



Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de estudios superiores Iztacala.
Carrera de Biología.



**Aislamiento y caracterización de una fracción enriquecida que
contiene una proteasa secretada por *Mannheimia haemolytica***

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Verónica Rosales Islas

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Erasmo Negrete Abascal.

SINODALES

Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez

Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras

Dr. Eric Monroy Pérez

Mtro. Juan Fernando Montes García

Tlalnepantla Estado de México. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Genética de la U.M.F. de la
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, U.N.A.M. y fue financiado por el
proyecto DGAPA-UNAM PAPIIT IN204122**

Dedicatoria

Dedico este trabajo a las personas que me han brindado su apoyo, tiempo y cariño y sobretodo que han creído en mí, las palabras no me alcanzan para expresar lo agradecida que estoy con todos, les amo.

A mi madre Claudia Islas Ángeles, por siempre preocuparte por mi, por apoyarme, protegerme y amarme. Por tantos sacrificios que se que has hecho por mi y por cada día levantarte y hacer hasta lo imposible porque a nuestra familia nunca le falte nada, te lo agradezco desde el fondo de mi corazón.

A mi padre Miguel Ángel Rosales Hernández por escucharme cuando pasaba por momentos difíciles, pero también para compartir lo que me hace feliz. Gracias por tu apoyo a lo largo de toda mi vida y tu comprensión cuando la necesitaba.

A mi abuela, María Luisa Ángeles Robles por haberme educado y dedicarme tu tiempo, por todas las ricas comidas que preparas y que alegran mi día. Gracias por aceptarme y amarme como soy, tus palabras de aliento cada día me dan fuerzas para salir adelante.

Al amor de mi vida, mi novia Mayra Allende Ríos, por todo el apoyo y cariño que me has dado a lo largo de estos 3 años, por creer en mí cuando incluso yo dejaba de hacerlo, me siento muy afortunada de tenerte en mi vida. Gracias por elegirme cada día, por ser mi lugar seguro y siempre estar ahí cuando lo necesito, en las buenas y en las malas. Atesoro todos los lindos momentos que hemos pasado juntas y que estoy segura, que habrán muchos más. Porque no sabes cuanto deseo un futuro a tu lado y la ilusión que tengo de que un día seas mi esposa.

A mi mejor amigo, Gerardo Antonio Ramírez Paz y Puente (Alias: "Monsieur Hood") por todo tu apoyo no solo en el desarrollo de este trabajo, si no a lo largo de toda la carrera, te agradezco por todas tus enseñanzas, y por las experiencias que hemos compartido. Gracias por siempre darme ánimos cuando lo he necesitado.

Agradecimientos

Así mismo, quiero agradecer a las personas que me han apoyado y acompañado a lo largo de mi formación.

A mi hermana Vanessa Michelle Rosales Islas por todos los buenos recuerdos que tenemos juntas y que quisiera volver a vivir.

A mi tía Guadalupe Islas Ángeles y mi prima Sofía Valeria por que se que siempre cuento con su apoyo y cariño.

Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, Edgar Espinoza Bucio (Alias: "Doris, la hermanastra mas fea") y Michelle Rosales Reséndiz (Alias: "Lord Faarcuad/ Rapunzel" por todas las risas y buenos momentos en el laboratorio.

A mis amigos que me acompañaron toda la carrera: Gladis Espíritu Gómez por ser mi mejor amiga y mi apoyo a lo largo de toda la carrera, Aranza Escalante Vega, la ornitológica más genial por siempre contagiarme tu sonrisa y a Carlos Ignacio Chávez Flores, por las sesiones de estudio que terminaban en risas. Los admiro y amo a cada uno de ustedes, estoy orgullosa de lo que han logrado.

También quisiera agradecer a mis amigos: Anuar Salomón González por todas las partidas de Xbox que alegraban las tardes de pandemia, a Carolina Figueroa por esas platicas que duran horas y a Pamela Herrera por que se que siempre podre contar contigo.

A mis mascotas, mi gatita Nala, quien es casi tan bióloga como yo por acompañarme en cada clase que tenía por zoom y a mis perros Lucky, Rayita y Kuro por alegrarme siempre que llego a casa.

Finalmente, quiero agradecer al Doctor Erasmo Negrete Abascal por todas sus enseñanzas, por el tiempo que ha dedicado a este trabajo y por el apoyo que me ha dado desde que inicié este proyecto.

Índice

1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	9
2.1 <i>Mannheimia haemolytica</i>	9
2.2 Factores de virulencia.....	10
2.3 Proteasas	12
3. Antecedentes	14
4. Hipótesis	15
5. Justificación	15
6. Objetivos	15
7. Metodología	16
7.1 Cultivo Bacteriano	16
7.2 Obtención de proteínas secretadas	16
7.3 Zimograma	16
7.4 Columna DEAE- celulosa	17
7.5 Separación de proteínas por medio de amicón.	17
7.6 Columna de afinidad con fibrinógeno	17
7.8 Efecto de inhibidores de proteasas	18
7.9 Efecto del pH en la actividad proteolítica	19
7.10 Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica	19
7.11 Degradación de sustratos	20
7.12 Reconocimiento inmune	20
8. Resultados	22
8.1 Obtención de la proteasa	22
8.2 Caracterización de la proteasa	26

8.2.1 Efecto de Inhibidores de proteasas	27
8.2.2 Efecto de pH en la actividad proteolítica	28
8.2.3 Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica	29
8.2.4 Degradación de sustratos	30
8.2.5 Reconocimiento inmune.	32
9. Discusión	34
10. Conclusiones	37
11. Perspectivas	37
12. Bibliografía	38

Listado de figuras

Figura 1. Patrón de proteínas secretadas y actividad proteolítica de proteínas de <i>Mannheimia haemolytica</i>	22
Figura 2. Patrón de proteínas y actividad proteolítica de las muestras separadas por columna DEAE-celulosa.....	23
Figura 3. Patrón de proteínas y actividad proteolítica de muestras separadas por amicón.....	25
Figura 4. Actividad proteolítica de muestras separadas por columna de afinidad con fibrinógeno.....	26
Figura 5. Efecto del calcio en la actividad proteolítica.....	27
Figura 6. Actividad proteolítica en presencia de diferentes inhibidores de proteasas en zimogramas.....	28
Figura 7. Efecto del pH en la actividad proteolítica.....	29
Figura 8. Efecto de temperatura en la actividad proteolítica.....	30
Figura 9. Degradación de sustratos (IgG y fibrinógeno nativas).....	31

Figura 10. Degradación de sustratos (IgG y fibrinógeno desnaturalizados).....32

Figura 11. Reconocimiento inmune.....33

Resumen:

Mannheimia haemolytica es un agente oportunista del tracto respiratorio de bovinos causante de pleuroneumonía fibrinosa, enfermedad también conocida como fiebre de embarque, ya que suele presentarse cuando el rumiante se encuentra en estrés o bajo condiciones que comprometan sus defensas; esta afectación provoca importantes pérdidas económicas a la industria ganadera. Este microorganismo posee mecanismos para colonizar superficies mucosas y con ello, aumentar la interacción bacteria-huésped mediante sus mecanismos de virulencia, entre ellos, las proteasas, por lo que la caracterización de una proteasa podría contribuir al entendimiento de la patogénesis de *M. haemolytica*.

