este estudio, *proteína general de estrés 24* y *lipoproteína*, y se especula participan como receptores para unir hemo. El análisis que se llevó a cabo mostró el motivo **KVAFDH** esencial que actúa como un sitio de unión al grupo hemo. Se observó que el ácido aspártico (D) es el más conservado, seguido de los residuos de valina (V) e histidina (H). La conservación de este motivo pudiera ser crucial para la capacidad de unir hemo.

<i>S. pneumoniae</i> -37	-	V	D	P	S	I	K	V	Q	V	D	Y	A	G	S	F	G
<i>S. pneumoniae</i> -22	E	V	G	-	K	T	Q	V	A	V	D	L	N	V	I	V	E
<i>S. pyogenes</i> -Shr	-	A	E	K	L	K	Q	L	V	R	D	H	Q	T	S	I	E
<i>H. influenzae</i> -e_P4	-	-	-	-	-	-	K	V	A	F	D	H	-	-	-	-	-

Fig. 18. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de proteínas de *S. pneumoniae*. Se comparó la secuencia de las proteínas: *proteína general de estrés 24* y *lipoproteína* de 22 y 37 kDa de *S. pneumoniae*, el receptor Shr de *S. pyogenes* y el receptor e_P4 de *H. influenzae* relacionados con la unión al grupo hemo.

3.4 Disminución de viabilidad celular empleando vitamina B12 en *S. pneumoniae*

Para la determinación de la viabilidad celular de *S. pneumoniae* se realizaron curvas de crecimiento con diferentes medios y mediante la técnica de exclusión de azul de tripano se evaluó la viabilidad celular (no teñidas: viables y teñidas: no

viables). Para analizar si la vitamina B12 puede disminuir la viabilidad de *S. pneumoniae* se realizó un experimento en el cual se crecieron las bacterias en medio basal Todd-Hewitt, en medio Todd-Hewitt con la adición de dipirilo para restringir el medio de hierro así como también en medio depletado de hierro suplementado con Hb y vitamina B12 a distintas concentraciones. Se tomaron muestras de 10 µl de los cultivos celulares y se mezclaron con 10 µl de azul de tripano al 0.4%, posteriormente se colocó sobre la placa para llevar a cabo el conteo por duplicado en el contador de células. Se realizó el cálculo correspondiente para determinar el porcentaje de viabilidad celular en cada una de las condiciones de los distintos medios y se graficaron los resultados obtenidos (Fig.19).

