



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“EFECTO DE APO-LACTOFERRINA EN LA SECRECIÓN DE LEUCOTOXINA  
Y VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Mannheimia haemolytica* A2”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CHRISTIAN ÁVALOS GÓMEZ

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya  
FMVZ, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Efrén Díaz Aparicio, INIFAP, FMVZ, UNAM  
Dr. Edgar Zenteno Galindo, Facultad de Medicina, UNAM

Cd Mx, Marzo 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Resumen

*Mannheimia haemolytica* serotipo A2 es la principal causa de manheimiosis neumónica en ganado ovino y es responsable de pérdidas económicas significativas en la producción pecuaria en todo el mundo. *M. haemolytica* produce estructuras esféricas derivadas de la membrana externa (ME) llamadas vesículas de membrana externa (VME) que contienen leucotoxina (Lkt) y otros factores de virulencia. La lactoferrina bovina (Lfb) es una glicoproteína de 80 kDa que posee propiedades bacteriostáticas y bactericidas y es parte del sistema inmune innato de los mamíferos. En el presente estudio, se evaluó el efecto de la Lfb en el crecimiento de *M. haemolytica* A2, así como en algunos factores de virulencia como Lkt, lipopolisacárido (LPS) y VME. Concentraciones de apo-Lfb de 8-20  $\mu\text{M}$ , mostraron un efecto bactericida contra *M. haemolytica* A2, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 16  $\mu\text{M}$ , evaluado mediante D.O. y cuenta viable. Las dosis sub-letales de 2 a 8  $\mu\text{M}$  de apo-Lfb, aumentaron la liberación de VME de manera concentración dependiente, hasta 186 veces para la de 8  $\mu\text{M}$  respecto al control, cuantificada mediante citometría de flujo. Apo-Lfb modificó la estructura normal de la ME y las VME, observada a través de microscopía electrónica de transmisión. Apo-Lfb también indujo la liberación de LPS en sobrenadante de cultivo de *M. haemolytica* A2 hasta ocho veces respecto al basal, observado mediante tinción de plata. Además, apo-Lfb aumento la permeabilidad de la ME de la bacteria, disminuyendo las CMI de SDS y polimixina B de 15 y 9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para el grupo control, hasta 3 y 3.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para el grupo de 8  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Inmunotransferencias mostraron que apo-Lfb incremento la secreción de Lkt en sobrenadantes de cultivo hasta 15 veces. Este estudio puede ser utilizado como antecedente para evaluar el uso de apo-Lfb en animales, como adyuvante en el tratamiento de la manheimiosis ovina en dosis adecuadas.

**Palabras clave:** *Mannheimia haemolytica*, manheimiosis ovina, lactoferrina, vesículas de membrana externa, leucotoxina

## **Abstract**

*Mannheimia haemolytica* serotype A2 is the leading cause of pneumonic manheimiosis in sheep and is responsible for economic losses in farm production worldwide. *M. haemolytica* produces outer membrane (OM)-derived spherical structures named outer membrane vesicles (OMVs) that contain leukotoxin and other virulence factors. Bovine lactoferrin (BLf) is an 80 kDa glycoprotein that has bacteriostatic and bactericidal properties and is part of the innate immune system of mammals. In the present study, the effect of BLf on the growth of *M. haemolytica* A2, as well as on some virulence factors such as Lkt, lipopolysaccharide (LPS) and OMVs was evaluated. Concentrations of 8-20  $\mu\text{M}$  apo-BLf, showed a bactericidal effect against *M. haemolytica* A2, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 16  $\mu\text{M}$ , evaluated by D.O. and viable account. Sub-lethal doses of 2 to 8  $\mu\text{M}$  apo-BLf increased the release of OMVs up to 186-fold for the concentration of 8  $\mu\text{M}$  compared to control, quantified by flow cytometry. Apo-BLf modified the normal structure of the outer membrane (OM) and OMVs, observed through transmission electron microscopy. Apo-BLf also induced the release of LPS in culture supernatant of *M. haemolytica* A2 up to eight-fold basal, observed by silver staining. Furthermore, apo-BLf increased the permeability of the OM of the bacteria, decreasing the MIC of SDS and polymyxin B since 15 and 9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  for the control group, to 3 and 3.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  for 8  $\mu\text{M}$  group, respectively. Immunoblotting showed that apo-BLf increased Lkt secretion in culture supernatants up to 15-fold. This study can be used as an antecedent to evaluate the use of apo-BLf in animals, as an adjuvant in the treatment of ovine manheimiosis in correct doses.

**Key words:** *Mannheimia haemolytica*, ovine pneumonic manheimiosis, lactoferrin, outer membrane vesicles, leukotoxin

## Contenido

Resumen.....	I
Abstract.....	II
I. Introducción.....	1
Las neumonías en la ovinocultura.....	1
Etiología: <i>Mannheimia haemolytica</i> .....	2
Leucotoxina (Lkt).....	4
Vesículas de membrana externa (VME).....	6
Lactoferrina (Lf).....	6
II. Justificación.....	8
III. Hipótesis.....	8
IV. Objetivo general.....	9
V. Objetivos particulares.....	9
VI. Materiales y Métodos.....	10
Caracterización de <i>M. haemolytica</i> A2.....	10
Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	10
Obtención de Vesículas de membrana externa (VME) de <i>M. haemolytica</i> A2.....	11
Conteo de VME con tubos Truocount.....	11
Tinción negativa para microscopía electrónica.....	12
Ensayo de integridad de membrana.....	12
Tinción de Plata.....	12
Inmunoelectrotransferencia.....	13
Diferenciación de monocitos de sangre periférica de ovino a macrófagos.....	14
VII. Resultados.....	15
Crecimiento bacteriano.....	15
Obtención y caracterización de VME de <i>M. haemolytica</i> A2.....	15
Efecto de apo- y holo-Lfb en el crecimiento de <i>M. haemolytica</i> A2.....	16
Efecto de apo- y holo-Lfb en la secreción de VME de <i>M. haemolytica</i> A2.....	18
Efecto de apo- y holo-Lfb en la estructura de la membrana externa y las VME de <i>M. haemolytica</i> A2.....	19

Efecto de apo- y holo-Lfb en la integridad de la membrana externa de <i>M. haemolytica</i> A222	
Efecto de apo- y holo-Lfb en el desensamble del LPS de la membrana externa de <i>M. haemolytica</i> A2 .....	23
Efecto de apo- y holo-Lfb en la secreción de Lkt en sobrenadante de cultivo de <i>M. haemolytica</i> A2 .....	24
Efecto de apo- y holo-Lfb en la liberación de Lkt contenida en VME de <i>M. haemolytica</i> A2 .....	27
Efecto de apo- y holo-Lfb en la citotoxicidad de la Lkt y las VME de <i>M. haemolytica</i> A2 sobre macrófagos ovinos.....	28
VIII. Discusión.....	29
IX. Conclusiones.....	35
X. Perspectivas.....	35
XI. Bibliografía.....	36

## Lista de figuras:

**Figura 1: Vesículas de membrana externa de *M. haemolytica* A2.** Vesículas teñidas con acetato de uranilo al 2%, obtenidas de células sin tratamiento, observadas al microscopio electrónico. Flecha: señala la bicapa lipídica característica.

**Figura 2: Proteínas de membrana externa y de VME teñidas con tinción de Coomassie.** SDS-PAGE al 12% Carril 1: Marcador de pesos moleculares, carril 2: proteínas de VME, carril 3: proteínas de PME. 20µg de proteína por carril. Flechas: proteínas de interés de 60, 54 y 45 kDa, presentes en ambos extractos.

**Figura 3: Efecto de apo-Lfb en el crecimiento de *M. haemolytica* A2.** Se determinó la D.O. (A, 595nm) y conteo de las UFC (B) a diferentes tiempos (3, 6 y 9 h) y concentraciones de apo-Lfb (2-20 µM) para determinar el número de bacterias vivas en el medio. ST: Sin tratamiento (solo BHI).

**Figura 4: Efecto de holo-Lfb en el crecimiento de *M. haemolytica* A2.** Se determinó la D.O. (A, 595nm) y conteo de las UFC (B) a diferentes tiempos (3, 6 y 9 h) y concentraciones de holo-Lfb (2-20 µM) para determinar el número de bacterias vivas en el medio. ST: Sin tratamiento (solo BHI).

**Figura 5: Dot plot del conteo de VME de *M. haemolytica* A2 mediante tubos Trucount.** R1: Región de perlas del tubo. R2. Región de vesículas.

**Figura 6: Efecto apo-, holo-Lfb y 2'2-dipiridil en la producción de vesículas en *M. haemolytica* A2.** Gráfica que muestra el número absoluto de vesículas contadas mediante tubos Trucount® de los diferentes tratamientos. ST: Sin tratamiento. Concentraciones de apo u holo-Lfb de 2 a 8 µM. Concentraciones de 2,2'-dipiridil (2DP) de 0.10 a 0.25 mM.  $n=5$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

**Figura 7: Efecto de apo-Lfb en la membrana de las VME y la membrana externa de *M. haemolytica* A2.** Se cultivaron bacterias en BHI suplementado con diferentes concentraciones de apo-Lfb (2, 4, 6 y 8 µM). **Flechas:** VME; **círculos y óvalos:** conjunto de VME. Microscopía electrónica, tinción negativa.

**Figura 8: Efecto de holo-Lfb en la estructura de VME y la membrana externa de *M. haemolytica* A2.** Se cultivaron bacterias en BHI suplementado con diferentes concentraciones de holo-Lfb (2, 4, 6 y 8 µM). **Flechas:** VME; **círculos y óvalos:** conjunto de VME. Microscopía electrónica, tinción negativa.

**Figura 9: Efecto de apo- y holo-Lfb en la integridad de la membrana externa de *M. haemolytica* A2.** Se muestra la CMI para SDS (A) y para polimixina B (B) cuando las bacterias son crecidas en BHI suplementado con apo- y holo-Lfb (1-8µM). ST: Sin tratamiento, solo BHI. Los MIC de los controles fueron 15 y 9 µg/ ml para SDS y polimixina B sin Lfb, respectivamente.  $n=3$  \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

**Figura 10: Efecto de apo- y holo-Lfb en el desensamble del LPS de la membrana externa de *M. haemolytica*.** SDS-PAGE al 12% teñido con tinción de plata específica para LPS. Muestras de bacterias crecidas en BHI suplementado con apo- (A) y holo-Lfb (B), se señala la banda correspondiente a la endotoxina (LPS) y la gráfica correspondiente a la densitometría (C). ST: Sin tratamiento, solo BHI.  $n=3$  \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

**Figura 11: Detección de la Lkt de *M. haemolytica* A2 en medio de cultivo y en sus VME.** Inmunodetección de Lkt por inmunotransferencia de vesículas (VME) y sobrenadante de cultivo (SC) con un anti-Lkt comercial. MPM: Marcador de peso molecular. Flecha: Lkt.

**Figura 12: Efecto de apo- y holo-Lfb en la secreción de Lkt en sobrenadante de cultivo.** Inmunotransferencias reveladas con un anti-Lkt. Sobrenadante de cultivo de bacterias crecidas en BHI suplementado con apo- (A) u holo-Lfb (B). Gráfica de la densitometría (C). ST: Sin tratamiento, solo BHI. Experimento ajustado a Lkt secretada por  $1 \times 10^6$  bacterias. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=5$

**Figura 13: Efecto de 2'2-dipiridil en la secreción de Lkt en los sobrenadantes de cultivo de *M. haemolytica* A2.** Se cultivaron bacterias en BHI suplementado con 2'2-dipiridil a diferentes concentraciones (0.10-0.35mM).

Las inmunotransferencias se revelaron utilizando un anti-Lkt en sobrenadante de cultivo de *M. haemolytica* A2 (A). Gráfica de la densitometría (B). \*\*\*P<0.001, \*\*\*\* P <0,0001, n=3

**Figura 14: Efecto de apo- y holo-Lfb en la concentración de Lkt en VME liberadas por *M. haemolytica* A2.** Inmunotransferencia de Lkt contenida en VME de bacterias cultivadas en BHI suplementadas con apo- (A) u holo-Lfb (B). Gráfica de la densitometría (ajustado a la liberación de Lkt desde 1,000 OMV) (C). \*\*\* P <0,001, \*\*\*\* P <0,0001, n=3

**Figura 15: Efecto de apo- y holo-Lfb en la citotoxicidad de la Lkt y las VME de *M. haemolytica* A2 sobre macrófagos ovinos.** (A) Macrófagos ovinos incubados en RPMI solo más Lkt pura [secretada por bacterias crecidas en BHI solo (Lkt Ctl) o con 2, 4, 6 u 8  $\mu$ M de apo- u holo-Lfb (2-8  $\mu$ M apo/holo)], o RPMI más 2, 4, 6 u 8  $\mu$ M de apo- u holo-Lfb más Lkt pura [secretada por bacterias crecidas en BHI más 2, 4, 6 y 8  $\mu$ M de apo- u holo-Lfb, (2-8  $\mu$ M apo/holo + apo/holo)]. ST: Macrófagos ovinos sin tratamiento. MQh Lkt (+): Macrófagos humanos tratados con Lkt pura secretada por bacterias crecidas en BHI solo. (B) Macrófagos ovinos incubados en RPMI más VME purificadas [secretadas por bacterias crecidas en BHI solo (VME Ctl) o BHI más 2 y 8  $\mu$ M de apo- u holo-Lfb (VME 2 y 8  $\mu$ M apo/holo)].

## Lista de abreviaturas:

ME: Membrane externa

VMEs: Vesículas de membrana externa

Lf: Lactoferrina

apo-Lfb: Apo lactoferrina bovina

holo-Lfb: Holo lactoferrina bovina

Lkt: Leucotoxina

LPS: Lipopolisacárido

PMEs: Proteínas de membrana externa

SC: Sobrenadante de cultivo

BHI: Brain heart infusion

UFC: Unidades formadoras de colonia

TA: Temperatura ambiente

PBS: Phosphate-buffered saline (Buffer fosfato salino)

CMI: Concentración mínima inhibitoria

SDS: Dodecilsulfato sódico

TBS: Tris-buffered saline (Solucion salina tamponada con Tris)

SFB: Suero fetal bovino

GM-CSF: Factor estimulante de colonia granulocito-macrófago

DMSO: Dimetilsulfoxido

ANOVA: Análisis de varianza de una vía

2DP: 2'2 dipiridil

Lfcins: Lactoferricinas

Lfampin: Lactoferrampina

ST: Sin tratamiento

Gtx: Gentamicina.

## **I. Introducción**

### **Las neumonías en la ovinocultura**

A nivel mundial, las neumonías son consideradas la principal causa de muerte en rumiantes. Las pérdidas económicas que las neumonías originan incluyen muerte de los animales, disminución de la ganancia de peso, deficiente conversión alimenticia y elevados costos en tratamientos de neumonías crónicas, ocasionando altos costos de producción. Los principales microorganismos asociados a las neumonías ovinas son bacterias y micoplasmas, sin embargo, los virus también están involucrados en estos problemas infecciosos. *Mannheimia haemolytica* es el principal patógeno bacteriano implicado en la colonización del pulmón y la enfermedad se conoce como manheimiosis neumónica (Trigo, 1987; Zecchinon et al., 2005).