En el presente trabajo, a partir de cultivos de 24h, se obtuvieron proteínas secretadas, las que se concentraron por precipitación con metanol. Estas proteínas fueron separadas con ayuda de una columna de DEAE-celulosa, y posteriormente con ayuda de un sistema de filtración por peso molecular (amicón) Por medio de estos procedimientos se logró obtener una actividad proteolítica secretada de un peso de 75 kDa, la cual fue inhibida por PMSF, indicando que se trata de una serín proteasa. Esta actividad proteolítica fue capaz de degradar fibrinógeno y gelatina porcina, pero no IgG, caseína, hemoglobina y albúmina bovinas, lo que indica que es una proteasa específica. Esta proteasa es activa en un rango de pH de 6 a 10, con pH óptimo de 9 y estable a temperaturas hasta los 50 °C, una banda de reconocimiento inmune de alrededor de 75 kDa fue observada al usar suero de bovinos con neumonía crónica y aguda, sugiriendo su expresión in vivo, pero no por sueros α -proteasa de *A. seminis* o *A. pleuropneumoniae*, lo que podría indicar que es una proteasa diferente.

M. haemolytica secreta proteasas que podrían jugar un papel importante en la patogenicidad y virulencia de la bacteria y que podrían favorecer la invasión del tracto respiratorio de los rumiantes mediante la degradación del fibrinógeno.

Introducción

Mannheimia haemolytica

Mannheimia haemolytica es una bacteria β -hemolítica, Gram-negativa, encapsulada, no móvil, de forma cocobacilar o bacilo pequeño pleomórfico (1 a 3 μm de diámetro), mesofílica, aerobia y anaerobia facultativa, oxidasa positiva e indol–negativa; fermenta glucosa y otros carbohidratos, anteriormente conocida como *Pasteurella haemolytica*. *M. haemolytica* (Confer & Ayalew, 2018), se clasifica en 12 serotipos capsulares basados en las asignaciones de *P. haemolytica* originales de A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16, y A17. Los serotipos A1 y A2 son conocidos por colonizar el tracto respiratorio superior de los bovinos y ovinos, respectivamente.

M. haemolytica se aísla normalmente de procesos neumónicos en bovinos y ovinos, y también de procesos septicémicos en borregos y de mastitis en ovejas. Por lo que es un habitante normal de las criptas de las tonsilas del bovino sano como organismo comensal, mantiene una relación simbiótica con su huésped; sin embargo, es un importante agente oportunista del tracto respiratorio, debido a que usualmente coloniza la parte alta de éste, por lo tanto, tiene como consecuencia una reducción en la producción y con ello, le cuesta a la industria ganadera de EE. UU. aproximadamente \$1 mil millones por año (Jesse *et al.*, 2019).

Cuando un alto número de células de *M. haemolytica* está presente en la mucosa nasal de los terneros, la bacteria es inhalada hacia los pulmones, lo que, bajo condiciones de inmunosupresión del huésped, afecta sus mecanismos de defensa, permitiendo que la bacteria se establezca y se multiplique rápidamente, penetre a los

pulmones durante la inhalación e inicie una infección activa del epitelio alveolar (Snyder & Credille, 2020).

M. haemolytica ha sido asociada con poliserositis fibrinosa aguda (FPS), la cual es hematogena en terneros, y con pleuroneumonía fibrinosa aguda (FPP) que es respiratoria en vacas lecheras. Por lo que, esta bacteria puede actuar como un patógeno primario que causa ambas presentaciones de la enfermedad.

Factores de virulencia

Diversos factores de virulencia que posee *M. haemolytica* promueven la colonización pulmonar y la evasión de la respuesta inmunitaria del huésped; por lo tanto, el estado inmunitario del huésped es fundamental para contrarrestar estas estrategias. Cuando la respuesta inmune del huésped no tiene éxito, estas interacciones contribuyen al desarrollo de la fiebre de embarque. Varios factores de virulencia de *M. haemolytica* promueven la interacción huésped-patógeno e influyen en el resultado de la infección. De éstos, la leucotoxina (LKT) y el lipopolisacárido (LPS) son importantes en la patogenia de la fiebre de embarque. Otros factores de virulencia con funciones patogénicas menos definidas son la cápsula, las adhesinas, las proteínas de la membrana externa y varias proteasas (Rice *et al.*, 2007).

LKT es una exotoxina, que produce un efecto tóxico primario en contra de los leucocitos, en particular los leucocitos de rumiantes, especialmente las células polimorfonucleares (Singh *et al.*, 2010).

El lipopolisacárido LPS juega un papel fundamental en la patogenia de la fiebre de embarque. La evidencia actual indica que el LPS contribuye a las lesiones pulmonares

a través de una variedad de mecanismos complejos, que incluyen la estimulación de los leucocitos para producir citocinas proinflamatorias, la activación de la cascada del complemento y de la coagulación y la citólisis celular directa. Su toxicidad puede aumentar al formar un complejo con los fosfolípidos en el surfactante pulmonar, lo que permite que el LPS persista en el pulmón e inicie la inflamación (Narasinakup *et al.*, 2020).

La cápsula de *M. haemolytica* puede estar involucrada en la colonización del pulmón al promover la adherencia bacteriana al epitelio respiratorio. La presencia de la cápsula reduce la fagocitosis por los leucocitos, así como la lisis de la bacteria mediada por el complemento (Singh *et al.*, 2010). Las adhesinas son necesarias para la colonización inicial y el establecimiento en la nasofaringe por adherencia a la superficie epitelial. Esta unión debe proporcionar resistencia a la eliminación física por flujo de aire y depuración mucociliar (Lo, 2001).

Por otra parte, la biopelícula de *Mannheimia haemolytica* puede aumentar la resistencia a antibióticos y mecanismos inmunes del hospedero, además de favorecer la adhesión de las bacterias (Boukahil *et al.* 2016).

Otro factor de virulencia son las proteínas de membrana externa (PME), varias de éstas son proteínas reguladas por hierro, como Transferrin binding protein (Tbp 1 y 2), y son fisiológica y patológicamente relevantes porque están involucradas en la adquisición de hierro. Las PME son agentes quimiotácticos para los neutrófilos e inhiben sus mecanismos fagocíticos y posteriores de destrucción bacteriana. favoreciendo así la colonización pulmonar bacteriana (Singh *et al.*, 2010). Por su parte, las proteasas facilitan la colonización de nichos y su expresión puede aumentar

como respuesta al estrés, esto debido a hormonas como la epinefrina y la norepinefrina (Boyanova, 2017).

Proteasas

Las proteasas se clasifican en función de la naturaleza química del sitio activo, la reacción que catalizan, su estructura y su composición. En base a la posición en que actúan, Se clasifican principalmente en endoproteasas y exoproteasas.

Las exoproteasas actúan al final de la cadena polipeptídica, las cuales se clasifican en aminopeptidasas, que actúan en el extremo N libre del sustrato polipeptídico y carboxipeptidasas que actúan en el extremo C-terminal libre de la cadena polipeptídica (Hamza, *et al.* 2017).