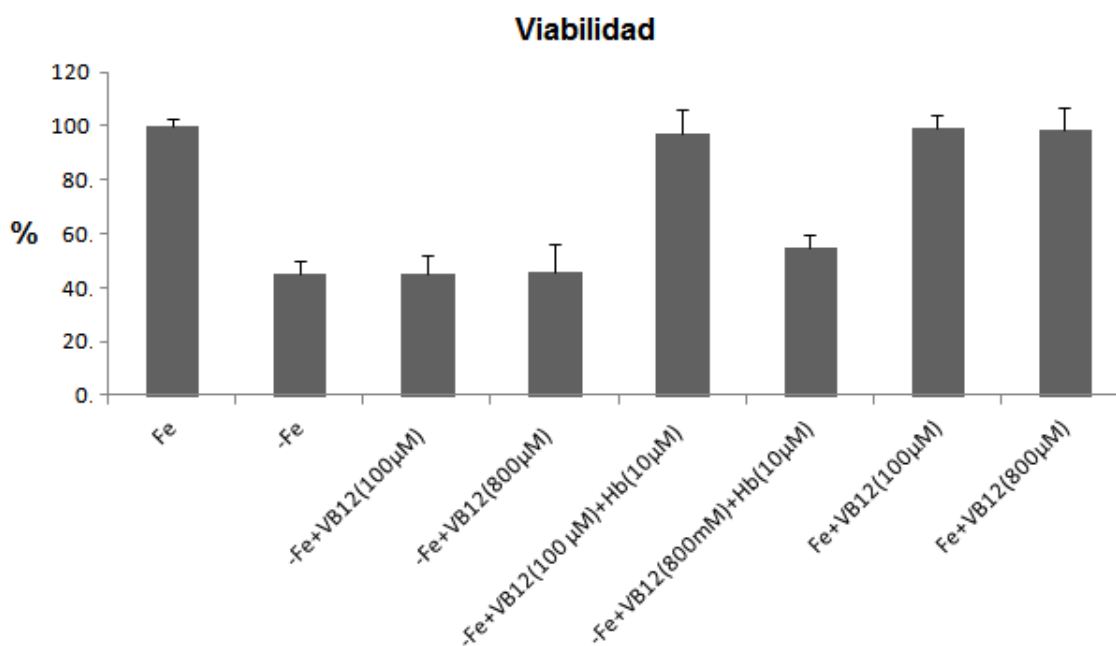


Fig.19. Porcentaje de viabilidad celular de *S. pneumoniae* empleando vitamina B12 y Hb.

Se observó que la viabilidad celular disminuye cuando el medio está depletado de hierro (dipirilo), así como en los medios que se encontraban igualmente con restricción de hierro pero con la adición de diferentes concentraciones de vitamina B12; mientras que en los medios restringidos de hierro pero con la adición de Hb y vitamina B12 se observó un porcentaje de viabilidad similar al del medio basal

Todd-Hewitt, esto debido a la adición de una fuente alterna de hierro que es la Hb y que se demostró en experimentos anteriores puede restablecer el crecimiento de *S. pneumoniae*. Sin embargo al realizar este ensayo con diferentes concentraciones de vitamina B12 se pudo observar que a una mayor concentración de vitamina B12 (100 μ M) se disminuye la viabilidad celular comparada con la adición de una concentración menor de vitamina B12 (10 μ M); y por último en el medio Todd-Hewitt con la adición de vitamina B12 a diferentes concentraciones no se observaron modificaciones significativas en la viabilidad. Por lo que este ensayo permitió demostrar que la vitamina B12 a mayor concentración (800 μ M) posee una capacidad de competencia con el hemo de la Hb.

VI. DISCUSIÓN

Los mecanismos moleculares implicados en la adquisición de hierro están mejor estudiados y han sido descritos para muchos microorganismos Gram negativos, sin embargo para los Gram positivos aún no se han dilucidado. En la bacteria Gram positiva *S. pneumoniae*, estos han sido poco estudiados, por lo que en el presente trabajo nos dimos a la tarea de purificar e identificar proteínas de membrana con la capacidad de unión a hemina y Hb como principal fuente de hierro.

S. pneumoniae utiliza eficientemente la hemoglobina, como fuente de hierro, como se había reportado en estudios anteriores (Tai *et al*, 1993), también emplea otras fuentes de hierro como la hemina libre, sin embargo, el crecimiento del microorganismo se ve disminuido con la transferrina, con un comportamiento similar al observado con el agente quelante (dipirilo), lo cual demuestra que *S. pneumoniae* no utiliza el hierro de la transferrina. En el ensayo de viabilidad celular se evidenció que la limitación de hierro, además de disminuir el crecimiento, también es un elemento esencial que disminuye la viabilidad del microorganismo.