*M. haemolytica* coloniza la cavidad nasal y las criptas de las tonsilas del ganado bovino y ovino sano; sin embargo después de haber sufrido estrés y/o una infección viral, la bacteria se incrementa rápidamente en número y pasa a los pulmones, desencadenando un cuadro de neumonía aguda (Jaramillo-Arando et al., 2009). En bovinos el serotipo A1 es el más común (26%), mientras que el segundo más común es el A6 (5%). En ovinos el serotipo más importante a nivel de mucosa respiratoria es el A2; sin embargo, los estudios realizados en México han demostrado mayor incidencia de los serotipos A1, A2, A6, A7 y A9 en corderos y los serotipos A1 y A2 en bovinos, en su estado comensal (Colín et al., 1987; García-Alvarez et al., 2018; Jaramillo-Arando et al., 2009).

En Estados Unidos, la enfermedad en el ganado bovino (Bovine Respiratory Disease, BRD, por sus siglas en inglés) es producida por el serotipo A1 y es la principal causa de pérdidas económicas, considerando que puede alcanzar un porcentaje de alrededor del 8% del costo total de producción (Griffin, 1997; USDA, 2011). El porcentaje de morbilidad por neumonías en rumiantes en producción, es uno de los más severos en la economía de esta industria. Este porcentaje incluye alrededor del 75% de las enfermedades clínicas. En cuanto al nivel de

mortalidad ocasionado por neumonías los porcentajes varían desde el 5% hasta el 40% (Hilton, 2014; Pijoan AP y Chávez, 2003). Aunque, los datos correspondientes al serotipo A2 son desconocidos, favorecer la disminución de las neumonías en bovinos y en particular en ovinos, se ha convertido en absoluta prioridad; además, se sabe que, disminuir el costo en gastos zootécnicos es el principal impacto en los beneficios de la unidad de producción, independientemente del precio de la carne en el mercado (Pijoan AP y Chávez, 2003).

### **Etiología: *Mannheimia haemolytica***

*M. haemolytica* es una bacteria Gram-negativa que crece en agar sangre en forma de pequeñas colonias con un engrosamiento central. En agar sangre de caballo, oveja o conejo, forma colonias circulares rodeadas por una zona estrecha de  $\beta$ -hemólisis, mientras que, en las placas hechas con sangre de corderos de un mes de edad, da una doble zona de  $\beta$ -hemólisis. Su crecimiento es mesófilo y anaerobio facultativo o microaerófilico. *M. haemolytica* fermenta manitol, glucosa, maltosa, sorbitol y sacarosa, sin producción de gas. Las pruebas de indol, ureasa, azul de metileno (MB) y Voges-Proskauer (VP) son negativas. Oxidasa y catalasa son siempre positivas (Jaramillo-Arando et al., 2009).

Los miembros del género *Mannheimia* producen diversos factores asociados a la virulencia de este grupo de microorganismos. Entre los factores importantes de *M. haemolytica* se encuentran la cápsula, el lipopolisacárido (LPS), algunas proteínas de membrana externa (PME), las proteínas de membrana reguladas por hierro (PMERH), algunas adhesinas, la leucotoxina (Lkt) y una neuraminidasa (Colín et al., 1987). A continuación, se describen las principales funciones de los diferentes factores de virulencia de *M. haemolytica*.

**Cápsula:** La cápsula aumenta la adhesión bacteriana a los macrófagos alveolares, está formada principalmente por ácido N-acetilmanoso aminurónico y N-acetilmanosamina unidos por enlaces  $\beta$  (1-4) en el serotipo A1 y por un polímero lineal de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) unido con enlaces  $\alpha$  (2-8) para el serotipo A2. Debido a que la cápsula presenta variaciones en su estructura, se ha utilizado para identificar a los 12

serotipos de la bacteria. El material capsular puede interactuar con la sustancia surfactante pulmonar, de tal modo que facilita la adherencia local de los microorganismos a las células (Puente-Polledo et al., 1998; Sleim, 2005).

**Proteínas de membrana externa (PME):** Se han caracterizado diferentes PME de *M. haemolytica* de múltiples pesos moleculares y funciones (28, 30, 32, 45 kDa; OmpA, lipoproteínas, PlpA, PlpB, PlpC) (Lo y Sorensen, 2007; Nardini et al., 1998). El papel de las PME como factor de virulencia radica en favorecer la adherencia a la célula del hospedero, además como transportadoras de material a través de la membrana (transporte pasivo y activo de iones y solutos, porinas) (Squire et al., 1984). Se cree que es posible que pequeñas cantidades de PME estimulen la quimiotaxis y la adherencia de los neutrófilos, favoreciendo la aglomeración en el punto inflamatorio (Iovane et al., 2006).

**Proteínas de membrana externa reguladas por hierro (PMERH):** Las bacterias patógenas en el hospedero usan un mecanismo conservado para obtener hierro, el cual es un nutriente esencial para la sobrevivencia de prácticamente todas las células (Puchalski et al., 2013). Las bacterias capturan del hospedador moléculas cargadas con hierro tales como lactoferrina (Lf) y transferrina (Tf), por medio de receptores de superficie específicos (Ratledge y Dover, 2000). La bacteria utiliza proteínas transportadoras de hierro, mediadas por la interacción de transferrinas con receptores específicos en la ME de la célula bacteriana. Este receptor está constituido por 2 proteínas, llamadas TbpA (proteína de unión a transferrina A) y TbpB (proteína de unión a transferrina B). TbpA es una proteína integral de membrana que actúa como un canal por el cual se transporta el hierro que es desprovisto de la transferrina. Por otra parte, la proteína TbpB es una lipoproteína que contiene una secuencia que expresa una señal para la peptidasa II, la cual se encuentra localizada en su extremo amino terminal. El receptor se encuentra expuesto en la superficie bacteriana y tiene la capacidad de distinguir entre la transferrina cargada con hierro (holo-transferrina) y la transferrina libre de hierro (apo-transferrina), mostrando alta afinidad por la holo-transferrina (Río-González, 2004). *M. haemolytica* posee este sistema de captación de hierro y es altamente específico al hospedero (Ogunnariwo y Schryvers, 1990; Ogunnariwo et al., 1997).

**Lipopolisacárido (LPS):** El LPS es considerado uno de los componentes de la bacteria con alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria. La interacción del LPS con los macrófagos puede determinar muchos de los efectos patológicos asociados. Los macrófagos interactúan con el LPS y son activados para producir citocinas proinflamatorias, sustancias procoagulantes, radicales de oxígeno y proteasas involucradas en la respuesta inflamatoria (Li y Clinkenbeard, 1999; McClenahan et al., 2008).

**Plásmidos:** En *M. haemolytica* se ha podido demostrar la existencia de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos. La presencia de plásmidos no es un fenómeno característico entre todas las cepas, algunas poseen sólo un plásmido pequeño (aproximadamente 4.2 kpb), el cual es responsable de la resistencia a estreptomicina y sulfonamidas (Kehrenberg et al., 2001; Tauro et al., 1986; Watts et al., 1994).

**Neuraminidasa:** Esta enzima corta el ácido siálico de las glicoproteínas de la superficie celular o del moco que al perderse expone estructuras crípticas como galactosa, favoreciendo la pérdida de carga neta negativa y de interacciones hidrofóbicas, inhibiendo la capacidad de protección de las secreciones respiratorias e incrementando la adherencia de *M. haemolytica* al epitelio de la mucosa, particularmente en el tracto respiratorio superior (Brown y Straus, 1987; Jaramillo-Arando et al., 2009; Jaramillo y Zenteno, 1999).

**Adhesina:** Las adhesinas ayudan a colonizar el tracto respiratorio. Se ha reportado una adhesina de 68 kDa que es capaz de aglutinar eritrocitos de conejo, pero después de que es desialilada o sometida a tratamiento con pronasa se pierde este efecto aglutinante. La actividad aglutinante de la adhesina es inhibida por N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y en menor grado con N-acetilneuramínico (Neu5Ac) (Jaramillo et al., 2000).

**Fimbrias:** Las fimbrias son estructuras filamentosas que pueden estar involucradas en la iniciación de la infección. Las fimbrias permiten que las bacterias se adhieran y no sean barridas por las secreciones respiratorias. Se han reportado dos tipos de fimbrias; una larga y rígida de 12 nm de longitud y una corta y flexible de 5 nm de longitud (Morck et al., 1987).

### **Leucotoxina (Lkt)**

Esta toxina es una proteína soluble de 104-kDa que es tóxica para macrófagos y leucocitos de rumiantes, es termolábil, estable al oxígeno y a cambios del pH. Las especies de

*Mannheimia* requieren de una alta concentración de calcio para la producción de esta citotoxina, que liberan durante su fase de crecimiento logarítmico. Se ha podido comprobar que el hierro es un factor requerido para el óptimo crecimiento de la bacteria y para la producción de la Lkt (Chang et al., 1987; Gentry et al., 1986; Strathdee y Lo, 1989).

Lkt pertenece a la familia de toxinas RTX (Repeats in toxin), las cuales son producidas por bacterias Gram negativas de distintas especies. La Lkt de *M. haemolytica* forma parte de la familia de estas exotoxinas, ya que contiene un número variable de dominios de aminoácidos repetidos ricos en glicina. La familia RTX comprende a un multidominio de exotoxinas, que incluye: la hemolisina de *Escherichia coli* y la de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, entre otras (Chang et al., 1987).

La Lkt es una proteína monomérica que reconoce específicamente a los leucocitos y plaquetas de los rumiantes. Se ha demostrado que la Lkt se une a una  $\beta_2$  integrina, que es un heterodímero formado por una subunidad  $\alpha$  (CD11a) y una subunidad  $\beta$  (CD18); esta integrina fisiológicamente se une al antígeno leucocitario asociado a función 1 (LFA-1) (Gopinath et al., 2005). El principal efecto de la Lkt es la lisis de leucocitos de rumiantes, a través de la formación de poros en la membrana de éstos. La toxina se secreta como monómero y se inserta en la bicapa lipídica formando un poro hidrofílico de 0.6 a 1 nm de diámetro, que permite la salida de potasio y la entrada de calcio, ocasionando el hinchamiento de la célula y posteriormente su lisis, trayendo como consecuencia las lesiones pulmonares características de la manheimiosis neumónica (Highlander, 2001; Jeyaseelan et al., 2002; Linhartová et al., 2010).

Hsuan y col. (1999) reportaron que la Lkt eleva la concentración de calcio en macrófagos alveolares de bovino, afectando la regulación del complejo proteico NF-kB, debido a que bloquea su activación. También se ha reportado que a bajas concentraciones de Lkt induce la muerte celular por apoptosis. La capacidad de dicha toxina para inducir apoptosis en leucocitos (macrófagos y neutrófilos) permite a la bacteria evadir la respuesta inmune y aumentar el proceso inflamatorio a nivel pulmonar (Sun et al., 2000).

## **Vesículas de membrana externa (VME)**

*M. haemolytica* A2, al igual que todas las bacterias Gram negativas, tiene la capacidad de producir vesículas de membrana externa (VME), las cuales son estructuras esféricas heterogéneas que pueden medir desde 50 hasta 250 nm de diámetro, formadas a partir de la membrana externa de la bacteria, en cualquier fase de crecimiento (Kuehn y Kesty, 2005; Manning y Kuehn, 2013). Actualmente, se ha identificado que también las bacterias Gram-positivas y las arqueas pueden producir y liberar vesículas producidas a partir de sus paredes celulares (Gurung et al., 2011; Rivera et al., 2010). Las VME son aparentemente una ruta alterna para la liberación de diversos factores de virulencia. Las VME de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Serratia marcescens* contienen fosfolipasa C, proteasas, proelastasas, y hemolisinas. Los constituyentes que están dentro del lumen de las VME cuentan con la ventaja de estar protegidos contra la acción inactivante de enzimas ambientales (Beveridge, 1999).

En *M. haemolytica* se han caracterizado algunos factores de virulencia contenidos en su VME, se identificaron 3 proteínas inmunogénicas de membrana externa de diversos pesos moleculares, 45, 54 y 60 kDa, LPS, Lkt y un fragmento de DNA de 23 kpb (Gonzalez et al., 2007), mediante zimografía se determinó también cistein- y metalo-proteasas (Ramírez et al., 2017).

## **Lactoferrina (Lf)**

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína de la familia de transferrinas muy conservada del sistema inmune innato de mamíferos. Es capaz de unir y transferir iones de hierro, son proteínas con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa. Lf es expresada en diversos fluidos biológicos y en particular en altos niveles en calostro y leche (Wang et al., 2019). La Lf humana se compone de una única cadena polipeptídica que contiene 703 aminoácidos, plegados en dos lóbulos globulares. Estos lóbulos llamados C-(carboxilo) y N-(amino) terminal están conectados por una  $\alpha$ -hélice. Cada lóbulo consiste en dos dominios conocidos

como C1, C2 y N1, N2, a su vez los dominios crean un sitio de unión a hierro en cada lóbulo (Adlerova et al., 2008). Hay tres formas de Lf según su saturación de hierro: apo-lactoferrina (apo-Lf, libre de hierro), forma monoférrica (con un ion férrico) y holo-lactoferrina (holo-Lf, con dos iones  $\text{Fe}^{3+}$ ). La estructura terciaria de holo-Lf y de apo-Lf es diferente; holo-Lf tiene una estructura más compacta y es más resistente a hidrólisis y bajo pH (Jameson et al., 1999). Debido a su posición estratégica en la superficie de las mucosas, la apo-Lf secretada representa uno de los primeros sistemas de defensa contra agentes microbianos que invaden el organismo, principalmente en esos sitios. En el sistema hematopoyético, Lf se expresa específicamente en neutrófilos en desarrollo durante la etapa de maduración del mielocito y se almacena en los gránulos secundarios de este tipo celular (Baggiolini et al., 1970; Rado et al., 1984). Lf afecta el crecimiento de una variedad de agentes infecciosos, incluyendo bacterias tanto Gram-positivas como negativas, virus, parásitos y hongos (Kirkpatrick et al., 1971). Esta gran cantidad de actividades es posible gracias a varios mecanismos de acción, no sólo en la capacidad de Lf de quelar el hierro férrico disponible, sino también de las interacciones de Lf con componentes moleculares y celulares, tanto del hospedero como de los patógenos.

El efecto bacteriostático de la Lf en su forma apo- se ha atribuido a su habilidad de captar el ion  $\text{Fe}^{3+}$  y limitar así su utilización por bacterias patógenas. Las bacterias requieren hierro como elemento esencial para su crecimiento y expresión de factores de virulencia (Reyes R.E., Manjarrez H.H.A, 2005). Se ha demostrado que de manera dosis dependiente, apo-Lf inhibe el crecimiento de bacterias patógenas no invasoras, como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (Dionysius et al., 1993) y *Helicobacter pylori* (Dial et al., 1998). Lf impide la agregación bacteriana y la eventual formación de biofilms causantes de daño tisular observado en ciertas enfermedades crónicas. Ensayos *in vitro* muestran que Lf inhibe biofilms del patógeno oportunista *P. aeruginosa* a concentraciones bacteriostáticas sub-óptimas (Rogan et al., 2004).