Las endoproteasas, por otra parte, actúan en la región interna de la cadena polipeptídica, del mismo modo, estas se clasifican en función del grupo funcional presente en sitio activo característico.

- I. serín proteasas: Las serín proteasas son proteasas que tienen un grupo serina (-OH) en su sitio activo.
- II. Cisteína proteasas: La actividad de estas depende de la presencia de un grupo SH intacto en su sitio activo.
- III. Metaloproteasas: Estas dependen de la presencia de cationes divalentes unidos menos fuertemente para su actividad.

IV. Proteasas aspárticas: Las proteasas ácidas contienen uno o más grupos carboxilo de cadena lateral en su sitio activo.

Las proteasas se clasifican según su actividad máxima en un rango de pH particular como:

- 1) Proteasas ácidas. Activas en los rangos de pH de 2-6.
- 2) Proteasas neutras. Activas a pH neutro, débilmente alcalino o ácido.
- 3) Proteasas alcalinas. Activos en rangos de pH 8-14 (Jisha, *et al.* 2013).

Estas enzimas tienen la función de catalizar la degradación de proteínas al hidrolizar los enlaces peptídicos, en las células cumplen diversas funciones a nivel celular, desde realizar procesos generales de digestión de las proteínas de la dieta hasta funciones esenciales en procesos como la ovulación, la fertilización, la remodelación ósea, la migración celular, la inflamación, la angiogénesis y la apoptosis (Aggarwal & Sloane, 2014).

Como consecuencia de las diversas funciones que pueden llegar a tener y niveles en los que actúan, las proteasas tienen una alta influencia en procesos de vital importancia como la proliferación y diferenciación celular, homeostasis y apoptosis celular, entre otros. Particularmente, diversos microorganismos infecciosos, como los patógenos oportunistas, producen y secretan proteasas como factores de virulencia que les facilitan la colonización de diferentes nichos (Fullana, 2014). *M. haemolytica* puede producir actividades proteolíticas que son secretadas al medio, a su vez que son liberados en las vesículas de la membrana externa. Esta estrategia puede jugar

un papel importante durante la colonización e invasión de los tejidos del huésped (Ramírez Rico *et al.*, 2017).

Antecedentes

Ramirez-Rico en el 2017 y colaboradores observaron que las vesículas de membrana de *M. haemolytica* mostraron patrones proteolíticos y proteicos diferentes a los observados en los sobrenadantes de cultivo, a su vez, lograron aislar una proteasa de 100 kDa que presenta una reacción cruzada con una metaloproteasa dependiente de Zn de *A. pleuropneumoniae*.

Ayalew y sus colaboradores en 2019 identificaron una proteasa IgA en el sobrenadante de cultivo de *M. haemolytica*, a su vez, observaron que la bacteria produce dos proteasas IgA como protectores potenciales de las bacterias contra la inmunidad de las mucosas.

Cruz-Montoya y colaboradores en el 2023 caracterizaron una metaloproteasa secretada por *A. seminis*, la cual degrada IgG y fibrinógeno de bovino. Esta enzima presentó una actividad óptima a pH de 6-7 y fue inhibida por EDTA a una concentración de 30mM. La actividad proteolítica es estable hasta 50°C, es inhibida a temperaturas superiores.

A su vez, existen bacterias que pueden expresar distintos factores de virulencia, entre ellos varias proteasas, Gadino y sus colaboradores en 2017 describieron distintas proteasas en *Pseudomonas aeruginosa*, como lo son Elastasa B, Elastasa A, proteasa alcalina, proteasa IV, exoproteasa larga A, Muc D y aminopeptidasa.

Hipótesis

Distintos microorganismos patógenos como lo son *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *A. pleuropneumoniae*, *G. anatis*, y *A. seminis*, expresan factores de virulencia como lo son distintos tipos de proteasas, por lo que *M. haemolytica* puede expresar proteasas no caracterizadas.

Justificación

Mannheimia haemolytica es una bacteria patógena y comúnmente asociada con la pasteurelosis neumónica (mannheimiosis) bovina. Obtener y caracterizar una proteasa diferente a las ya descritas, contribuirá al entendimiento de la patogénesis de la bacteria, así como conocer los posibles tejidos o componentes tisulares sobre los que podría actuar, si participa en mecanismos de adquisición de nutrientes o de evasión de respuesta inmune.

Objetivos

General

Caracterizar una fracción enriquecida que contiene actividad proteolítica expresada por *Mannheimia haemolytica*.

Particulares

- Evaluar una actividad proteolítica secretada por *M. haemolytica* diferente a las descritas en estudios anteriores.
- Determinar los sustratos que pueda degradar la proteasa aislada de *M. haemolytica*.

- Identificar bandas de reconocimiento inmune de las proteínas que presenten actividad proteolítica usando sueros de animales enfermos (Suero de bovino con neumonía crónica o aguda) o específicos (α -proteasas de *A. pleuropneumoniae* o α -proteasas de *A. seminis*).

Metodología

Cultivo bacteriano.

Para el desarrollo de los análisis y ensayos a realizar, se utilizaron medios de cultivo líquidos, Brain & Heart Infusion (BHI), los cuales se incubaron con un pre-inóculo de *M. haemolytica* de toda la noche, en agar BHI suplementado con sangre de carnero al 5%, se inocularon matraces de 50 ml, que fueron incubados a 37 o 39 °C a 180 rpm por 24 h (Montes-Garcia, 2015).

Obtención de proteínas secretadas

Tras ser incubados, los cultivos fueron centrifugados por 25 minutos a 10,500 rpm, el sobrenadante libre de células fue precipitado usando un volumen de metanol durante 1h en congelación, posteriormente las proteínas fueron recuperadas por centrifugación a 10,500 rpm durante 25 minutos para después ser resuspendidas en PBS y se conservaron en congelación hasta su uso (Bautista-Bentarcourt, 2020).

Zimograma

Para la determinación de la actividad proteolítica, el zimograma se realizó en gel SDS-PAGE al 10% con 0.1% de gelatina porcina, posterior a la separación electroforética, los geles de sustrato fueron incubados en agitación durante una hora en solución de Tritón X-100 al 2.5%. Posteriormente fueron incubados toda la noche a 37°C en Buffer

Tris 20 mM CaCl₂ 10 mM. Los zimogramas fueron teñidos con azul de Coomassie (Negrete-Abascal *et al* 1999); una zona blanca contra un fondo azul era indicativo de la degradación del sustrato.

Columna DEAE celulosa

Con el objetivo de separar las proteínas obtenidas del cultivo, la muestra previamente concentrada, fue acoplada a una columna de DEAE celulosa. La columna se lavó con 3 volúmenes de PBS y las proteínas retenidas se eluyeron con 1 volumen de PBS con diferentes concentraciones de NaCl: 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 M. La actividad proteolítica de las muestras eluidas fue evaluada en zimogramas.