La purificación de proteínas membranales mediante la cromatografía de afinidad al grupo hemo mostró nueve bandas con pesos moleculares aproximados de 22, 37, 43, 45, 50, 67, 71, 80 y 115 kDa. De éstas se seleccionaron las bandas más abundantes y representativas e identificaron siete de estas proteínas: *proteína general de estrés 24*, *lipoproteína*, *factor de elongación Tu*, *proteína de unión maltosa/maltodextrina*, *glutamina sintetasa tipo I*, *producto de gen glpO* y *la proteína de división celular FtsH*, con pesos moleculares de 22, 37, 43, 45, 50, 67 y 71 kDa respectivamente. En un estudio realizado por Tai *et al*. (1997) en el cual trabajó con proteínas totales, se encontraron bandas con tamaños que oscilaban entre 12, 13, 32, 35, 43, 60, 67 y 76 kDa siendo la banda de 43kDa la más abundante. Bajo las condiciones ensayadas en el presente trabajo se logró

purificar la banda de 43 kDa, pero la cantidad de proteína fue menor que la obtenida por Tai *et al.* (1997) y sugerimos que esto se debió a que sólo utilizamos la fracción de proteínas de membrana, en la cual la proteína de 43 kDa se encuentra menos representada, aunado también al hecho de que esta proteína, puede localizarse en membrana y citoplasma además de que Tai *et al.* (2007) utilizó un lisado celular de proteínas totales enriquecido por la cromatografía de afinidad.

La caracterización de los competidores como el grupo hemo, así como los experimentos de fraccionamiento y purificación de proteínas membranales reveló que la proteína de 43 kDa, está relacionada con la unión a hemo como supone Tai *et al.* (2007), porque ésta proteína se compitió con hemo. El factor de elongación es una proteína que generalmente se encuentra unida a los ribosomas y participa en el proceso de síntesis de proteínas, esta proteína se expresa en abundancia.

Por lo que analizando los resultados de las siete proteínas que identificamos *proteína general de estrés 24, lipoproteína, factor de elongación Tu, proteína de unión maltosa/maltodextrina, glutamina sintetasa tipo I, producto de gen glpO y la proteína de división celular FtsH*, con pesos moleculares de 22, 37, 43, 45, 50, 67 y 71 kDa respectivamente, seis de estas poseen la capacidad de unir hemo, debido a lo observado en la elución de proteínas cuando se empleo hemina como competidor para la purificación, *la proteína de división celular FtsH*, de 71 kDa presente la capacidad de unir hemo y pudiéndose unir a la columna de manera inespecífica.

Nuestra estrategia permitió identificar dos proteínas de *proteína general de estrés 24 y lipoproteína* de pesos de 22 y 37 kDa, relacionadas con la unión al grupo hemo y Hb. Estas proteínas obtenidas mediante la cromatografía de afinidad acoplada a hemo, se eluyeron con el ligando (hemo), pero no con el hierro y mediante el empleo de los ensayos de overlay se mostró que ambas proteínas tienen la capacidad de unir al grupo hemo presente en la Hb. Se evidenció que la

vitamina B12, con estructura similar a la del grupo hemo, tiene la capacidad de competir con el hemo de la Hb por los sitios receptores que unen Hb en *S. pneumoniae*. Las proteínas *proteína general de estrés 24* y *lipoproteína* de 22 y 37 kDa son las que se pudieron inhibir por la probable capacidad de competencia de la vitamina B12, por lo que se propone que estas proteínas de membrana funcionen como receptores de hemina y Hb.

Finalmente al realizar el alineamiento múltiple y comparar las secuencias de aminoácidos de estas proteínas de *proteína general de estrés 24* y *lipoproteína* de 22 y 37 kDa de *S. pneumoniae* y los receptores con capacidad de unir hemo, descritos para *S. pyogenes* y *H. influenzae*, se observó que están presentes los motivos propuestos para la unión al grupo hemo.

VII. CONCLUSIONES

Streptococcus pneumoniae, posee mecanismos para obtener hierro a partir de Hb y hemina, pero no de otras fuentes disponibles en el humano como transferrina.

Se purificaron e identificaron mediante espectrometría de masas al menos seis proteínas localizadas en la membrana *proteína general de estrés 24*, *lipoproteína*, *factor de elongación Tu*, *proteína de unión maltosa/maltodextrina*, *glutamina sintetasa tipo I* y *producto de gen glpO* con pesos moleculares aproximados de 22, 37, 43, 45, 50 y 67 kDa que tienen la capacidad de unir el grupo hemo.