Lf ejerce un efecto bactericida directo por su capacidad de unirse a las porinas (Sallmann et al., 1999) y al lípido A del LPS (Appelmelk et al., 1994), presentes en la membrana externa de bacterias Gram negativas. La Lf es una glicoproteína fuertemente catiónica, cuya carga

positiva interacciona mediante atracciones electrostáticas con grupos aniónicos de componentes de la membrana externa, como los grupos fosfato del lípido A en el LPS. Dicha interacción induce la liberación de moléculas expresadas en la membrana externa (porinas y LPS), ocasionando su desestabilización y subsecuentemente pérdida de su permeabilidad. La Lf exhibe actividad enzimática de serina-proteasa sobre diversos sustratos bacterianos, como la adhesina Hap, proteína autotransportadora que facilita la colonización tisular de *Haemophilus influenzae* (Qiu et al., 1998). En nuestro grupo de trabajo se identificaron dos proteínas de unión para apo- y holo-lactoferrina bovina (Lfb) para *M. haemolytica* A1. Apo- y holo-Lfb se unen a dos PME de 32.9 y 34.2 kDa con PI estimado de 8.18 y 9.35, que fueron identificadas como una OmpA (proteína modificable por calor) y una proteína de membrana (porina), respectivamente (Samaniego et al., 2016).

## **II. Justificación**

La leucotoxina (Lkt) es el principal factor de virulencia secretado por *M. haemolytica* A2 y pudiera ser liberada en el contenido de las VME de la bacteria. Por otra parte, la Lfb es una glicoproteína capaz de disminuir el efecto de algunos de los factores de virulencia de las bacterias, a través de sus múltiples mecanismos de acción (bacteriostático, como quelante de hierro, permeabilización de membrana; por su unión a componentes de la ME, etc). Por ello, es importante determinar el efecto de Lfb en la producción, la secreción y el efecto citotóxico de la Lkt, tanto la que se secreta de manera libre al medio, como la contenida dentro de VME liberadas por *M. haemolytica* A2. Además de observar el efecto en el número y estructura de las VME, así como de la estructura de la bacteria en sí. Este conocimiento permitirá argumentar el uso de la Lfb en la prevención de la manheimiosis.

## **III. Hipótesis**

Apo-lactoferrina bovina es bactericida para *Mannheimia haemolytica* A2. Además, afecta algunos factores de virulencia de esta bacteria como, la secreción de leucotoxina en el medio externo y en vesículas de membrana externa, la liberación y el número de estas vesículas y

la liberación de lipopolisacárido. Estos efectos pueden deberse a sus propiedades de quelación de hierro y de unión a componentes de la superficie bacteriana, como proteínas de membrana externa.

#### **IV. Objetivo general**

Determinar el efecto de apo-Lfb en el crecimiento de *Mannheimia haemolytica* A2, en la secreción y actividad de su leucotoxina, así como en su estructura bacteriana y el número de vesículas de membrana externa liberadas por la bacteria.

#### **V. Objetivos particulares**

1. Determinar el efecto de apo- y holo-Lfb en el crecimiento de *M. haemolytica* A2, incluyendo determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de apo-Lfb.
2. Establecer el efecto de apo- y holo-Lfb en la liberación de VME, mediante citometría de flujo; así como cambios en su estructura, por microscopía electrónica.
3. Examinar el efecto de apo- y holo-Lfb en la estructura bacteriana de *M. haemolytica* A2.
4. Determinar el efecto de apo- y holo-Lfb en la salida del LPS de la membrana externa de *M. haemolytica*.
5. Determinar si apo- y holo-Lfb afectan la secreción de la Lkt a dosis sub-letales en sobrenadante de cultivo y en VME.
6. Determinar la citotoxicidad de la Lkt y de VME secretadas por bacterias crecidas con apo- y holo-Lfb en macrófagos ovinos, mediante la técnica de MTT.

En algunos de los casos se utilizaron concentraciones sub-letales de Lfb, para trabajar con bacterias dañadas, pero viables. Se utilizaron como control negativo las bacterias sin tratamiento y como control positivo para los experimentos de vesículas, bacterias tratadas con gentamicina.

## **VI. Materiales y Métodos**

### **Caracterización de *M. haemolytica* A2**

Se utilizó una cepa de campo de *M. haemolytica* A2, obtenida a partir de aislamiento de un pulmón neumónico, de un ovino muerto por la enfermedad; esta cepa fue recuperada en un trabajo previo donde fue caracterizada (Gonzalez et al., 2007). El serotipo capsular fue identificado mediante hemoaglutinación indirecta usando un anti-suero de referencia en microplacas. Se realizó la tinción de Gram y un análisis bioquímico mediante un kit comercial (Api 20E, BioMérieux S.A., México) para corroborar la morfología e identidad bacteriana respectivamente.

### **Concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Para explorar el efecto bactericida y bacteriostático de apo-Lfb y holo-Lfb en *M. haemolytica*, primero se realizó el crecimiento bacteriano en placas de agar sangre mediante estría cerrada, incubándose a 37 °C/24 h. Las bacterias se crecieron en 5 ml de medio Infusión Cerebro Corazón (BHI), al cual se adicionaron concentraciones de 2, 8, 16 y 20 µM de una de las dos proteínas (apo- u holo-Lfb). El ensayo se inició con 10<sup>5</sup> UFC y se incubó a 37 °C en agitación (200 rpm) por 3, 6 y 9 h. Se realizó la medición de la absorbancia con un espectrofotómetro (Coleman Jr.) a una D.O.<sub>595 nm</sub> para determinar las variaciones de estas y de manera indirecta observar el crecimiento de la bacteria en el medio. Además, se hizo el conteo de las UFC capaces de crecer (viables) a diferentes diluciones (1:100,000-1:10,000,000) en BHI sólido a las 24 h. Sólo las células viables eran capaces de crecer en el medio BHI sólido, por lo que con esto determinábamos el número de bacterias vivas presentes en el cultivo. Todos los experimentos se repitieron cinco veces por triplicado.

## **Obtención de Vesículas de membrana externa (VME) de *M. haemolytica* A2**

Posterior al crecimiento en medio sólido, las bacterias se cultivaron en BHI solo o agregando las diferentes concentraciones de apo- u holo-Lfb (2, 4, 6 y 8  $\mu\text{M}$ ) a 37 °C /180 rpm por 24 h. Para los grupos suplementados con gentamicina, al cabo de 4 h se adicionó el aminoglucósido a una dosis de 25  $\mu\text{g/ml}$  de cultivo (Kadurugamuwa y Beveridge, 1996) y se incubó nuevamente el cultivo en las condiciones antes mencionadas, hasta completar las 24 h. Paralelamente, se realizó la tinción de Gram para verificar morfología bacteriana.

Terminado el periodo de incubación, el cultivo se centrifugó a 9000 X g /15 min a 4 °C, en este paso se separó la biomasa y el sobrenadante se filtró por membranas de nitrocelulosa (Millipore, Irlanda) de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro, el producto de la filtración se ultracentrifugó (Beckman Coulter, EUA) a 150,000 X g /3 h /4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla resultante enriquecida con VME, se resuspendió en PBS. En todos los experimentos las VME que se utilizaron fueron obtenidas el mismo día del ensayo.

## **Conteo de VME con tubos Trucount**

Una vez obtenidas las VME con la metodología previamente descrita, se procedió a contar las vesículas utilizando tubos Trucount (BD, Biosciences). Se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de PBS (filtrado con membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro) sin tocar la perla del tubo Trucount. Después, se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de la muestra de VME y se agitó en vortex por 30 s, se dejó incubando 15 min a temperatura ambiente (TA). Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 450  $\mu\text{l}$  de PBS a la muestra, se agitó nuevamente en vortex durante 30 s y se incubó por 15 min más. Finalmente, se leyó la muestra en el citómetro de flujo (FORTESSA, BD) determinando el tamaño y la granularidad de las vesículas y las perlas. Para determinar el número de vesículas presentes en cada muestra se utilizó la siguiente fórmula (vesículas/ $\mu\text{l}$ ), analizando las diferentes poblaciones del dot plot.

# Eventos región vesículas	X	# Perlas en el tubo
# Eventos región perlas		Volumen muestra

### **Tinción negativa para microscopía electrónica**

Para observar a las VME, éstas se prepararon para tinción negativa y fueron observadas al microscopio electrónico. Una vez obtenidas las VME se colocaron en una rejilla (Electron Microscopy Sciences) y se contrastaron con acetato de uranilo al 2% por 2 min, 30 s y un segundo, consecutivamente. La muestra se dejó secar y posteriormente se observaron al microscopio electrónico (JEOL, JEM 2000 EX). Las muestras de bacterias se tiñeron el mismo tiempo, pero con acetato de uranilo al 1%.

### **Ensayo de integridad de membrana**

Para identificar si la membrana de las bacterias que se sometían al tratamiento con apo- y holo-Lfb sufría daño, se realizó un ensayo de CMI bajo las condiciones antes mencionadas, pero con algunas variantes. Las modificaciones fueron las siguientes: el ensayo se realizó en placas de 96 pozos, primero se puso a crecer a las bacterias en medio BHI solo, o con las diferentes concentraciones de apo- y holo-Lfb (2, 4, 6 y 8  $\mu$ M) por 2 h sin agitación, después del tiempo de incubación se agregó SDS (3 a 15  $\mu$ g/ $\mu$ l) o polimixina B (3 a 12  $\mu$ g/ml) a los diferentes grupos y se incubó 6 h más el cultivo. Finalmente, se realizó la medición de la D.O.<sub>595 nm</sub> y se determinó la CMI para los diferentes grupos (D.O. menor a 0.05 se consideraban como bacterias muertas).

### **Tinción de Plata específica para LPS**

Para ver el desensamble de LPS de la membrana externa de las bacterias y encontrarlo libre en el sobrenadante cuando se agrega apo- u holo-Lfb, se utilizaron geles con tinción de plata

específica para LPS. Se hicieron geles al 12% y se fijaron toda la noche en 200 ml de una solución de isopropanol al 25% + ácido acético al 7%. Después se oxidó el gel por 5 min en una solución que contenía: 1.05 g de ac. peryódico, 4 ml de solución fijadora y 150 ml de agua. Después se lavó 8 veces por 20 min con 200 ml de agua cada uno y se tiñó por 10 min en una solución que tenía: 28 ml de NaOH al 0.1 N, 1.25 ml de hidróxido de amonio (concentrado), 5 ml de nitrato de plata al 20% y 115 ml de agua. Terminando el tiempo de tinción, se lavó el gel 4 veces más con 200 ml de agua por 10 min y finalmente se agregaron 250 ml de una solución que contenía por litro: 50 mg de ac. cítrico y 0.5 ml de formaldehído al 37%, para observar la banda que correspondía al LPS. Los geles se escanearon y se midió la densidad de la banda de LPS utilizando el programa Image J (Fiji 1.51w, NIH, NY, USA).

### **Inmunoelectrotransferencia**

Para determinar la presencia de la Lkt en las VME y en el sobrenadante, se realizaron geles de SDS-PAGE a una concentración del 8% a las muestras correspondientes y se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (400 mA, 1 h). Esta membrana se bloqueó con TBS-Tween 0.1% + leche 5% por 2 h, posteriormente se lavó la membrana en TBS-Tween 0.1% en tres ocasiones por 10 min. Una vez lavada se incubó con el anticuerpo anti-Lkt (Biorbyt, policlonal, IgG) en TBS-Tween 0.1% a una dilución 1:5,000 durante toda la noche. Transcurrido el periodo de incubación se lavó nuevamente la membrana con TBS-Tween 0.1% por 3 veces y finalmente se incubó con un anticuerpo peroxidado anti-conejo por 2 h en la misma solución a una concentración de 1: 10,000 y se reveló la membrana mediante quimioluminiscencia. Se realizó la densitometría de las imágenes con el Software ImageJ (Fiji 1.51w, NIH, NY, USA) y se ajustaron los niveles de secreción de Lkt a  $1 \times 10^6$  bacterias (cuenta viable) en el caso del sobrenadante de cultivo y 1,000 vesículas (citometría de flujo) para el caso de muestras de VME.

## **Diferenciación de monocitos de sangre periférica de ovino a macrófagos**

Los macrófagos ovinos, se diferenciaron de monocitos obtenidos a partir de sangre periférica de ovinos clínicamente sanos. El uso de los animales, así como la metodología para la obtención de las muestras fueron aprobadas por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación. Se obtuvieron 120 ml de sangre heparinizada, esta muestra se sometió a gradiente de Lymphoprep (Axis-Shield, Norway) siguiendo una técnica modificada a partir de las instrucciones del fabricante. En nuestro protocolo se centrifugó la sangre diluida a 1,000 Xg / 15 min a TA. Una vez obtenido el paquete celular de leucocitos se procedió a la separación de las células CD14<sup>+</sup> mediante la utilización del sistema de separación magnética MiniMacs human CD14 (Miltenyi, CA, USA), siguiendo las indicaciones de fabricante. La muestra resultante de esta separación fue teñida y analizada para CD14 (Anti-CD14 Pacific Blue, BioLegend, CA, USA) mediante citometría de flujo (FORTESSA, Becton Dickinson) para confirmar su identidad. Posteriormente los monocitos se cultivaron en placa de 96 pozos colocando 200,000 células por pozo en medio RPMI 1640 suplementado con: suero fetal bovino al 10% (SFB, Gibco, NY, USA) y antibióticos y antimicótico (Caisson Labs, UT, USA) al 1%; finalmente, se dejaron incubando a 37 °C en condiciones de 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h para propiciar la adhesión celular. Al cabo del tiempo determinado se realizó un cambio de medio y se agregaron 100 ng de factor estimulante de colonia Granulocito-Macrófago (GM-CSF, PeproTech, Inc, NJ, USA), por cada 200,000 células. Este cultivo se llevó hasta los 5 días y se le adicionó GM-CSF nuevo cada día para mantener el estímulo de diferenciación.

## **Ensayo de viabilidad celular utilizando MTT**

Una vez diferenciados los macrófagos se les cambió el medio por medio nuevo sin rojo de fenol y suero al 10% en un volumen final de 90 µl. Se le agregaron los diferentes tratamientos: Sin tratamiento (control negativo), Lkt pura y VME procedentes de los cultivos de bacterias crecidas con diferentes concentraciones de apo- u holo-Lfb (2, 4, 6 y 8 µM), y se incubaron por 3 h, posteriormente se le agregó el reactivo de MTT y se dejó incubando 3

h más, para agregar finalmente la solución solubilizadora y leer en espectrofotómetro a 570 nm.