Separación de proteínas por medio de amicón

Para el aislamiento de la muestra por pesos moleculares se hizo uso de un amicón (Millipore Co), el cual por medio de una membrana separó la muestra en dos fracciones, una con proteínas de un peso mayor a 50 kDa y otra con proteínas con un peso menor a 50 kDa. La separación fue llevada a cabo por centrifugación a 3640 rpm por 15 minutos, de acuerdo con las indicaciones del fabricante para posteriormente recuperar las fases con distintos pesos moleculares y evaluar mediante zimogramas (Jiménez-Suarez, 2022).

Columna de afinidad con fibrinógeno.

Con el objetivo de contar con una columna de afinidad para poder aislar la probable proteasa, fibrinógeno de borrego se disolvió en NaHCO₃ 0.1 M con NaCl 0.5M pH 8.5. Mientras que la resina se lavó con HCl 1 mM por 30 minutos, el sobrenadante se eliminó por filtración y la resina se lavó en agua destilada, posteriormente se realizó

un lavado usando buffer de acoplamiento y se adiciono el acoplante en el mismo buffer el cual se mezcló por dos horas en agitación constante a temperatura ambiente con la resina, para después lavar la columna con buffer de acoplamiento y bloquear usando glicina 0.2 M por dos horas a temperatura ambiente y se lavó nuevamente usando el buffer de acoplamiento y posteriormente con buffer de acetato 0.1 M pH 4 con NaCl 0.5 M. Finalmente se equilibró con buffer de muestra y se almacenó en NaCl 0.5 M hasta su uso (Laub, et al. 2002).

La muestra resultante de la fase con peso molecular mayor a 50 kDa fue pasada por una columna de afinidad con fibrinógeno. La columna se lavó previamente con un volumen de PBS para equilibrar pH y las proteínas retenidas se lavaron dos veces con PBS y se eluyeron con buffer de acetatos pH 5, y una solución de PBS con urea. La actividad proteolítica fue evaluada mediante zimogramas (Laub, et al. 2002).

Efecto de inhibidores de proteasas

Para conocer el tipo de proteasas secretadas por *M. haemolytica*, muestras conteniendo la actividad proteolítica fueron incubadas a temperatura ambiente durante media hora en presencia de diferentes agentes inhibidores de proteasas:

- P-Hidroximercuribenzoato (pHMB) 10 mM
- Fenilmetilsulfonilfluoro (PMFS) 5 mM
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 20mM
- Fenantrolina 10 mM

El efecto de dichos inhibidores fue evaluado mediante zimogramas, los cuales se incubaron en buffer con el pH óptimo de actividad más cada uno de los agentes inhibidores a 37°C (Negrete-Abascal *et al.*, 1999).

Efecto del pH en la actividad proteolítica.

Con el objetivo de conocer el rango de pH en el que la proteasa actúa, se realizó un zimograma con gelatina porcina, después de la separación electroforética, el gel se cortó e incubó con distintas soluciones amortiguadoras de pH (Cruz-Montoya, 2015).

- Buffer de acetatos 50 mM – pH: 4, 5 y 6.
- Buffer TRIS 50 mM – pH: 7-8.
- Buffer Glicina-NaOH 50 mM – pH: 9 y 10.

Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica.

Para conocer el rango de temperatura en el cual la proteasa es activa, la fracción enriquecida que contiene la proteasa fue incubada por 10 minutos previo al corrimiento electroforético a distintas temperaturas:

- 4°C
- Temperatura ambiente (control)
- 37°C
- 40°C
- 50°C
- 60°C
- 70°C

Tras este tiempo de incubación, la actividad proteolítica fue evaluada mediante un zimograma con gelatina porcina (Cruz-Montoya, 2015).

Degradación de sustratos

Para determinar qué otros sustratos pueden ser degradados por la proteasa aislada, fracciones (10 µg/ml) de esta muestra se incubaron con IgG bovina, y fibrinógeno de borrego (10 µg/ml) durante 24 h a 37 °C. Muestras de estos sustratos, sin proteasas, fueron incubadas a las mismas condiciones como controles negativos. Posterior a esta incubación, las muestras se mezclaron con buffer de muestra y fueron separadas por corrimiento electroforético para determinar si hubo o no degradación de estas moléculas (Negrete-Abascal *et al.* 1999).

Reconocimiento inmune

Después de la separación por electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 300 mA durante 60 minutos, la cual fue bloqueada con una solución de leche al 5%, en PBS-Tween 0.05%. Luego, la membrana fue lavada tres veces para retirar el excedente de leche. Posteriormente, la membrana se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con diferentes anticuerpos primarios.

- α -proteasa de *A. pleuropneumoniae*
- α -proteasa de *A. seminis*.
- Suero de bovino con neumonía crónica
- Suero de bovino con neumonía aguda

Enseguida se realizaron lavados con PBS-Tween, posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario α -conejo (1:1000) en las membranas incubadas con α -proteasa, y α -bovino en las membranas incubadas con suero de bovino con neumonía crónica o aguda (Ambos marcados con peroxidasa); estos anticuerpos se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Se realizaron lavados de la membrana con PBS-Tween y la membrana se reveló en una solución de H_3PO_4 50 mM, pH 7.4; diaminobencidina, CoCl_2 y NiCl_2 , y se añadieron 50 μl de H_2O_2 (Negrete-Abascal *et al.* 1998)

Resultados.

Obtención de la proteasa.

Las proteínas secretadas por *M. haemolytica* separadas por corrimiento electroforético en zimogramas con gelatina porcina, presentaron actividad proteolítica en pesos moleculares de 75 (Figura 1A, flecha roja), 45 kDa (Figura 1A, flecha rosa) y 30 kDa aproximadamente (Figura 1A, flecha verde) a ambas temperaturas de incubación 37°C o 39°C. La actividad proteolítica solo estuvo presente en zimogramas con gelatina porcina, por lo que todos los zimogramas presentados a continuación llevan este sustrato.