De las siete proteínas identificadas, se corroboró que cuatro proteínas: *proteína general de estrés 24*, *lipoproteína*, *proteína de unión maltosa/maltodextrina* y *glutamina sintetasa tipo I*, con pesos moleculares de 22, 37, 45 y 50 kDa tienen la capacidad de unir hemo y Hb.

La vitamina B12 es una molécula que presenta estructura similar al grupo hemo, y posiblemente tiene la capacidad de competir con los sitios de unión al grupo hemo presentes en la Hb.

Los motivos implicados para unir hemo se encontraron al comparar las secuencias de aminoácidos de las proteínas *proteína general de estrés 24* y *lipoproteína*, con los receptores para unir hemo de *S. pyogenes* y *H. influenzae*.

Se sugiere que las proteínas *general de estrés 24* y *lipoproteína* de 22 y 37 kDa pueden ser receptores para la captación de hemo y vitamina B12.

PERSPECTIVAS

- Dilucidar la participación de las proteínas identificadas en el mecanismo de adquisición de hierro en *S. pneumoniae* empleando como fuente la Hb humana.
- Determinar la expresión de las proteínas que unen hemo y Hb empleando distintas fuentes de hierro.
- Caracterizar el sitio de unión a Hb de las proteínas que funcionan como receptores y probar la capacidad de unir hemo y Hb.
- Determinar si existe una capacidad de la vitamina B12 de inhibir el mecanismo de captación del grupo hemo en otros microorganismos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews S. C, Robinsón A. K; Rodríguez-Quiñonez F. 2003. Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiol. Rev. 27:215-237.
- Baker H, Anderson B. y Baker N. 2003. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. Proc Natl Acad Sci. 100:3579-3583.
- Krieg N, Wolfgang L, Whitman W, Hedlund B, Paster B, Staley J, Ward N, Brown D. 2010. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Springer. 2nd ed. USA. 931p.
- Black S, Eskola J, Whitney C, Shinefield H. 2008. Pneumococcal conjugate vaccine and pneumococcal common protein vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit P, eds. Vaccines, 5th ed. Philadelphia, PA, WB Saunders Company, 531–567.
- Bogaert D, Groot R, Hermans PM. 2004. Streptococcus pneumoniae colonization: the key to pneumococcal disease. Lancet Infect Dis. 4:144-54.
- Braun, V. 1995. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. FEMS Microbiol. Rev. 16: 295-307.
- Brown J., Gilliland S; Ruiz-Albert J; y Holden D. 2002. Characterization of Pit, a *Streptococcus pneumoniae* Iron Uptake ABC Transporter. Infect Immun. 70(8): 4389-4398.

- Butler JC. Epidemiology of pneumococcal disease. En: Tuomanen E.I., Mitchell T.J., Morrison D.A., Spratt B.G. 2004. The Pneumococcus. Washington: ASM press. 148-68.
- Crosa, J. y Walsh C. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 66:223-49.
- Cutts FT, Zaman S, Enwere G, Jaffar S, Levine O, Okoko J, Oluwalana C, Vaughan A, Obaro S, Leach A, McAdam K, Biney E, Saaka M, Onwuchekwa U, Yallop F, Pierce N, Greenwood B, Adegbola R. 2005 Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Infect Dis. 365:1139–1146.
- De la Rosa, M. y Prieto J. 2003. Microbiología para ciencias de la salud. Conceptos y aplicaciones. 2^{da} edición. Elsevier España. p. 78.
- Echániz AG, Velázquez MM, Carnalla BMN, Soto NA, Solórzano SF, Pérez MA. 1997. Antimicrobial susceptibilities and capsular types of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolated in children in Mexico City. Microb Drug Resist. 3:153-157.
- Faraldo-Gómez, J., and M. Sansom. 2003. Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. Nat Rev Mol Cell Biol 4:105-116.
- Ferguson A. D, Deisenhofer J. 2002. Ton B-dependent receptors structural perspectives. Biochim Biophys Acta. 1565:318-32.