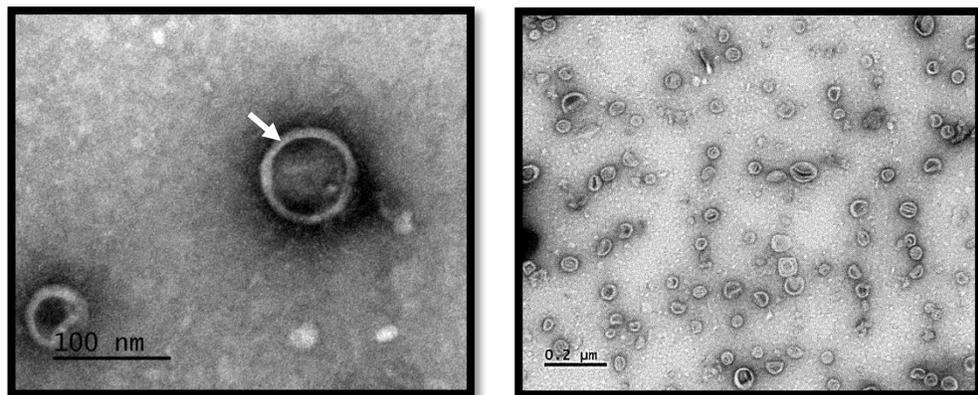
## VII. Resultados

### Crecimiento bacteriano

Primero se corroboró en todos los casos que la bacteria con la que estábamos trabajando era *M. haemolytica* y se realizó el procedimiento previamente descrito en la metodología. Se creció la bacteria en agar sangre por 24 h a 37° C.

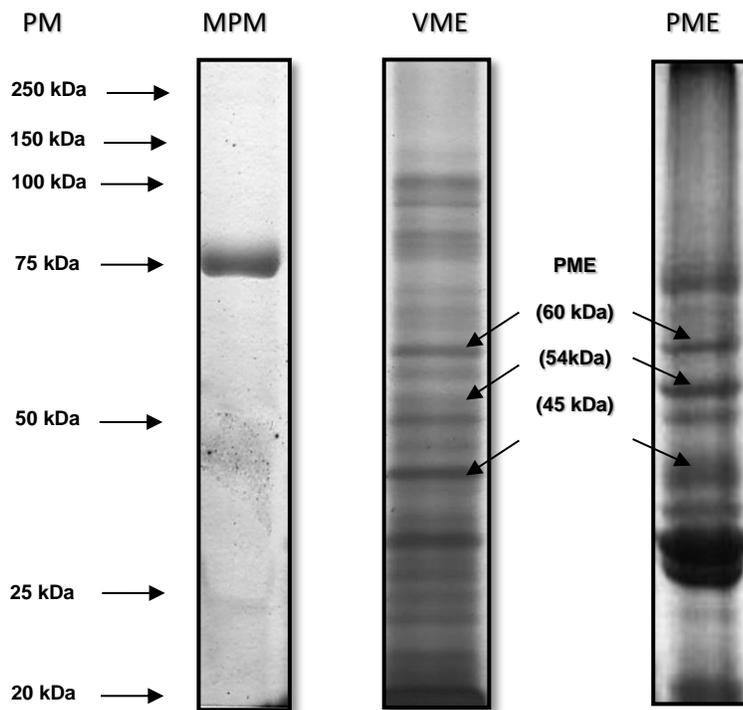
### Obtención y caracterización de VME de *M. haemolytica* A2

Se realizó la obtención de las VME liberadas por *M. haemolytica* A2 con la metodología descrita. Las VME se obtuvieron a partir de un inóculo inicial de  $5 \times 10^5$  UFC de *M. haemolytica* A2 y se obtuvo aproximadamente un promedio de 300 µg/ml de proteína total. En la **Figura 1** se observan las principales características morfológicas de las vesículas teñidas con tinción negativa como su estructura redondeada, se identifica su bicapa lipídica característica, debido a su origen de formación a partir de la membrana externa. Las VME se observan de diferentes tamaños de 50 a 250 nm.



**Figura 1: Vesículas de membrana externa de *M. haemolytica* A2.** Vesículas teñidas con acetato de uranilo al 2%, obtenidas de células sin tratamiento, observadas al microscopio electrónico. Flecha: señala la bicapa lipídica característica.

Para determinar el patrón proteico del contenido de las vesículas se realizaron geles de poliacrilamida y se observaron las proteínas presentes comparándolas con una muestra de PME para ver la similitud entre ambos extractos. Las imágenes de estos geles se muestran en la **Figura 2**, se identificaron tres proteínas comunes en las VMEs y PME de 60, 54 y 45 kDa. La fracción de membrana externa y las VME comparten una gran cantidad de proteínas en su estructura que van desde los 75 hasta los 25 kDa.

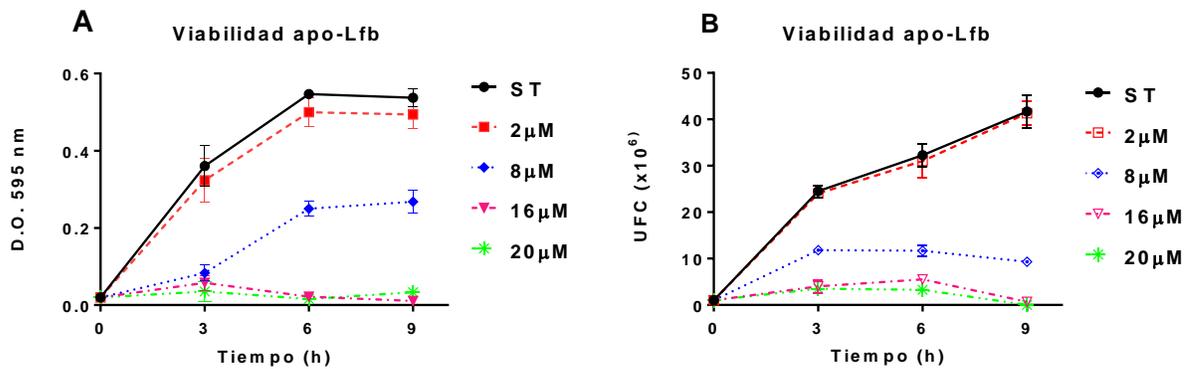


**Figura 2: Proteínas de membrana externa y de VME teñidas con tinción de Coomassie.** SDS-PAGE al 12% Carril 1: Marcador de pesos moleculares, carril 2: muestra de VME, carril 3: muestra de PME. 20µg de proteína por carril. Flechas: proteínas de interés de 60, 54 y 45 kDa, presentes en ambos extractos.

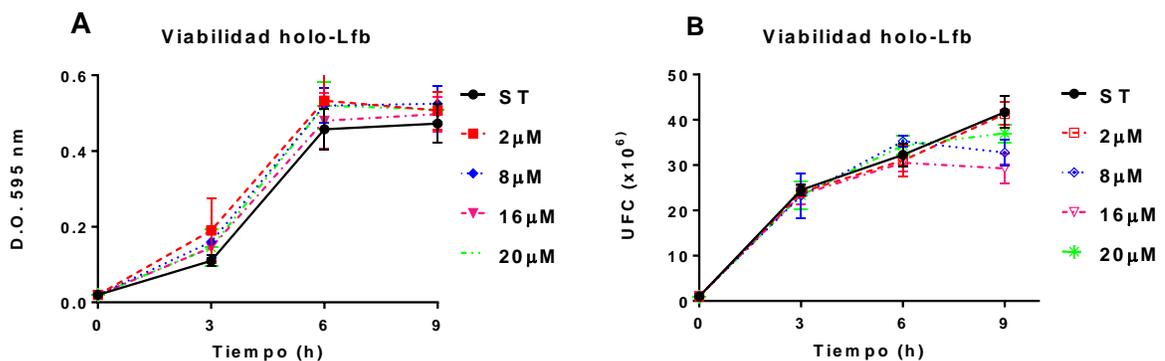
### Efecto de apo- y holo-Lfb en el crecimiento de *M. haemolytica* A2

Se determinó el efecto de apo-Lfb y holo-Lfb en el crecimiento de *M. haemolytica* A2, mediante la determinación de las variaciones en la D.O.<sub>595nm</sub> y el conteo de UFC viables (cuenta viable). La **Figura 3 y 4** muestran los datos para apo- (**3A y 3B**) y holo-Lfb (**4A y 4B**) tanto en D.O. como en UFC. Se observó que a concentraciones de 2 µM de apo-Lfb las

bacterias crecieron en el mismo orden de magnitud, comparadas con el grupo control. En la concentración de 8  $\mu\text{M}$  de apo-Lfb las bacterias crecieron un 50% menos que el grupo control. Y en los grupos de 16 y 20  $\mu\text{M}$  *M. haemolytica* fue incapaz de crecer. Determinando, a 16  $\mu\text{M}$  de apo-Lfb como la CMI para *M. haemolytica* (es decir la concentración mínima necesaria de apo-Lfb para matar a la bacteria, esto se puede corroborar con la falta de crecimiento de la bacteria en la técnica de cuenta viable). A diferencia de lo observado para apo-Lfb, la Lfb en su forma saturada (holo-Lfb) no modificó el crecimiento de *M. haemolytica* A2 en ninguna de sus concentraciones (**Figura 4A y 4B**).



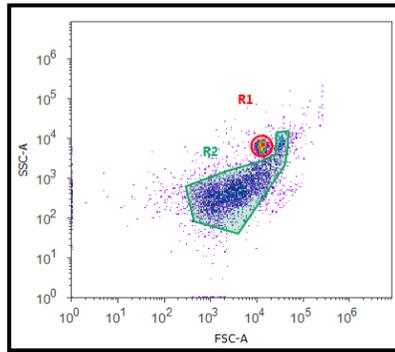
**Figura 3: Efecto de apo-Lfb en el crecimiento de *M. haemolytica* A2.** Se determinó la D.O. (A, 595nm) y conteo de las UFC (B) a diferentes tiempos (3, 6 y 9 h) y concentraciones de apo-Lfb (2-20  $\mu\text{M}$ ) para determinar el número de bacterias vivas en el medio. ST: Sin tratamiento (solo BHI).



**Figura 4: Efecto de holo-Lfb en el crecimiento de *M. haemolytica* A2.** Se determinó la D.O. (A, 595nm) y conteo de las UFC (B) a diferentes tiempos (3, 6 y 9 h) y concentraciones de holo-Lfb (2-20  $\mu\text{M}$ ) para determinar el número de bacterias vivas en el medio. ST: Sin tratamiento (solo BHI).

## Efecto de apo- y holo-Lfb en la secreción de VME de *M. haemolytica* A2

Debido a que se observó una disminución en el crecimiento de la bacteria a partir de concentraciones de 8  $\mu\text{M}$  de apo-Lf, y la falta de crecimiento en la técnica de cuenta viable a partir de la concentración de 16  $\mu\text{M}$ , se escogieron como concentraciones sub-letales un rango de 2 a 8  $\mu\text{M}$  de Lfb para los siguientes ensayos. Se determinó el número relativo de VME mediante tubos Trucount.

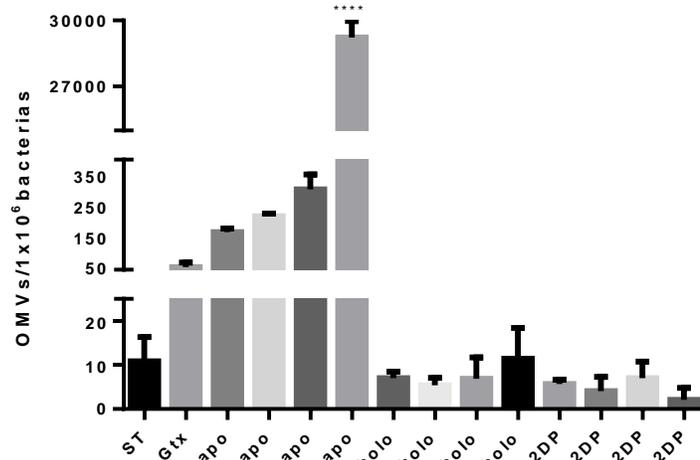


**Figura 5: Dot plot del conteo de VME de *M. haemolytica* A2 mediante tubos Trucount.** R1: Región de perlas del tubo. R2. Región de vesículas.

Se realizó la cuantificación mediante citometría de flujo y el análisis de datos se hizo con el software Attune Cytometric® 2.1.0 (CA, USA, **Figura 5**); ajustadas a las VME por microlitro de muestra, liberadas por un millón de bacterias. Como se observa en la **Figura 6** *M. haemolytica* produce en promedio 15 VME/ $\mu\text{l}$  por cada millón de bacterias, sin ningún estímulo (ST). Concentraciones de 2 a 8  $\mu\text{M}$  de apo-Lfb aumentan el número de VME liberadas de manera dosis dependiente. Se liberan 10 veces más VME con la concentración más baja (2  $\mu\text{M}$ ) y hasta 186 veces más para la concentración más alta (8  $\mu\text{M}$ ), respecto al grupo control. Como control positivo, se utilizó el aminoglucósido gentamicina, que se sabe estimula a algunas bacterias a liberar un mayor número de vesículas. Gentamicina incrementó 3.3 veces el número de vesículas liberadas.

Ya que los grupos que fueron tratados con concentraciones sub-letales (2-8  $\mu\text{M}$ ) de apo-Lfb aumentaron la producción de vesículas, se trató de dilucidar el mecanismo de acción por el cual se observa este efecto. Debido a que el principal mecanismo de acción de apo-Lfb es

la quelación de hierro, se realizó el ensayo, pero con holo-Lfb (saturada de hierro férrico) y con diferentes concentraciones de 2,2'-dipiridil (que es un quelante de hierro). Como muestra la **Figura 6** el tratamiento con holo-Lfb y 2,2'-dipiridil no aumenta la producción de las vesículas, ya que en todos los grupos se cuantificó un promedio similar de VME liberadas, comparadas con el grupo control.