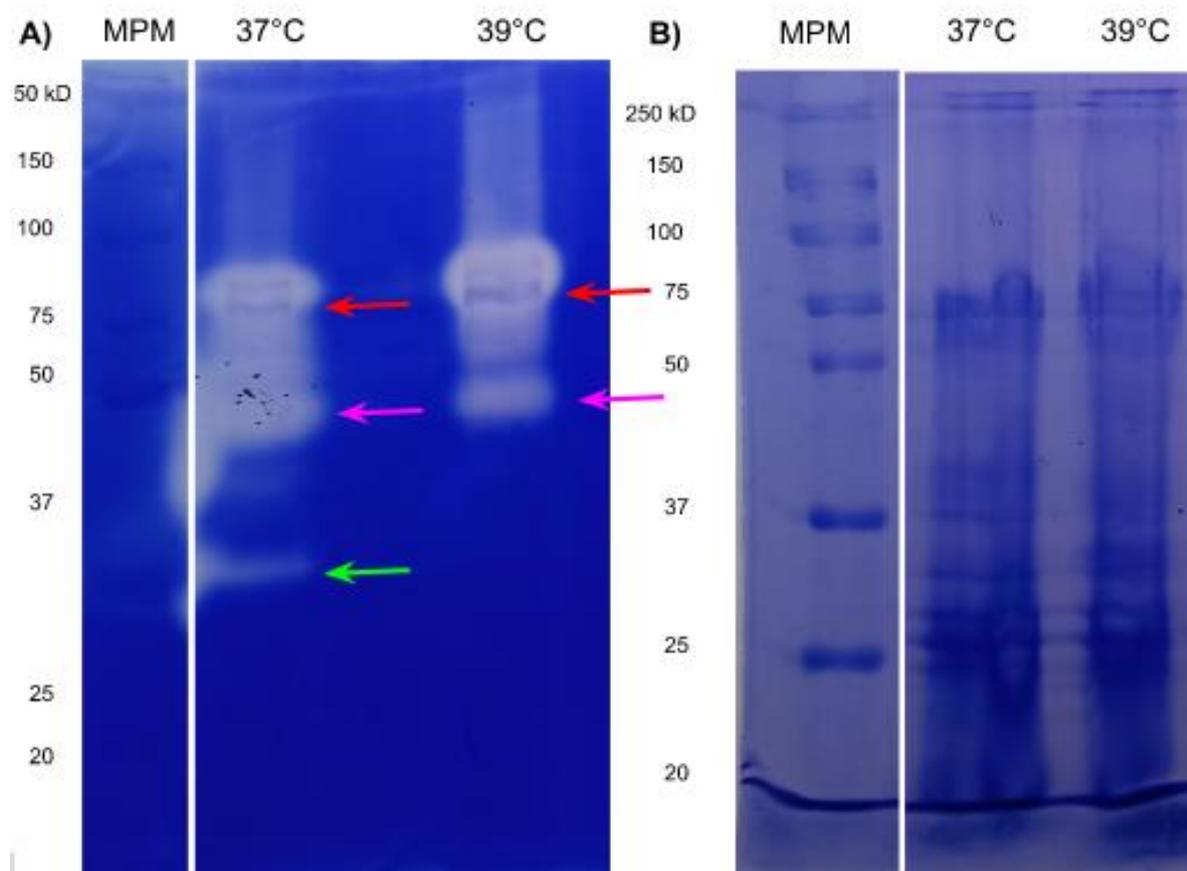
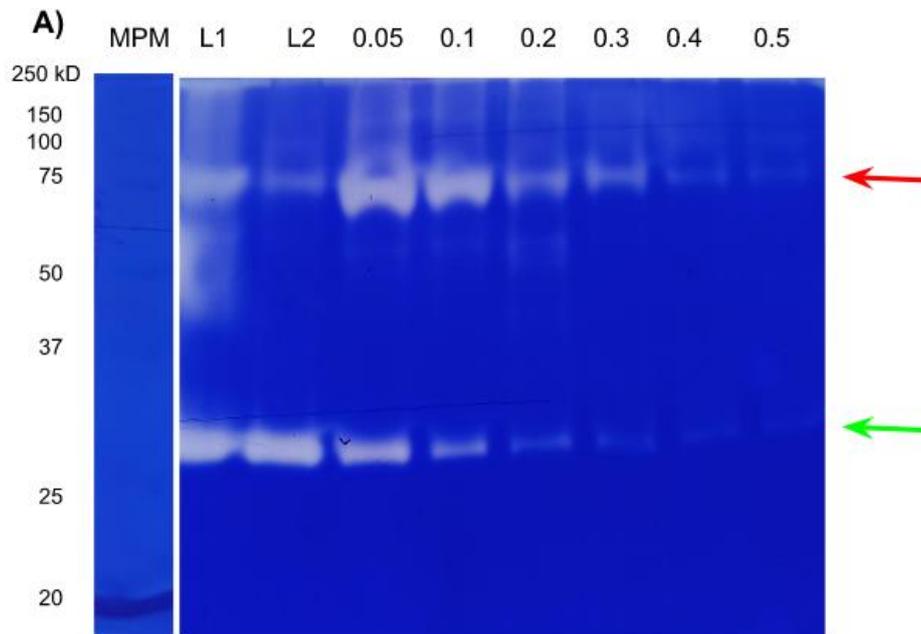


Figura 1. Patrón de proteínas secretadas y actividad proteolítica de proteínas

de *Mannheimia haemolytica*. Proteínas secretadas por *M. haemolytica* incubada a 37 o 39°C por 24 horas. A) Zimograma, B) Patrón de proteínas.

Con el objetivo de aislar la fracción que contiene proteasa, la muestra se colocó en una columna DEAE-celulosa, una vez unida, la proteína fue eluida con NaCl a diferentes concentraciones. En las cuales se visualizaron bandas de actividad proteolítica a 75 (Figura 2 A. flecha roja) y 30 kDa (Figura 2 A. flecha verde), siendo más intensa en la fracción con 0.05 M de NaCl mientras que en el gel normal se visualizaron bandas de 75 (Figura 2 B, flecha roja) y 30 kDa (Figura 2 B, flecha verde).



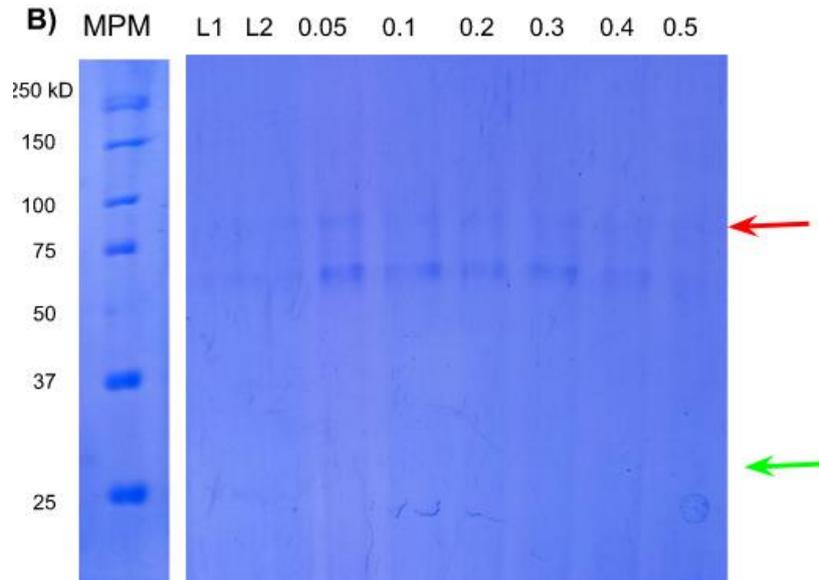


Figura 2. Patrón de proteínas y actividad proteolítica de las muestras separadas por columna DEAE-celulosa. Fracciones obtenidas de la columna DEAE-celulosa en zimograma (A) y Patrón de proteínas (B), L1) Lavado 1 con PBS, L2) Lavado 2 con PBS y fracciones con distintas concentraciones de NaCl. Flecha roja actividad proteolítica a 75 kDa, Flecha verde actividad proteolítica de 30 kDa aproximadamente.

La fracción recuperada de la elusión con NaCl 0.05 M se pasó por amicón para separar la muestra en dos fracciones nuevas con pesos moleculares distintos, mayor a 50 kDa y menor a 50 Kda, esto con el objetivo de separar las actividades proteolíticas observadas en el zimograma (Figura 2A).