- Forrellat M, Fernández N y Hernández P. 2005. Nuevos conocimientos sobre el metabolismo del hierro. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter . 21(3).
- Forrellat M, Hernández I. y Défaix G. 1999. Vitamina B₁₂: Metabolismo y Aspectos clínicos de su deficiencia. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 15(3):159-74.
- Forrelat M, Gauttier du Défaix y Fernández D. 2000. Metabolismo del hierro. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 16: 149-60.
- Genco, C. y Dixon, D. 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. Mol. Microbiol. 39:1-11.
- Gray, B. M, Converse J, and Dillon H. 1979. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease. J. Infect. Dis. 140:979–983.
- Guerinot, M. L. 1994. Microbial iron transport. Annu. Rev. Microbiol. 48: 743-772.
- Hansberg, W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquímico>.
- Horton R, Moran L, Ochs R; Rawn J y Scrimgeour K. 2002. Principles of biochemistry. Prentice Hall. 827 p.

- Isaacman D, McIntosh E, Reinert R. 2010. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *J. Infect. Dis.* 14:e197–209.
- Johnson H, Knoll M, Levine O, Stoszek S, Hance L, Reithinger R, Muenz L, O'Brien K. 2010. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project. *PLoS Medicine*. 7:1000348.
- Kaplan J. 2002. Mechanisms of cellular Iron Acquisition: Another Iron in the Fire. *Cell*. 111: 603-606.
- Köster, W. 1997. Transport of iron (III) hydroxamates across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Trautwein A. X. Ed. *Bioinorganic Chemistry. Transition metals in biology and their coordination chemistry*, Wiley-VCH, p.56-68.
- Köster, W. 2001. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res. Microbiol.* 152: 291-301.
- Lefranc Nègre V, Bonacorsi S, Schubert S, Bidet P, Nassif X, Bingen E. 2004. The siderophore receptor IroN but not the high pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis. *Infect Immun.* 72: 1216-1220.

- Lencastre H, Tomasz A. 2002. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centers and drug resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemoter. 50(S2):75-81.
- Létoffé, S; Deniau, C; Wolff, N; Dassa, E; Delepelaire, P; Lecroisey, A. y Wandersman, C. 2001. Haemophore- mediated bacterial haem transport: evidence for a common or overlapping site for haem-free and haem-loaded haemophore on its specific outer membrane receptor. Mol Microbiol. 41: 439-450.
- Liu X, Olczak T, Guo H. C., Dixon D. W y Genco C. A. 2006. Identification of amino acid residues involved in heme binding and hemoprotein utilization in the *Porphyromonas gingivalis* heme receptor HmuR. Infect Immun. 74: 1222-32.
- Lund E, Henrichsen, J. 1978. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. En: Norris, E, Ribbon, F. Methods in Microbiol.12:242-261.
- Madigan M. T, Martinko J. M; y Parker J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. Décima edición. Pearson Educación, S. A; Madrid. 1096 p.
- Mazmanian, S. K; Skaar, E.P; Gaspar, A. H; Humayun, M; Gornicki, P; Jelenska, J; Joachmiak, A; Missiakas, D. M. y Schneewind, O. 2003. Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. Science 299: 906-909.