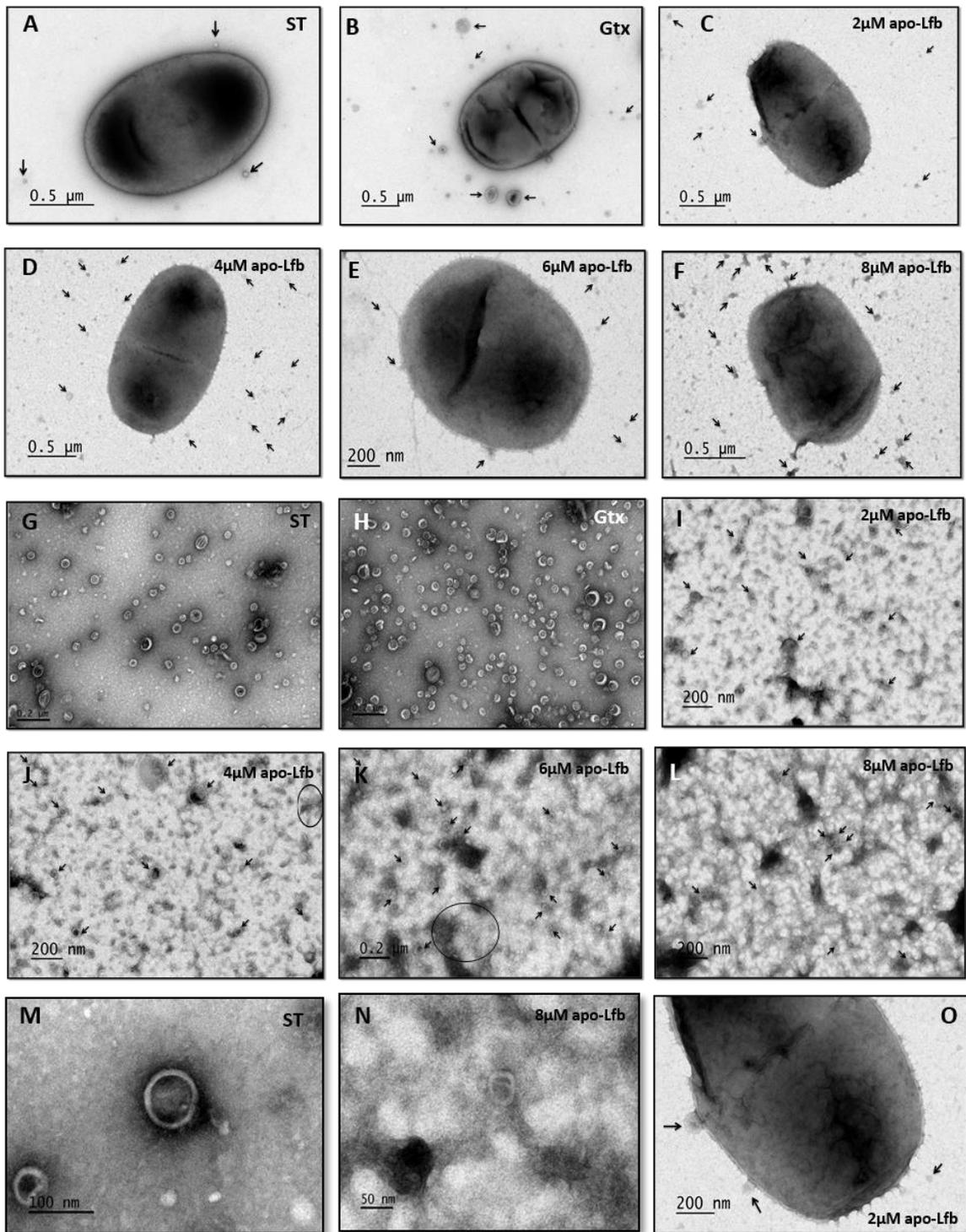
**Figura 6: Efecto apo-, holo-Lfb y 2,2'-dipiridil en la producción de vesículas en *M. haemolytica* A2.** Gráfica que muestra el número absoluto de vesículas contadas mediante tubos Trucount® de los diferentes tratamientos. ST: Sin tratamiento. Concentraciones de apo u holo-Lfb de 2 a 8 μM. Concentraciones de 2,2'-dipiridil (2DP) de 0.10 a 0.25 mM.  $n=5$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

### **Efecto de apo- y holo-Lfb en la estructura de la membrana externa y las VME de *M. haemolytica* A2**

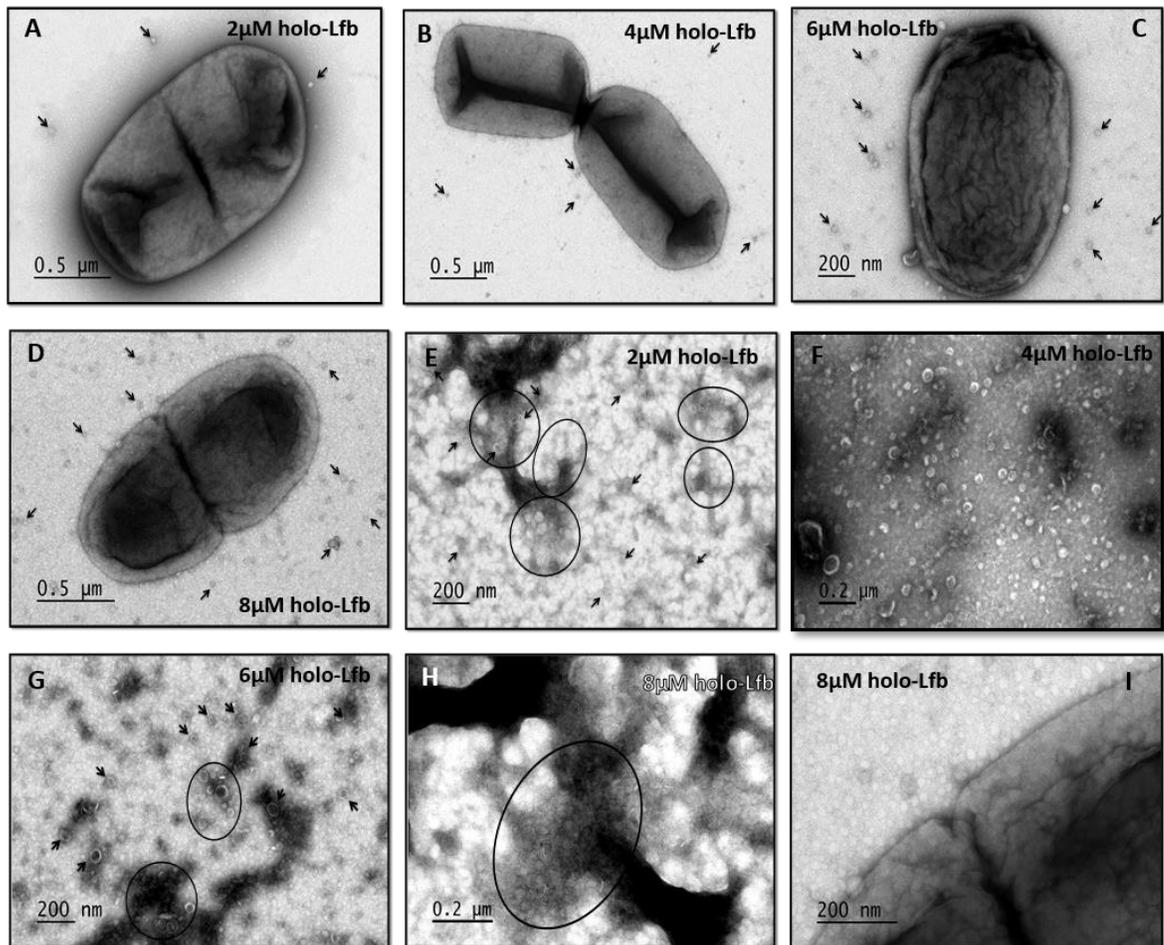
A partir de muestras tomadas a las 4 h de cultivo, se hizo tinción negativa de bacterias completas y sus VME circundantes (**Figura 7A-7F**), así como de VME purificadas (**Figura 7G-7N**) de cultivos de 24 h. Las células crecidas con apo-Lfb presentan una gran cantidad de espículas o pequeñas prolongaciones a lo largo de toda su membrana externa, mientras que esto no se observa en el grupo control (**Figura 7A**) y en el grupo de gentamicina (**Figura 7B**). Incluso al hacer un acercamiento a una de las bacterias (**Figura 7O**), se puede observar con más detalle que el cambio es en la membrana externa. Además, de manera general se observa un aumento evidente (al igual que lo registrado con tubos Trucount) en el número de VME alrededor de la bacteria.

En la **Figura 8A-8D** se observa que holo-Lfb no presenta efecto aparente sobre la ME de la bacteria en ninguna de las concentraciones usadas, ya que no se observó daño a está, incluso al hacer un acercamiento (**Figura 8I**). Sin embargo, se debe mencionar que en estas muestras (crecidas con holo-Lfb) algunos campos mostraron bacterias con las mismas características morfológicas que cuando se usó apo-Lfb (con daño membranal), pero en mucho menor medida (aproximadamente en un 10% del total de las bacterias observadas, datos no mostrados).

Se realizó la purificación de las VME para cada grupo, para observar la morfología de las VME de manera individual. En todos los grupos tratados con apo-Lfb como se observa en la **Figura 7G-7L**, la presencia de dos tipos de VME fue evidente. El 20% de las vesículas presentaron una morfología normal, tamaños homogéneos (100nm), forma redondeada, y presencia de su bicapa lipídica, y el otro 80% se observan tenues, con pérdida de la continuidad normal de su membrana, y con un ligero cambio en su interior haciéndose más radiopacas, como si las VME hubieran perdido parte de su contenido. Por otra parte, las VME de bacterias crecidas en BHI adicionado con diferentes concentraciones de holo-Lfb (**Figura 8E-8H**) mostró que la morfología de ellas no se vio modificada al igual que su membrana externa, ya que las VME a pesar de ser difíciles de observar (por el fondo que ocasionaba la presencia de la Lfb), se mantuvieron con una morfología normal y sin cambios. Es importante mencionar que en general se observó una disminución del tamaño de las vesículas en todos los grupos tratados con holo-Lfb.



**Figura 7: Efecto de apo-Lfb en la membrana de las VME y la membrana externa de *M. haemolytica* A2.** Se cultivaron bacterias en BHI suplementado con diferentes concentraciones de apo-Lfb (2, 4, 6 y 8  $\mu$ M). **Flechas:** VME; **círculos y óvalos:** conjunto de VME. Microscopía electrónica, tinción negativa.

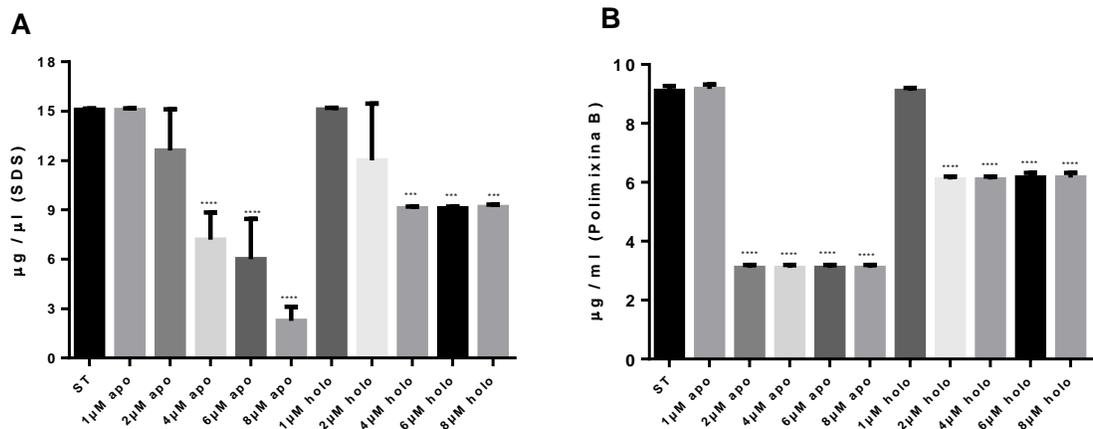


**Figura 8: Efecto de holo-Lfb en la estructura de VME y la membrana externa de *M. haemolytica* A2.** Se cultivaron bacterias en BHI suplementado con diferentes concentraciones de holo-Lfb (2, 4, 6 y 8  $\mu$ M). Flechas: VME; círculos y óvalos: conjunto de VME. Microscopía electrónica, tinción negativa.

### **Efecto de apo- y holo-Lfb en la integridad de la membrana externa de *M. haemolytica* A2**

Con el objetivo de reafirmar la hipótesis de que apo-Lfb se une a componentes de la membrana externa de la bacteria y la daña, se realizó un ensayo de integridad de membrana bacteriana. Apo-Lfb disminuyó la CMI (concentración mínima inhibitoria del compuesto capaz de impedir el crecimiento de la bacteria) de manera dependiente a la concentración usada. Apo-Lfb redujo la MIC de SDS para *M. haemolytica* cinco veces, de 15  $\mu$ g/ $\mu$ l para el grupo control, a 3  $\mu$ g/ $\mu$ l cuando se usó a una concentración de 8  $\mu$ M. De manera similar,

apo-Lfb disminuyó la MIC de polimixina B tres veces, de 9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (control), hasta 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , cuando se agregó a la misma concentración. Este resultado indica que la membrana bacteriana es más permeable a los compuestos externos que están siendo agregados, ya que necesitan una dosis menor para llevar a cabo su efecto bactericida. Holo-Lfb también redujo la CMI tanto de SDS como de polimixina B, pero sólo 1.5 veces, de 15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a 9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para SDS y de 9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a 6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para polimixina B, y este efecto no fue concentración dependiente.

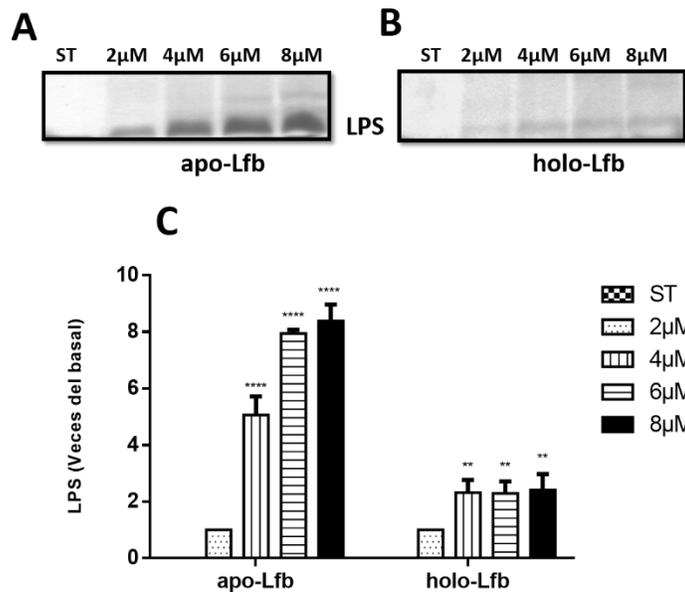


**Figura 9: Efecto de apo- y holo-Lfb en la integridad de membrana de *M. haemolytica* A2.** Se muestra la CMI para SDS (A) y para polimixina B (B) cuando las bacterias son crecidas en BHI suplementado con apo- y holo-Lfb (1-8 $\mu\text{M}$ ). ST: Sin tratamiento, solo BHI. Los MIC de los controles fueron 15 y 9  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para SDS y polimixina B sin Lfb, respectivamente.  $n=3$  \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

### Efecto de apo- y holo-Lfb en el desensamble del LPS de la membrana externa de *M. haemolytica* A2

Debido a la unión de apo-Lf al lípido A del LPS, Lfb puede provocar el desensamble del LPS de la membrana externa y encontrarse libre en el sobrenadante de cultivo. Para determinar si la unión de apo-Lfb provocaba la salida de LPS en *M. haemolytica*, se realizó una tinción de plata específica para LPS en sobrenadantes de cultivo. La tinción de plata mostró que los sobrenadantes de cultivo de las bacterias sin tratamiento no presentaron la banda correspondiente a LPS (lo cual es lo normal debido a que el LPS debe estar anclado a la ME de las bacterias). Contrario a lo observado en los grupos tratados con apo-Lfb (**Figura**

**10A**), donde desde la mínima concentración (2  $\mu$ M) se detecta la presencia de una banda de LPS que aumenta de tamaño y es dependiente de la concentración, aumentando hasta 8 veces para la concentración de 8  $\mu$ M. Esta misma tinción se realizó para bacterias crecidas con holo-Lfb (**Figura 10B**) donde sólo se observó una banda pequeña en todos los grupos y no hubo un aumento proporcional al aumento de holo-Lfb, incrementándose únicamente al doble en las ultimas concentraciones. Todas las bandas se cuantificaron por densitometría y se graficaron (**Figura 10C**).