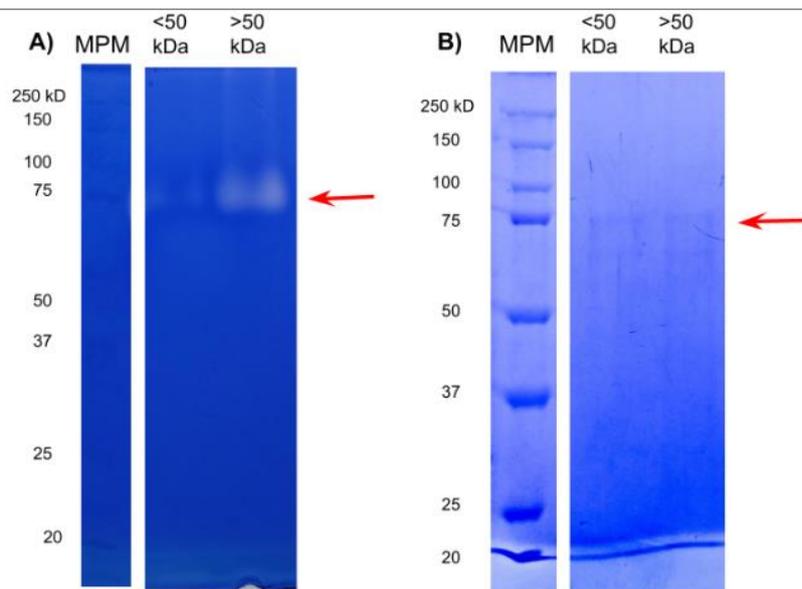


Figura 3. Patrón de proteínas y actividad proteolítica de muestras separadas por amicón. Fracciones obtenidas tras pasar la fracción enriquecida con proteasa a través del amicón, con peso molecular mayor y menor a 50 kDa en zimograma (A, flecha roja) y patrón de proteínas (B) con dos bandas a un peso de 75 kDa (Flecha roja) y 70 kDa aproximadamente.

Debido a que en ambas fracciones; mayor y menor de 50 kDa, se obtuvo la misma banda de actividad (Figura 3A, flecha roja), mientras que en el gel normal se observaron dos bandas a un peso molecular de 75 (Figura 3B, flecha roja) y 70 kDa, se intentó separar ésta por una columna de afinidad con fibrinógeno, sin embargo, la actividad únicamente se observó en las fracciones de lavado (Figura 4A, carriles 1 y 2 flecha roja).

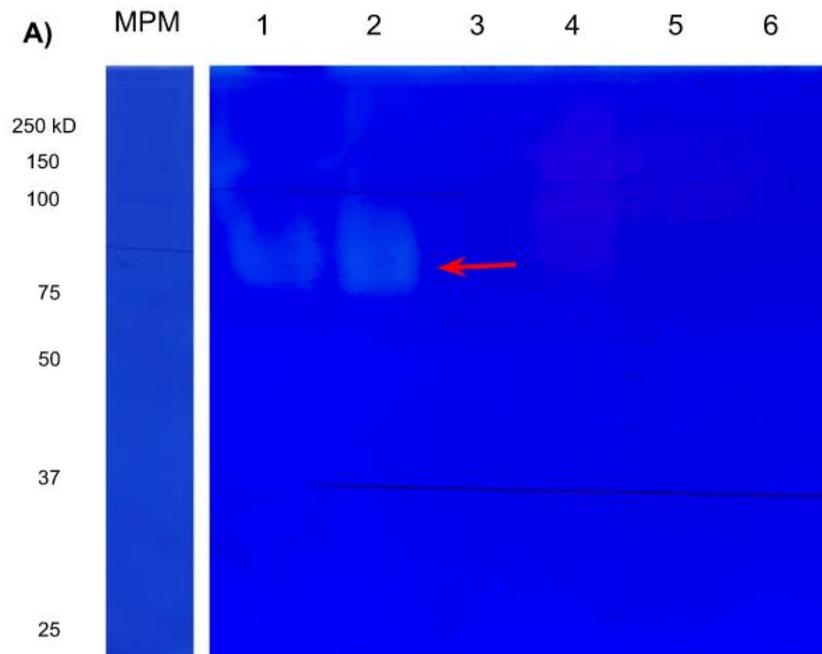


Figura 4. Actividad proteolítica de muestras separadas por columna de afinidad con fibrinógeno. Fracciones obtenidas de la columna con fibrinógeno en zimograma (A). 1) Lavado 1 con PBS, 2) Lavado 2 con PBS, 3) Fracción 1 Buffer pH 5, 4) Fracción 2 Buffer pH 5, 5) Fracción 1 PBS-Urea, 6) Fracción 2 PBS-Urea.

La proteasa a 75 kDa no logró interactuar con el fibrinógeno acoplado a la columna, por lo que la fracción 1 de lavado con PBS presentó la mayor actividad proteolítica. Esta actividad no fue visualizada en ninguna de las fracciones eluidas por cambio de pH o en presencia de urea (Figura 4, carriles 3 a 6).

Caracterización de la proteasa.

Mediante el uso de zimogramas se demostró actividad proteolítica de *Mannheimia haemolytica* en un peso de 75 kDa aproximadamente, la cual no es dependiente de calcio ya que dicha actividad no se ve afectada por su ausencia (Figura 5A, flecha roja).