- Mietzner, T. A; Teneza, S. B; Adhikari, P; Vaughan, K. G; Nowalk, A. J. 1998. Fe (III) periplasm-to-cytosol transporters of gram-negative pathogens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 225: 113-135.
- Mulholland K. 1999. Magnitude of the problem of childhood pneumonia. *Lancet Infect Dis* 354:590-592
- Musher DM. 2000. *Streptococcus pneumoniae*. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th Ed. New York: Churchill Livingstone. 2128-2147.
- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS. 2009. Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet Infect Dis*, 374:893–902.
- Perutz MF. Structure and mechanism of haemoglobin. 1976. *Br Med Bull*; 32: 195-208.
- Pradel, E; Guiso, N; Menozzi, F. D y Loch, C. 2000. *Bordetella pertussis* Ton B.a Bvg-independent virulence determinant. *Infect Immun.* 68: 1919-1927.
- Ratledge, C; y L. Dover. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 54:881-941.
- Reeves SA, Torres AG, Payne SM. 2000. TonB is required for intracellular growth and virulence of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun.* 68: 6329-6336.

- Reynolds, P. R; Mottur, G. P. y Bradbeer, C. 1980. Transport of vitamin B12 in *Escherichia coli*. Some observations on the roles of the gene products of BtuC and TonB. J. Biol. Chem. 255: 4313-4319.
- Roca A, Sigaúque B, Quintó L, Mandomando I, Vallès X, Espasa M, Abacassamo F, Sacarlal J, Macete E, Nhacolo A, Levine M, Alonso P. 2006. Invasive pneumococcal disease in children <5 years of age in rural Mozambique. Trop. Med. and Internal. H. 11:1422–1431.
- Schryvers AB, Stojiljkovic I. 1999. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. Mol Microbiol. 32: 1117-1123.
- Schultz R. 1993. Proteínas fisiológicas. En: Devlin T. Ed. Bioquímica. Barcelona: Reverté. p. 95-133.
- Simpson, W; Olczak, T. y Attardo, C. 2000. Characterization and expression Of HmuR, a TonB-Dependent Hemoglobin Receptor of *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 182: 5737-5748.
- Tai, S; Lee, C. y Winter, R. 1993. Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 5401-5405.
- Tai, S; Wang, T y Lee, C. 1997. Characterization of Hemin binding activity of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 1083-1087.

- Takase H, Nitani H, Hoshino K, Otani T. 2000. Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa* tonB gene for high affinity iron acquisition and infection. *Infect Immun.* 68: 4498-4504.
- Telen M. Eritrocitos maduros. En: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens J, Lukens J. 1994. *Wintrobe Hematología clínica*. Buenos Aires: Intermédica. p. 80-105.
- Thornton J, Durick-Eder K y Tuomanen E. 2010. Pneumococcal pathogenesis: “innate invasion” yet organ-specific damage. *J Mol Med.* 88: (2): 103-107.
- Torres AG, Redford P, Welch RA, Payne SM. 2001. TonB dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect Immun.* 69: 6179-6185.
- Touati, D. 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 373:1-6.
- Tuomanen E, Mitchell T, Morrison D y Spratt B. 2004. *The Pneumococcus*. Washington (DC): ASM Press. 426 p.
- Wandersman C, Delepelaire P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol.* 58: 611-647.
- Wandersman, C. y Stojiljkovic, I. 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol.* 53: 1209-1220.

- Weinberg E. D. 2008. Iron availability and infection. *Biochimica et Biophysica Acta*. p. 6.
- Winn, W. 2008. *Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color*. Sexta edición. Panamericana. Madrid, España. 1900 p.
- Yaro S, Lourd M, Traoré Y, Njanpop-Lafourcade BM, Sawadogo A, Sangare L, Hien A, Ouedraogo MS, Sanou O, Parent du Châtelet I, Koeck JL, Gessner BD. 2006. Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis epidemic in Burkina Faso. *Clin. Infect. Dis.* 43:693–700.
- Zheng, M; Doan, T, Scheneider, D. y Storz, G. 1999. OxyR and SoxRS regulation of Fur. *J. Bacteriol* 181:4639-4643.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 03 de septiembre del 2012, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Q.F.B. María Elena Romero Espejel.

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Dra. María Teresa Núñez Cardona

Dra. Mavil López Casamichana

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