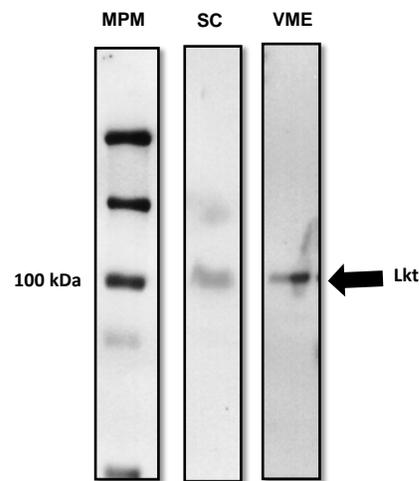
**Figura 10: Efecto de apo- y holo-Lfb en el desensamble del LPS de la membrana externa de *M. haemolytica*.** SDS-PAGE al 12% teñido con tinción de plata específica para LPS. Muestras de bacterias crecidas en BHI suplementado con apo- (A) u holo-Lfb (B), se señala la banda correspondiente a la endotoxina (LPS) y la gráfica correspondiente a la densitometría (C). ST: Sin tratamiento, solo BHI.  $n=3$  \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

### **Efecto de apo- y holo-Lfb en la secreción de Lkt en sobrenadante de cultivo de *M. haemolytica* A2**

Se exploró la posibilidad de que apo-Lfb tuviera un efecto en el principal factor de virulencia de *M. haemolytica* que es la Lkt. Como ya se ha mencionado, la Lkt es secretada de manera libre al medio, aunque por ser un producto de secreción, también podría estar

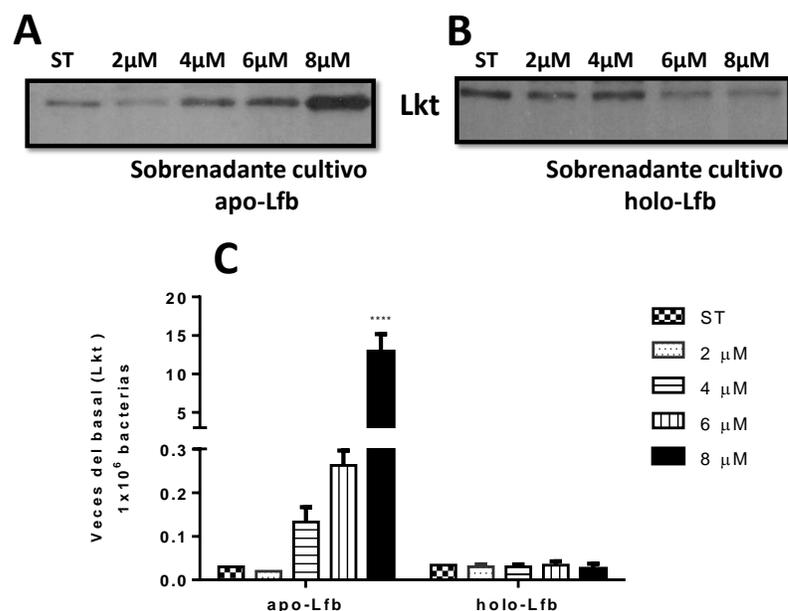
contenida en VME. Con la finalidad de identificar esta proteína en ambas fracciones, se realizaron inmunodetecciones con un anticuerpo anti-Lkt, que se usó para ambas muestras (Biorbyt, USA).

Se estandarizó esta técnica hasta obtener una sola banda correspondiente a la Lkt, como se observa en la **Figura 11**. A la izquierda se observa el estándar de peso molecular, después la inmunotransferencia de las proteínas del sobrenadante de cultivo y finalmente las proteínas de VME, reveladas con el anti-Lkt. Es importante mencionar que estos experimentos se realizaron con bacterias sin ningún tratamiento.



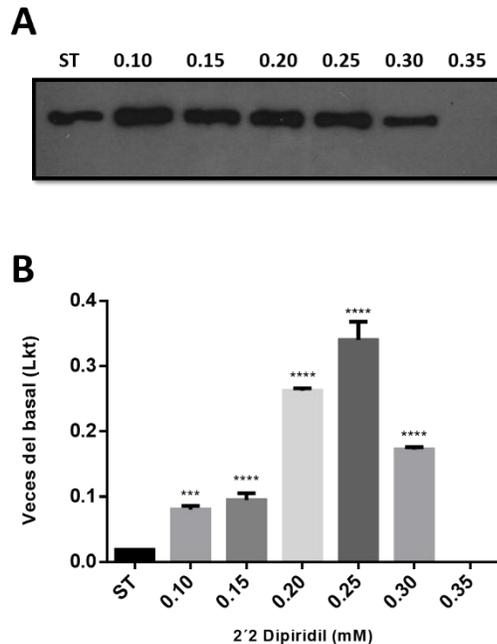
**Figura 11: Detección de la Lkt de *M. haemolytica* A2 en medio de cultivo y en sus VME.** Inmunodetección de Lkt por inmunotransferencia de vesículas (VME) y sobrenadante de cultivo (SC) con un anti-Lkt comercial. MPM: Marcador de peso molecular. Flecha: Lkt.

Se procedió a realizar la detección de la Lkt en cultivos de bacterias tratadas con apo-Lfb a diferentes concentraciones (2-8  $\mu\text{M}$ ). Debido a que cuando se agregaba la Lfb se modificaba la cantidad de proteína total y eso dificultaba el control de la carga total de proteína por carril, este experimento se ajustó a la Lkt secretada por  $1 \times 10^6$  bacterias, que fueron medidas mediante cuenta viable (datos no mostrados). Como se puede observar en la **Figura 12A-12C**, apo-Lfb aumenta la secreción de Lkt en el sobrenadante de cultivo y este efecto es dependiente de la concentración. Observándose, el doble de Lkt cuando se usó la concentración de 4  $\mu\text{M}$  de apo-Lfb, y hasta 15 veces más cuando se agregó la concentración de 8  $\mu\text{M}$ .



**Figura 12: Efecto de apo- y holo-Lfb en la secreción de Lkt en sobrenadante de cultivo.** Inmunotransferencias reveladas con un anti-Lkt. Sobrenadante de cultivo de bacterias crecidas en BHI suplementado con apo- (A) u holo-Lfb (B). Gráfica de la densitometría (C). ST: Sin tratamiento, solo BHI. Experimento ajustado a Lkt secretada por  $1 \times 10^6$  bacterias. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 5$

Para tratar de entender el mecanismo de acción de apo-Lfb en el aumento de la secreción de la Lkt, se hizo el mismo ensayo para holo-Lfb (Figura 12B y 12C). Sin embargo, holo-Lfb no aumento la secreción de la Lkt en el medio en ninguna de sus concentraciones. Además, como se observa en la Figura 13, el tratamiento con 2,2'-dipiridil (usado como control de quelación de hierro), a concentraciones de 0.10-0.25 mM incrementa de manera significativa la secreción de la Lkt en el medio, en un orden de hasta 17 veces más a una concentración de 0.25 mM.

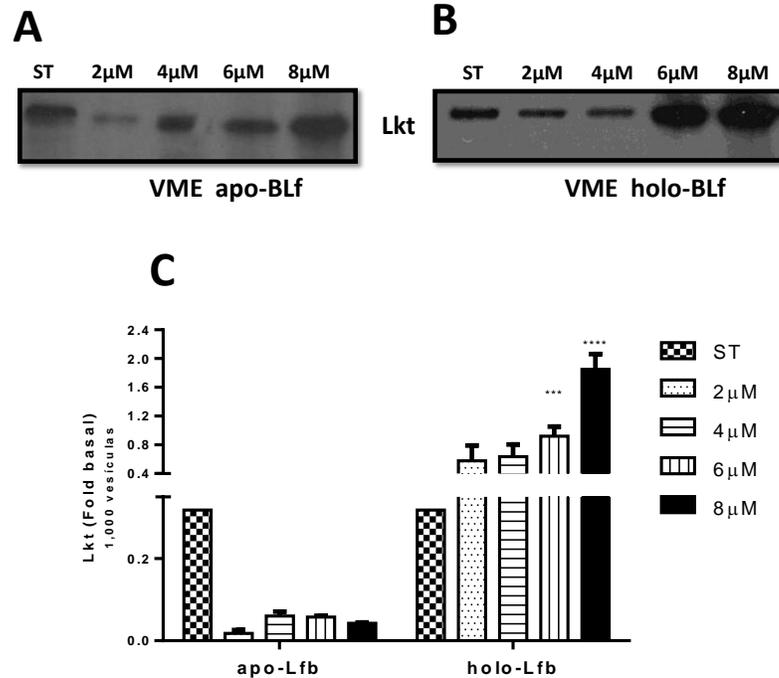


**Figura 13: Efecto de 2,2-dipiridil en la secreción de Lkt en los sobrenadantes de cultivo de *M. haemolytica* A2.** Se cultivaron bacterias en BHI suplementado con 2,2-dipiridil a diferentes concentraciones (0.10-0.35mM). Las inmunotransferencias se revelaron utilizando un anti-Lkt en sobrenadante de cultivo de *M. haemolytica* A2 (A). Gráfica de la densitometría (B). \*\*\*P<0.001, \*\*\*\* P <0,0001, n=3

### **Efecto de apo- y holo-Lfb en la liberación de Lkt contenida en VME de *M. haemolytica* A2**

Se determinó la concentración de Lkt presente en muestras de VME; en este caso los resultados fueron ajustados a la cantidad de Lkt presente en cada 1,000 vesículas. Los resultados (**Figura 14A-14C**) muestran que a pesar de que se observa un aumento en la secreción de Lkt en las muestras suplementadas con apo-Lfb, cuando estos valores se ajustan al número de VME este efecto desaparece. Por lo que se sugiere que el aumento en la secreción de Lkt en vesículas es porque se están liberando más vesículas. Así mismo, se hizo el ensayo para medios suplementados con holo-Lfb (**Figura 14B-14C**) y de igual manera se ajustó al número de VME, en este caso no se observó un aumento de vesículas en el experimento previo cuando se agregó holo-Lfb, por lo cual al momento de evaluar los valores

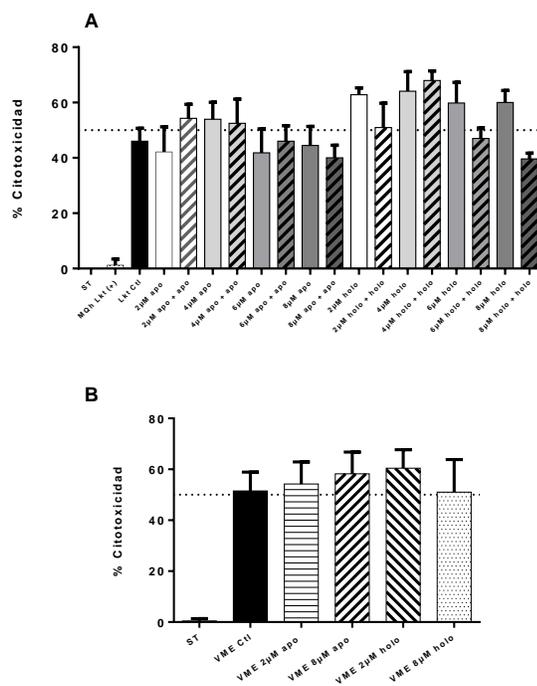
se puede observar un aumento en la secreción de Lkt contenida en VME, de hasta 5 veces en la concentración de 8  $\mu$ M.



**Figura 14: Efecto de apo- y holo-Lfb en la concentración de Lkt en VME liberadas por *M. haemolytica* A2.** Inmunotransferencia de Lkt contenida en VME de bacterias cultivadas en BHI suplementadas con apo- (A) u holo-Lfb (B). Gráfica de la densitometría (ajustado a la liberación de Lkt desde 1,000 OMV) (C). \*\*\* P <0,001, \*\*\*\* P <0,0001, n=3

### Efecto de apo- y holo-Lfb en la citotoxicidad de la Lkt y las VME de *M. haemolytica* A2 sobre macrófagos ovinos.

Con el objetivo de ver si la Lkt secretada en el medio, así como la de las vesículas liberadas cuando la bacteria era crecida en BHI suplementado con apo- u holo-Lfb seguía manteniendo su habilidad citotóxica, se diferenciaron macrófagos ovinos y se pusieron en contacto con la Lkt pura y VME purificadas. Se realizó la determinación de la viabilidad con MTT y se observó que cuando se agregó apo- (Figura 15A) u holo-Lfb (Figura 15B) al medio de crecimiento en todas las concentraciones usadas, la Lkt mantuvo su efecto citotóxico. Lo mismo sucedió con vesículas purificadas, donde estas estructuras también mantuvieron su efecto citotóxico, mostrando un efecto letal 50 similar al del grupo control.



**Figura 15: Efecto de apo- y holo-Lfb en la citotoxicidad de la Lkt y las VME de *M. haemolytica* A2 sobre macrófagos ovinos. (A)** Macrófagos ovinos incubados en RPMI solo más Lkt pura [secretada por bacterias crecidas en BHI solo (**Lkt Ctl**) o con 2, 4, 6 u 8  $\mu$ M de apo- u holo-Lfb (**2-8  $\mu$ M apo/holo**)], o RPMI más 2, 4, 6 u 8  $\mu$ M de apo- u holo-Lfb más Lkt pura [secretada por bacterias crecidas en BHI más 2, 4, 6 y 8  $\mu$ M de apo- u holo-Lfb, (**2-8  $\mu$ M apo/holo + apo/holo**)]. **ST:** Macrófagos ovinos sin tratamiento. **Mqh Lkt (+):** Macrófagos humanos tratados con Lkt pura secretada por bacterias crecidas en BHI solo. **(B)** Macrófagos ovinos incubados en RPMI más VME purificadas [secretadas por bacterias crecidas en BHI solo (**VME Ctl**) o BHI más 2 y 8  $\mu$ M de apo- u holo-Lfb (**VME 2 y 8  $\mu$ M apo/holo**)].

## VIII. Discusión

El aumento de la resistencia de *M. haemolytica* a los antibióticos en todo el mundo ha creado una necesidad urgente de investigar estrategias alternativas novedosas para el tratamiento y prevención de la manheimiosis ovina. Lf es una glicoproteína multifuncional que tiene varias actividades y una de las más estudiadas es como un agente antimicrobiano. En este estudio, se evaluó el efecto de apo- y holo-Lfb sobre el crecimiento de *M. haemolytica* A2. Apo-Lfb mostró un efecto bactericida hacia *M. haemolytica* A2, este resultado concuerda con reportes que se han hecho en otros géneros bacterianos, como *Streptococcus pneumoniae* (León-Sicairos et al., 2014), *Vibrio cholerae* (Acosta-Smith et al., 2018), cepas resistentes a antibióticos de *Helicobacter pylori* (Ciccaglione et al., 2019), *Staphylococcus aureus* y *E.*

*coli* (Flores-Villaseñor et al., 2010), *Pseudomonas fluorescens* en carne molida (del Olmo et al., 2009) y *A. pleuropneumoniae* (Luna-Castro et al., 2014). En contraste, cuando realizamos este ensayo usando BHI suplementado con holo-Lfb, observamos que esta glicoproteína férrica no inhibía el crecimiento de *M. haemolytica* A2, corroborando lo que está descrito en la bibliografía para el serotipo A1, en donde se reporta que holo-Lfb no es bactericida para esta bacteria (Samaniego et al., 2016).