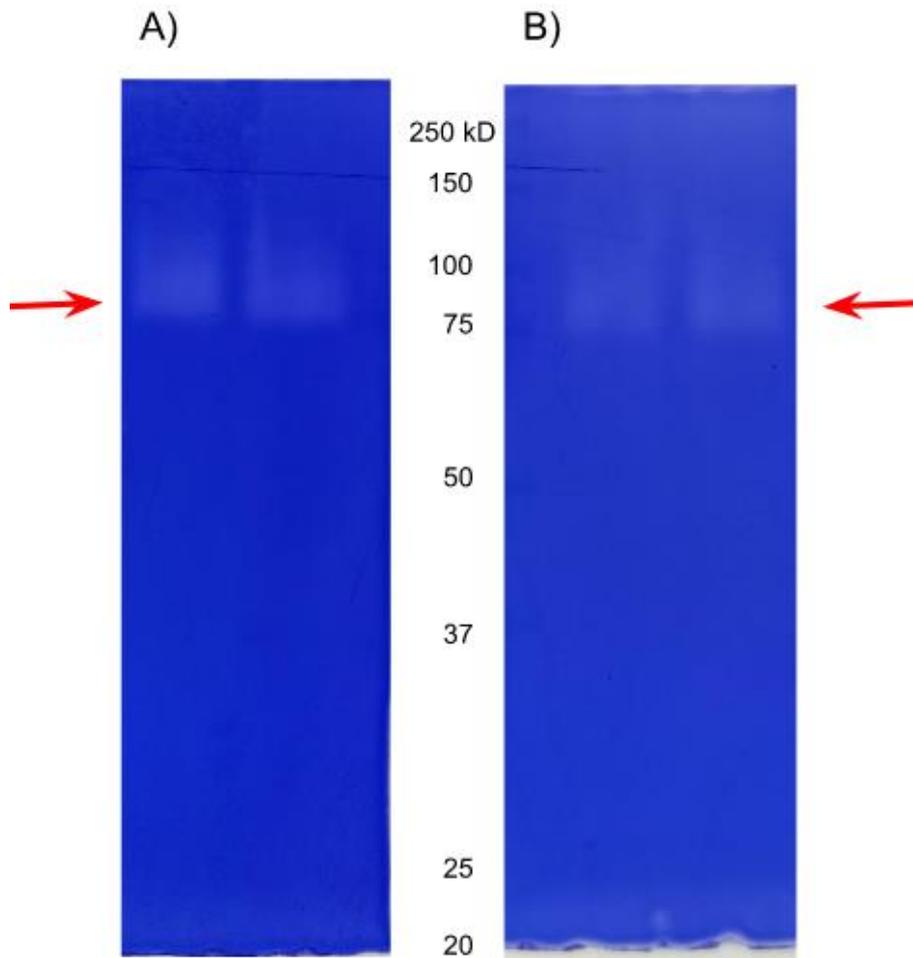


Figura 5. Efecto del calcio en la actividad proteolítica. Zimogramas en los que se observa la actividad proteolítica en ausencia (A) y presencia de calcio (B).

Inhibidores de proteasas

Con el fin de determinar el tipo de proteasa que *M. haemolytica* secreta, muestras de la fracción separada por peso molecular (amicón) incubadas con diferentes inhibidores de proteasas, presentaron actividad proteolítica excepto en presencia de PMSF (Figura 6, carril D) indicando que se trata de una serín proteasa.

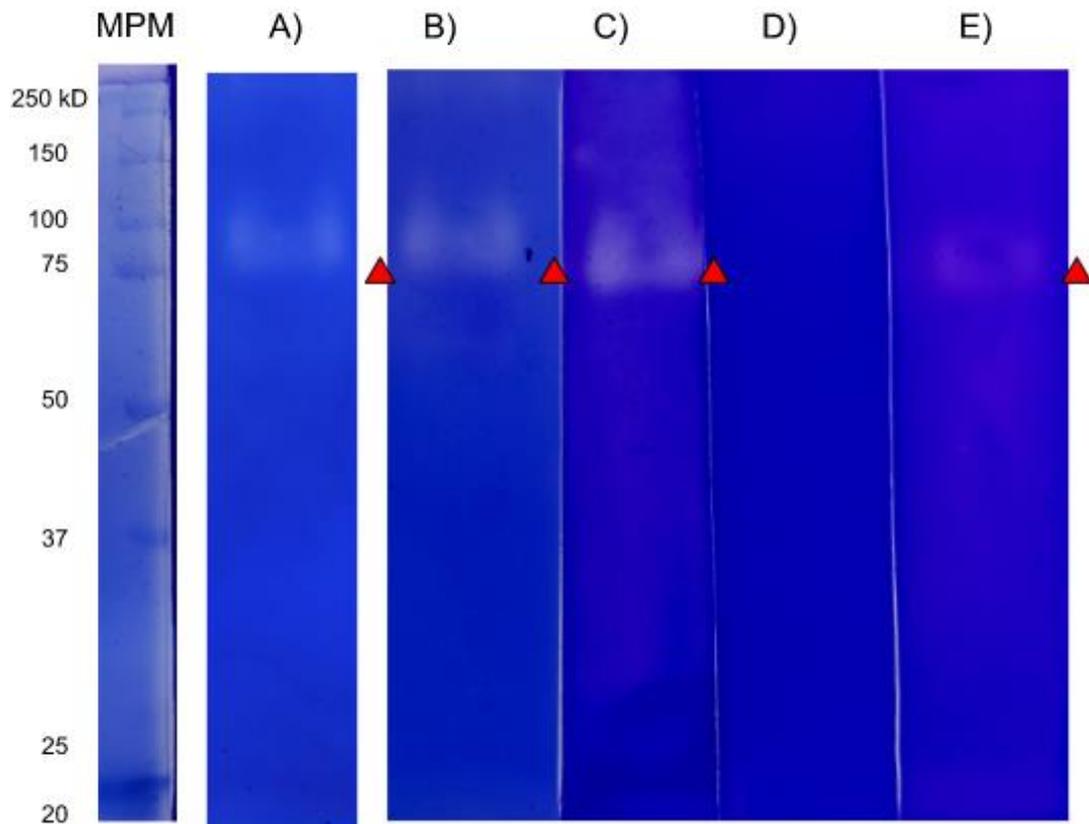


Figura 6. Actividad proteolítica en presencia de diferentes inhibidores de proteasas en zimogramas. Actividad proteolítica a aproximadamente 75 kDa (triángulo rojo) en presencia de diferentes inhibidores de proteasas en zimogramas A) Control; B) Fenantrolina; C) EGTA; D) PMSF; E) P-Hidroximercuribenzoato.

Efecto del pH en la actividad proteolítica

Para conocer el pH al que la proteasa obtenida tiene una mayor actividad proteolítica, se utilizó la muestra de la fracción separada por amicón para incubar en soluciones amortiguadoras con diferentes pHs tras el corrimiento electroforético en un zimograma con gelatina porcina. La proteasa presentó actividad proteolítica al incubarse en un pH de 6 A 10. En particular, la proteasa mostró mayor actividad proteolítica en el rango de pH de 7 a 9, por lo que se trata de una proteasa de tipo alcalina.

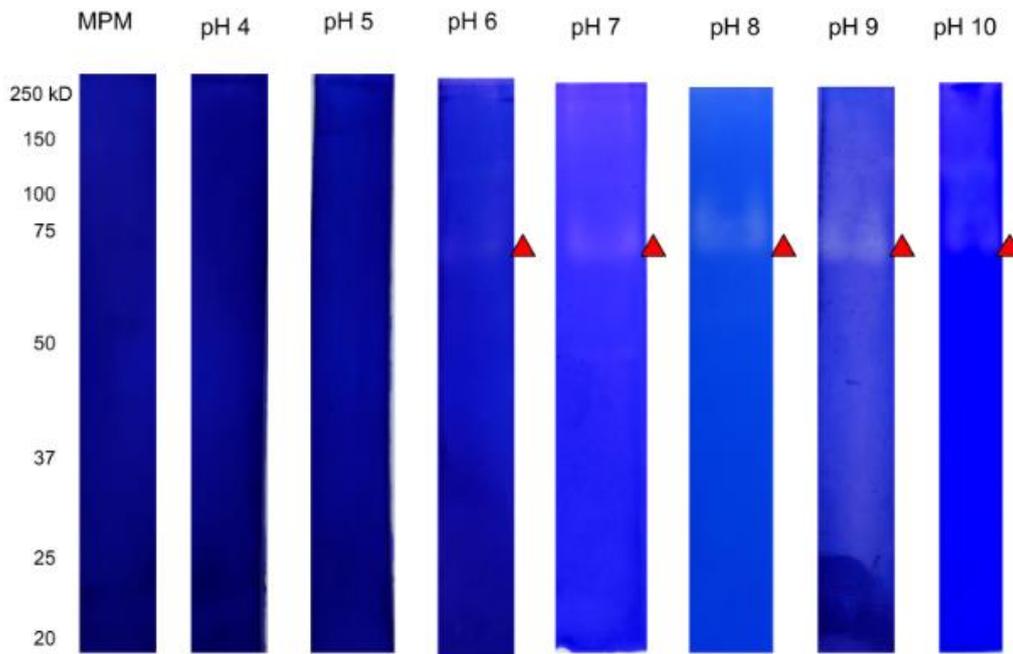


Figura 7. Efecto del pH en la actividad proteolítica. Zimograma que muestra actividad proteolítica (triángulo rojo) a diferentes pHs.