Por otra parte, las VME son estructuras esféricas que se forman a partir de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Las VME encierran una amplia gama de proteínas asociadas a la membrana externa, así como proteínas periplásmicas, algunos componentes citosólicos y fragmentos de DNA, todos ellos tienen funciones biológicas importantes, como respuesta al estrés, detección de quórum sensing, virulencia, etcétera. Muchos de los componentes de las VME pueden representar un mecanismo eficaz de entrega a larga distancia para una amplia gama de efectores/factores de virulencia a las células huésped (Chan et al., 2017). Se ha reportado que el contenido y la producción de VME se ven afectados por las condiciones de crecimiento de las bacterias (Bai et al., 2014; Chan et al., 2017; Fulsundar et al., 2014). Además se sabe que el aminoglucósido gentamicina puede alterar el orden de empaquetado de los lípidos, desestabilizando así la bicapa de la membrana externa, provocando el aumento de la liberación de vesículas por algunas bacterias, como *Pseudomonas aeruginosa* (Kadurugamuwa y Beveridge, 1996).

Debido a que no se ha explorado el efecto de la Lf sobre la liberación de VME en *M. haemolytica*, primero evaluamos el número de VME liberadas cuando las bacterias crecieron en medio BHI suplementado con diferentes concentraciones sub-letales de apo- u holo-Lfb. En este estudio se identificó un aumento en la liberación de VME cuando apo-Lfb fue adicionada al medio, pero no así con holo-Lfb. Dado que apo-Lfb es una proteína quelante de hierro, se usó como un control para determinar el efecto de la quelación de hierro al agente 2'2-dipiridil. Al igual que con holo-Lfb, no hubo cambios en el número de VME cuando las bacterias fueron crecidas con 2'2-dipiridil. Resultados similares fueron reportados por Chan y col. (2017), quienes observaron que las condiciones limitantes de hierro tenían un efecto mínimo sobre el número de VME producidos a partir de aislamientos clínicos de *E. coli*

patógena extraintestinal (ExPEC). Por lo tanto, sugerimos que la falta de hierro en el medio de crecimiento no induce la liberación exacerbada de VME y que el aumento mediado por apo-Lfb en la liberación de vesículas se debe a otro mecanismo de acción, como la unión de apo-Lfb a componentes de la membrana externa bacteriana como PME (Samaniego et al., 2016) o LPS, que produce modificaciones en la estructura de la membrana externa, lo que podría aumentar la liberación de estas vesículas, hipótesis que fue explorada en los siguientes experimentos.

Múltiples informes han descrito el daño causado por Lf a la membrana externa de diferentes especies bacterianas, que también se ha observado es causado por péptidos derivados del N-terminal de la Lf llamados lactoferricinas (Lfcins) (Ellison et al., 1988; León-Sicairos et al., 2014; Yamauchi et al., 1993). En este trabajo evaluamos si el aumento en la producción de VME observado por apo-Lfb se debe al efecto sobre la estructura y la función de la membrana externa. Cuando analizamos las fotografías de microscopia electrónica, observamos daños severos a la membrana externa para todas las concentraciones de apo-Lfb ensayadas y un claro aumento en el número de VME liberadas con también una morfología modificada. Resultados similares se observaron por Yamauchi y col. (1993) cuando usaron el péptido Lfcin, quienes mostraron que *E. coli* O157: H7 expuesta a Lfcin mostró una morfología de la membrana celular alterada que incluía la aparición de “ampollas” en la membrana. León-Sicairos y col. (2014) reportaron que las células de *Streptococcus pneumoniae* que es una bacteria Gram-positiva tratadas con Lfcin mostraron deformación y engrosamiento de la pared celular, así como tabiques engrosados con características irregulares cuando se trataron con una quimera de Lfb [un péptido de fusión entre Lfcin y lactoferrampina (Lfampin), que contiene la región de aminoácidos 265-284], además también se observaron burbujas atípicas y una mayor permeabilidad de la membrana interna. En *E. coli* K12, el tratamiento con Lfcin y Lfampin provoca fractura de la membrana externa de tal manera que se observaron la membrana interna y externa fusionadas y con protuberancias en toda la superficie. En este caso, los autores observaron estructuras similares a vesículas de aproximadamente 50 nm de diámetro en más del 50% de las células (van der Kraan et al., 2005). Tomados en conjunto, estos resultados indican que apo-Lfb y

sus péptidos derivados dañan las membranas bacterianas y afectan su funcionalidad. Como holo-Lfb no mostró afectar la membrana externa de la bacteria, se hizo una investigación con respecto a los efectos de la saturación de hierro de la Lf y su manera de interactuar con las membranas bacterianas. Los resultados de estudios electroforéticos y cristalográficos han indicado que la quelación de hierro de esta molécula altera significativamente la conformación estructural de la proteína, ya que holo-Lf tiene una estructura más cerrada y es más resistente a altas temperaturas y valores de pH que apo-Lf (Andersen et al., 1990; Bezwoda y Mansoor, 1989; Sreedhara et al., 2010). Tal cambio conformacional puede influir en su interacción con las membranas bacterianas. Por lo tanto, sugerimos que debido a este cambio conformacional, holo-Lfb no puede afectar la membrana externa bacteriana igual que apo-Lfb, aunque sí puede unirse a ella, y este mismo fundamento se puede aplicar para ensayos posteriores.

La membrana externa bacteriana tiene una bicapa lipídica asimétrica con moléculas de LPS cargadas negativamente que se localizan principalmente en la parte externa de esa membrana y se estabilizan por la presencia de cationes divalentes (Labischinski et al., 1985). Múltiples observaciones han demostrado que Lf provoca la liberación de LPS, lo que sugiere que Lf tiene actividad de permeabilización de la membrana (Ellison et al., 1988, 1990; León-Sicairos et al., 2014; Yamauchi et al., 1993). Por esta razón, nosotros evaluamos la presencia de LPS en sobrenadantes de cultivo cuando *M. haemolytica* A2 crecía en medio suplementado con apo- u holo-Lfb. La presencia de LPS mediada por apo-Lfb en sobrenadantes de cultivo se produjo de manera dependiente de la concentración, y aunque holo-Lfb también promovió la liberación de LPS, esta salida fue en un grado mucho menor que con apo-Lfb. Además, *M. haemolytica* crecida en presencia de apo-Lfb mostró un valor de CMI menor para SDS y polimixina B, por lo que ambos resultados confirman que apo-Lfb disminuye las funciones de la membrana externa, haciéndola más susceptible a estos compuestos externos. En contraste, holo-Lfb permeabilizó la membrana externa de *M. haemolytica* en menor grado, este resultado fue consistente con nuestros datos anteriores y las imágenes de microscopía electrónica. En conjunto, los resultados de microscopía electrónica y los ensayos de funcionalidad, sugieren que el aumento en la liberación de VME por *M. haemolytica*

cultivados en medio suplementado con apo-Lfb se debe en parte a su capacidad para eliminar cationes divalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Drago-Serrano et al., 2012; Ellison et al., 1990), lo que desestabiliza el LPS anclado a la membrana externa, liberándolo al medio de cultivo e induciendo daños a ésta provocando una mayor permeabilidad celular, lo que finalmente permite que las VME se liberen en mayor cantidad cuando la bacteria es crecida bajo estas condiciones. Este efecto no se observó para holo-Lfb, por que como ya se mencionó, las diferencias en su estructura terciaria no permiten una unión similar a la membrana externa bacteriana de tal manera que no puede dañar en el mismo grado a las células.

La capacidad de los patógenos bacterianos para adaptarse al medio ambiente dentro del huésped es esencial para su virulencia (Litwin y Calderwood, 1993), y se ha demostrado que las señales ambientales influyen en la expresión de genes de virulencia en varios organismos. Los microorganismos se han adaptado a la limitación de hierro en el huésped, mediante la evolución de diversos mecanismos para la asimilación de hierro necesario para su crecimiento. En algunos organismos, la ausencia de hierro conduce a una respuesta a través del aumento en la expresión de toxinas RTX y hemolisinas, que pueden lisar las células del huésped y hacer que liberen sus reservas internas de hierro (Mekalanos, 1992). En este trabajo demostramos que apo-Lfb incrementa la secreción de Lkt en el sobrenadante de cultivo. Además, que la adición del quelante de hierro 2'2-dipiridil también aumenta la secreción de Lkt, lo que indicaría que la secreción de Lkt depende, por lo menos en parte, de la ausencia de hierro en el medio de crecimiento. Marciel y Highlander (2001) reportaron resultados similares y demostraron que en presencia de 2'2-dipiridil, la transcripción del promotor del gen *lkt* de *M. haemolytica* aumentó más de tres veces. Estos autores realizaron un estudio detallado de la regulación transcripcional de este gen mediante el desarrollo de fusiones de operones de cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*) transmitidas por plásmidos y concluyeron que el gen de *lkt* está regulado negativamente por el hierro. Balashova y col. (2006) también demostraron que la secreción de leucotoxina por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, otro miembro de la familia Pasteurellaceae, se incrementa en medio bajo en hierro. *M. haemolytica* es capaz de alcanzar los pulmones, donde el microambiente es bajo en hierro, por lo tanto, como un mecanismo para que esta bacteria obtenga hierro para

su crecimiento, parece razonable que la limitación de hierro conduzca a una mayor producción de Lkt, que destruiría las células del huésped y permitiría la utilización del hierro por la bacteria. Este mecanismo se ha informado en otras especies bacterianas (Mekalanos, 1992).

Sin embargo, otros investigadores (Gentry et al., 1986; Strathdee y Lo, 1989), han informado un efecto positivo del hierro sobre la regulación de la secreción de Lkt en *M. haemolytica*. La diferencia entre estas observaciones y nuestros resultados puede deberse a que apo-Lfb es una proteína multifuncional con otras actividades y no únicamente como un agente bacteriostático como quelante de hierro, sino que también tiene actividad bactericida al poder unirse y dañar la ME bacteriana. Por lo tanto, el efecto quelante de hierro de apo-Lfb puede no ser el único involucrado en la regulación de la secreción de Lkt en *M. haemolytica* A2.

Curiosamente, solo holo-Lfb aumentó el nivel de Lkt presente en las VME. Quizás este resultado se deba a su capacidad para promover la producción de vesículas más pequeñas que las producidas típicamente por *M. haemolytica* A2, muchas de las cuales no se pudieron detectar mediante citometría de flujo. Por lo tanto, es necesario utilizar otros métodos para evaluar con precisión este efecto, como el análisis de rastreo de nano partículas (Tracking analysis).

Aunque este estudio informa las interacciones básicas entre Lfb y algunos componentes de *M. haemolytica* A2 (membrana externa y LPS), así como el efecto sobre algunos factores de virulencia, como Lkt y VME, nuestros resultados pueden ser informativos para futuros estudios sobre el uso de apo-Lfb en el tratamiento de la manheimiosis ovina. En el futuro, podrían realizarse ensayos con animales para determinar las dosis apropiadas de apo-Lfb para su posible uso como adyuvante en el tratamiento de esta enfermedad y evaluar su sinergia con antibióticos.

## IX. Conclusiones

1. Apo-Lfb tiene un efecto bactericida sobre *M. haemolytica* A2, con una CMI de 16  $\mu$ M.
2. Holo-Lfb no afecta el crecimiento de *M. haemolytica* A2.
3. Apo-Lfb promueve la liberación de VME, y este efecto es concentración dependiente.
4. Apo-Lfb induce daño a la membrana externa de *M. haemolytica* A2 y afecta su permeabilidad.
5. Apo-Lfb desensambla el LPS de la membrana externa de *M. haemolytica* A2 y lo libera al sobrenadante de cultivo, de manera concentración dependiente.
6. Apo-Lfb aumenta la secreción de Lkt en el sobrenadante de cultivo, de manera concentración dependiente, a través de su efecto quelante de hierro.
7. La Lkt y las VME secretadas por *M. haemolytica* A2 cultivadas en medio suplementado con apo- u holo-Lfb, mantienen su efecto tóxico hacia macrófagos ovinos.

## X. Perspectivas

1. Determinar el número de vesículas liberadas con holo-Lfb mediante la técnica de análisis de rastreo de nano partículas (Tracking analysis), para medir las vesículas de menor tamaño.
2. Cuantificar la Lkt liberada por la bacteria en VME cuando se agrega holo-Lfb al medio de crecimiento, ajustandola a 1,000 vesículas cuantificadas por rastreo de nano partículas.
3. Cuantificar la concentración de hierro en el medio tratado con apo-Lfb y con 2'2 Dipiridil para correlacionarlos en el ensayo de aumento de la Lkt en sobrenadante de cultivo.
4. Hacer ensayos *in vitro* de sinergia de apo-Lfb con antibióticos para obtener un efecto bactericida en *M. haemolytica* A2.
5. Hacer experimentos *in vivo* con animales para determinar las dosis adecuadas de apo-Lfb como adyuvante en el tratamiento de la mannheimiosis ovina.

## XI. Bibliografía

1. Acosta-Smith, E., Viveros-Jiménez, K., Canizalez-Román, A., Reyes-Lopez, M., Bolscher, J. G. M., Nazmi, K., Flores-Villaseñor, H., Alapizco-Castro, G., de la Garza, M., Martínez-García, J. J., Velazquez-Roman, J., Leon-Sicairos, N. (2018). Bovine Lactoferrin and Lactoferrin-Derived Peptides Inhibit the Growth of *Vibrio cholerae* and Other *Vibrio* species. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2633.
2. Adlerova, L., Bartoskova, A., Faldyna, M. (2008). Lactoferrin: A review. *Veterinárni Medicina*, 53(9), 457–468.
3. Andersen, B. F., Baker, H. M., Morris, G. E., Rumball, S. V., Baker, E. N. (1990). Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrins. *Nature*, 344(6268), 784–787.
4. Appelmelk, B. J., An, Y. Q., Geerts, M., Thijs, B. G., de Boer, H. A., MacLaren, D. M., de Graaff, J., Nuijens, J. H. (1994). Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infection and Immunity*, 62(6), 2628–2632.
5. Baggiolini, M., De Duve, C., Masson, P. L., Heremans, J. F. (1970). Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 131(3), 559–570.
6. Bai, J., Kim, S. I., Ryu, S., Yoon, H. (2014). Identification and characterization of outer membrane vesicle-associated proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, 82(10), 4001–4010.
7. Balashova, N. V., Diaz, R., Balashov, S. V., Crosby, J. A., Kachlany, S. C. (2006). Regulation of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* leukotoxin secretion by iron. *Journal of Bacteriology*, 188(24), 8658–8661.
8. Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.
9. Bezwoda, W. R., Mansoor, N. (1989). Lactoferrin from human breast milk and from neutrophil granulocytes. Comparative studies of isolation, quantitation, characterization and iron binding properties. *Biomedical Chromatography : BMC*, 3(3), 121–126.
10. Brown, J. G., Straus, D. C. (1987). Characterization of neuraminidases produced by various serotypes of group B streptococci. *Infection and Immunity*, 55(1), 1–6.
11. Chan, K. W., Shone, C., Hesp, J. R. (2017). Antibiotics and iron-limiting conditions and their effect on the production and composition of outer membrane vesicles secreted from clinical isolates of extraintestinal pathogenic *E. coli*. *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 11(1–2), 1600091.
12. Chang, Y. F., Young, R., Post, D., Struck, D. K. (1987). Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infection and Immunity*, 55(10), 2348–2354.
13. Ciccaglione, A. F., Di Giulio, M., Di Lodovico, S., Di Campli, E., Cellini, L., Marzio, L. (2019). Bovine lactoferrin enhances the efficacy of levofloxacin-based triple therapy as first-line treatment of *Helicobacter pylori* infection: an *in vitro* and *in vivo* study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(4), 1069–1077.
14. Colín RF, Jaramillo ML, Aguilar F, Trigo J, M. M. (1987). Serotipos de *Pasteurella haemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos de México. *Rev Lati-Am Microbiol*, 29, 231–234.
15. del Olmo, A., Morales, P., Nuñez, M. (2009). Bactericidal activity of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against *Pseudomonas fluorescens* in ground beef

and meat fractions. *Journal of Food Protection*, 72(4), 760–765.

16. Dial, E. J., Hall, L. R., Serna, H., Romero, J. J., Fox, J. G., Lichtenberger, L. M. (1998). Antibiotic properties of bovine lactoferrin on *Helicobacter pylori*. *Digestive Diseases and Sciences*, 43(12), 2750–2756.
17. Dionysius, D. A., Grieve, P. A., Milne, J. M. (1993). Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2597–2600.
18. Drago-Serrano, M. E., de la Garza-Amaya, M., Luna, J. S., Campos-Rodríguez, R. (2012). Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *International Immunopharmacology*, 12(1), 1–9.
19. Ellison, R. T., Giehl, T. J., LaForce, F. M. (1988). Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infection and Immunity*, 56(11), 2774–2781.
20. Ellison, R. T., LaForce, F. M., Giehl, T. J., Boose, D. S., Dunn, B. E. (1990). Lactoferrin and transferrin damage of the gram-negative outer membrane is modulated by  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ . *Journal of General Microbiology*, 136(7), 1437–1446.
21. Flores-Villaseñor, H., Canizalez-Román, A., Reyes-Lopez, M., Nazmi, K., de la Garza, M., Zazueta-Beltrán, J., León-Sicairos, N., Bolscher, J. G. M. (2010). Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *BioMetals*, 23(3), 569–578.
22. Fulsundar, S., Harms, K., Flaten, G. E., Johnsen, P. J., Chopade, B. A., & Nielsen, K. M. (2014). Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(11) 3469–3483.
23. García-Alvarez, A., Fernández-Garayzábal, J. F., Chaves, F., Pinto, C., Cid, D. (2018). Ovine *Mannheimia haemolytica* isolates from lungs with and without pneumonic lesions belong to similar genotypes. *Veterinary Microbiology*, 219, 80–86.
24. Gentry, M. J., Confer, A. W., Weinberg, E. D., Homer, J. T. (1986). Cytotoxin (leukotoxin) production by *Pasteurella haemolytica*: requirement for an iron-containing compound. *American Journal of Veterinary Research*, 47(9), 1919–1923.
25. Gonzalez, R. C., Tenorio, G. V., Trigo, T. F., Reyes, L. M., Leon, S. N., Godinez, V. D., Mireya de la, G. A. (2007). Characterization of Microvesicles of *Mannheimia haemolytica* Serotype A1 (Reference Strain) and Serotype A2 (Field Isolate), 6 (10).
26. Gopinath, R. S., Ambagala, T. C., Deshpande, M. S., Donis, R. O., Srikumaran, S. (2005). *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin binding domain lies within amino acids 1 to 291 of bovine CD18. *Infection and Immunity*, 73(9), 6179–6182.
27. Griffin, D. (1997). Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 13(3), 367–377.
28. Gurung, M., Moon, D. C., Choi, C. W., Lee, J. H., Bae, Y. C., Kim, J., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T., Kim, S. Il, Lee, J. C. (2011). *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PloS One*, 6(11), e27958.
29. Highlander, S. K. (2001). Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (pasteurella) haemolytica*. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 6, 1128–1150.
30. Hilton, W. M. (2014). BRD in 2014: where have we been, where are we now, and where do we want to go? *Animal Health Research Reviews*, 15(2), 120–122.
31. Hsuan, S. L., Kannan, M. S., Jeyaseelan, S., Prakash, Y. S., Malazdrewich, C., Abrahamsen, M. S., Sieck, G. C., Maheswaran, S. K. (1999). *Pasteurella haemolytica* leukotoxin and endotoxin induced cytokine gene expression in bovine alveolar macrophages requires NF-kappaB

- activation and calcium elevation. *Microbial Pathogenesis*, 26(5), 263–273.
32. Iovane, G., Galdiero, M., Vitiello, M., Martino, L. (2006). Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins on bovine neutrophils. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 20(1), 29–36.
  33. Jameson, Anderson, Norris, Thomas, Baker. (1999). Structure of human apolactoferrin at 2.0 Å resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change. addendum. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 55(5), 1108.
  34. Jaramillo-Arando, C. J., Trigo-Tavera, F. J., Suárez-Güemes, F. (2009). Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *Veterinaria México*, 40(3), 293–314.
  35. Jaramillo, L., Díaz, F., Hernández, P., Debray, H., Trigo, F., Mendoza, G., Zenteno, E. (2000). Purification and Characterization of an Adhesin From *Pasteurella Haemolytica* - PubMed. *Glycobiology*, 10(1), 31–37.
  36. Jaramillo ML, Zenteno E, T. F. (1999). Mecanismos de patogenicidad y adherencia de *Pasteurella haemolytica*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41, 105–116.
  37. Jeyaseelan, S., Sreevatsan, S., Maheswaran, S. K. (2002). Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 3(2), 69–82.
  38. Kadurugamuwa, J. L., Beveridge, T. J. (1996). Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 178(10), 2767–2774.
  39. Kehrenberg, C., Schulze-Tanzil, G., Martel, J. L., Chaslus-Dancla, E., Schwarz, S. (2001). Antimicrobial resistance in *pasteurella* and *mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Veterinary Research*, 32(3–4), 323–339.
  40. Kirkpatrick, C. H., Green, I., Rich, R. R., Schade, A. L. (1971). Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 124(6), 539–544.
  41. Kuehn, M. J., Kesty, N. C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & Development*, 19(22), 2645–2655.
  42. Labischinski, H., Barnickel, G., Bradaczek, H., Naumann, D., Rietschel, E. T., Giesbrecht, P. (1985). High state of order of isolated bacterial lipopolysaccharide and its possible contribution to the permeation barrier property of the outer membrane. *Journal of Bacteriology*, 162(1), 9–20.
  43. León-Sicairos, N., Angulo-Zamudio, U. A., Vidal, J. E., López-Torres, C. A., Bolscher, J. G. M., Nazmi, K., Reyes-Cortés, R., Reyes-López, M., de la Garza, M., Canizalez-Román, A. (2014). Bactericidal effect of bovine lactoferrin and synthetic peptide lactoferrin chimera in *Streptococcus pneumoniae* and the decrease in luxS gene expression by lactoferrin. *BioMetals*, 27(5), 969–980.
  44. Li, J., Clinkenbeard, K. D. (1999). Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infection and Immunity*, 67(6), 2920–2927.
  45. Linhartová, I., Bumba, L., Mašín, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., Hejnová-Holubová, J., Sadílková, L., Morová, J., Šebo, P. (2010). RTX proteins: A highly diverse family secreted by a common mechanism. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 34, Issue 6, pp. 1076–1112).
  46. Litwin, C. M., Calderwood, S. B. (1993). Role of iron in regulation of virulence genes. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(2), 137–149.
  47. Lo, R. Y. C., Sorensen, L. S. (2007). The Outer membrane protein OmpA of *Mannheimia*

- haemolytica* A1 is involved in the binding of fibronectin. *FEMS Microbiology Letters*, 274(2), 226–231.
48. Luna-Castro, S., Aguilar-Romero, F., Samaniego-Barrón, L., Godínez-Vargas, D., De La Garza, M. (2014). Effect of bovine apo-lactoferrin on the growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BioMetals*, 27(5), 891–903.
  49. Manning, A. J., Kuehn, M. J. (2013). Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 23(1–2), 131–141.
  50. Marciel, A. M., Highlander, S. K. (2001). Use of operon fusions in *Mannheimia haemolytica* to identify environmental and cis-acting regulators of leukotoxin transcription. *Infection and Immunity*, 69(10), 6231–6239.
  51. McClenahan, D., Hellenbrand, K., Atapattu, D., Aulik, N., Carlton, D., Kapur, A., Czuprynski, C. (2008). Effects of lipopolysaccharide and *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on bovine lung microvascular endothelial cells and alveolar epithelial cells. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 15(2), 338–347.
  52. Mekalanos, J. J. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 174(1), 1–7.
  53. Morck, D. W., Raybould, T. J., Acres, S. D., Babiuk, L. A., Nelligan, J., Costerton, J. W. (1987). Electron microscopic description of glycocalyx and fimbriae on the surface of *Pasteurella haemolytica*-A1. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire*, 51(1), 83–88.
  54. Nardini, P. M., Mellors, A., Lo, R. Y. C. (1998). Characterization of a fourth lipoprotein from *Pasteurella haemolytica* A1 and its homology to the OmpA family of outer membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 165(1), 71–77.
  55. Ogunnariwo, J A, Schryvers, A. B. (1990). Iron acquisition in *Pasteurella haemolytica*: expression and identification of a bovine-specific transferrin receptor. *Infection and Immunity*, 58(7), 2091–2097.
  56. Ogunnariwo, Julius A., Woo, T. K. W., Lo, R. Y. C., Gonzalez, G. C., Schryvers, A. B. (1997). Characterization of the *Pasteurella haemolytica* transferrin receptor genes and the recombinant receptor proteins. *Microbial Pathogenesis*, 23(5), 273–284.
  57. Pijoan AP, Chávez, D. J. A. (2003). Cost of pneumonia in dairy calves lodged under two housing systems. *Vet. Méx*, 34(4), 333–342.
  58. Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., Dec, M., Wernicki, A. (2013). An electrophoretic characterization of iron-transporting proteins in *Mannheimia haemolytica* A1. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16(3), 527–532.
  59. Puente-Polledo, L., Reglero, A., González-Clemente, C., Rodríguez-Aparicio, L. B., Ferrero, M. A. (1998). Biochemical conditions for the production of polysialic acid by *Pasteurella haemolytica* A2. *Glycoconjugate Journal*, 15(9), 855–861.
  60. Qiu, J., Hendrixson, D. R., Baker, E. N., Murphy, T. F., St Geme, J. W., Plaut, A. G. (1998). Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by *Haemophilus influenzae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12641–12646.
  61. Rado TA, Bollekens J, St Laurent G, Parker L, Benz EJ Jr. Lactoferrin biosynthesis during granulocytopenia. *Blood*. 1984; 64(5):1103-1109.
  62. Ramírez, R. G., Martínez, C. M., González, R. C., Luna, C. S., de la Garza, M. (2017). *Mannheimia haemolytica* A2 secretes different proteases into the culture medium and in

- outer membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis*, 113, 276–281.
63. Ratledge, C., Dover, L. G. (2000). Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 881–941.
  64. Reyes R.E., Manjarrez H.H.A, D. S. M. (2005). El hierro y la virulencia bacteriana. *Enf. Inf. Microbiol.*, 25, 104–107.
  65. Río González, M. L. del. (2004). Sistemas de captacion de hierro en *Haemophilus parasuis*. *Tesis Doctoral*, 1.
  66. Rivera, J., Cordero, R. J. B., Nakouzi, A. S., Frases, S., Nicola, A., Casadevall, A. (2010). *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(44), 19002–19007.
  67. Rogan, M. P., Taggart, C. C., Greene, C. M., Murphy, P. G., O’Neill, S. J., McElvaney, N. G. (2004). Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(7), 1245–1253.
  68. Sallmann, F. R., Baveye-Descamps, S., Pattus, F., Salmon, V., Branza, N., Spik, G., Legrand, D. (1999). Porins OmpC and PhoE of *Escherichia coli* as specific cell-surface targets of human lactoferrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(23), 16107–16114.
  69. Samaniego, B. L., Luna, C. S., Piña, V. C., Suárez, G. F., De La Garza, M. (2016). Two outer membrane proteins are bovine lactoferrin-binding proteins in *Mannheimia haemolytica* A1. *Veterinary Research*, 47(1), 93.
  70. Sleim, R. (2005). Review: Major pathogenic components of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolated from animal origin. *El Cairo, Egypt: Bacteriology Department, Animal*. <http://priory.com/vet/pasteurella.htm>
  71. Squire, P. G., Smiley, D. W., Croskell, R. B. (1984). Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infection and Immunity*, 45(3), 667–673.
  72. Sreedhara, A., Flengsrud, R., Langsrud, T., Kaul, P., Prakash, V., Vegarud, G. E. (2010). Structural characteristic, pH and thermal stabilities of apo and holo forms of caprine and bovine lactoferrins. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 23(6), 1159–1170.
  73. Strathdee, C. A., Lo, R. Y. (1989). Regulation of expression of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. *Journal of Bacteriology*, 171(11), 5955–5962.
  74. Sun, Y., Clinkenbeard, K. D., Ownby, C. L., Cudd, L., Clarke, C. R., Highlander, S. K. (2000). Ultrastructural characterization of apoptosis in bovine lymphocytes exposed to *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *American Journal of Veterinary Research*, 61(1), 51–56.
  75. Tauro, P., Kapoor, K. K., Yadav, K. S. (1986). *An Introduction to Microbiology*. New Age International.
  76. Trigo, F. J. (1987). El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Cien Vet*, 4, 1–36.
  77. USDA. (2011). Feedlot 2011: Part IV: Health and Health Management on US. Feedlots with a Capacity of 1000 or More Head. Fort Collins, CO: USDA–APHIS–VS–CEAH–NAHMS.
  78. van der Kraan, M. I. A., van Marle, J., Nazmi, K., Groenink, J., van ’t Hof, W., Veerman, E. C. I., Bolscher, J. G. M., Nieuw Amerongen, A. V. (2005). Ultrastructural effects of antimicrobial peptides from bovine lactoferrin on the membranes of *Candida albicans* and *Escherichia coli*. *Peptides*, 26(9), 1537–1542.
  79. Wang, B., Timilsena, Y. P., Blanch, E., Adhikari, B. (2019). Lactoferrin: Structure, function,

denaturation and digestion. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 59, Issue 4, pp. 580–596). Taylor and Francis Inc.

80. Watts, J. L., Yancey, R. J., Salmon, S. A., Case, C. A. (1994). A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(3), 725–731.
81. Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. J., Ellison, R. T., 3rd. (1993). Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infection and Immunity*, 61(2), 719–728.
82. Zecchinon, L., Fett, T., Desmecht, D. (2005). How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Veterinary Research*, 36(2), 133–156.