Efecto de la temperatura.

La incubación de muestras que contienen actividad proteolítica de 75 kDa a diferentes temperaturas, mostró que esta es activa a 4, Temperatura ambiente, 37, 40 y 50 °C, mientras que, a temperaturas de 60 °C o mayores, esta es inhibida (Figura 8).

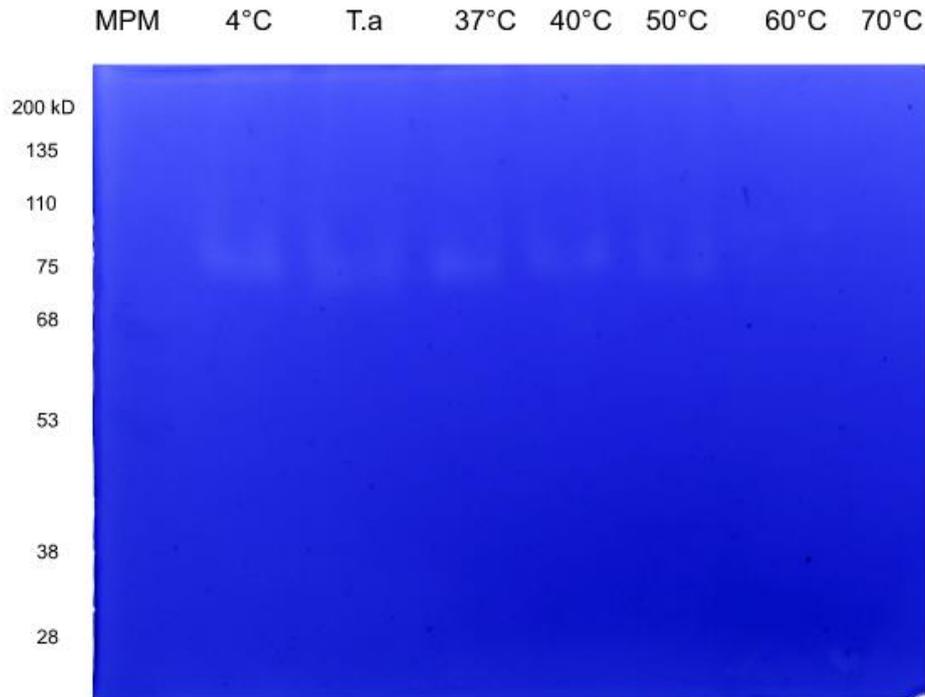


Figura 8. Efecto de temperatura en la actividad proteolítica. Zimograma en el que se aprecia el efecto de la temperatura en la actividad proteolítica.

Degradación de sustratos

La proteasa de 75 kDa secretada por *Mannheimia haemolytica* es capaz de mostrar actividad proteolítica utilizando gelatina porcina, sin embargo, no se logró observar actividad proteolítica en zimogramas con albúmina (Sigma), hemoglobina bovina (Sigma) ni caseína (datos no mostrados).

Por otro lado, la fracción enriquecida es capaz de degradar fibrinógeno parcialmente, en la figura 9 se observa actividad proteolítica cuando la proteína se encuentra sin desnaturizar y casi totalmente cuando ésta se encuentra separada en sus subunidades debido a la presencia de B-mercaptoetanol, en la figura 10, B se observa actividad proteolítica. En contraste, dicha fracción no es capaz de degradar IgG de

manera nativa o desnaturalizada, aunque se aprecia una ligera disminución en la intensidad de las bandas de 25, 50 y aproximadamente 100 kDa cuando la IgG esta desnaturalizada (Figura 10, carril D)

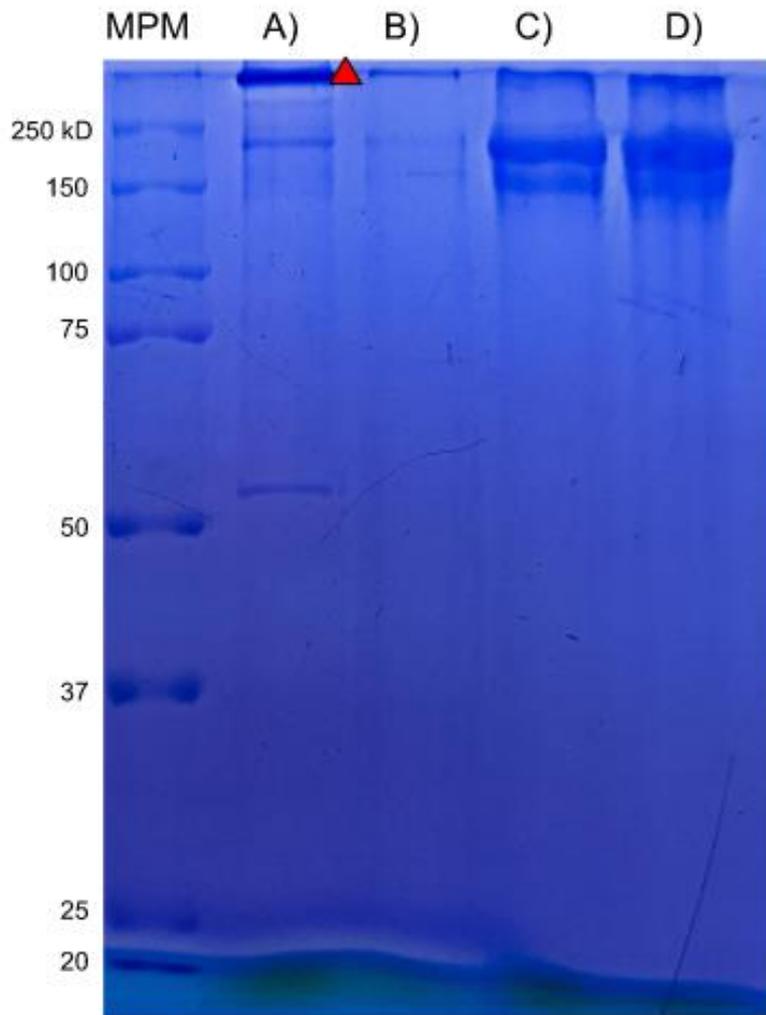


Figura 9. Degradación de sustratos (IgG y fibrinógeno nativos). Gel de poliacrilamida al 10% donde se aprecia la degradación de fibrinógeno por la fracción de 75 kDa de *M. haemolytica* (carril B), pero no la de IgG de bovino (carril D). Moléculas sin desnaturalizar. Carril A) Fibrinógeno (triángulo rojo). Carril C) IgG.

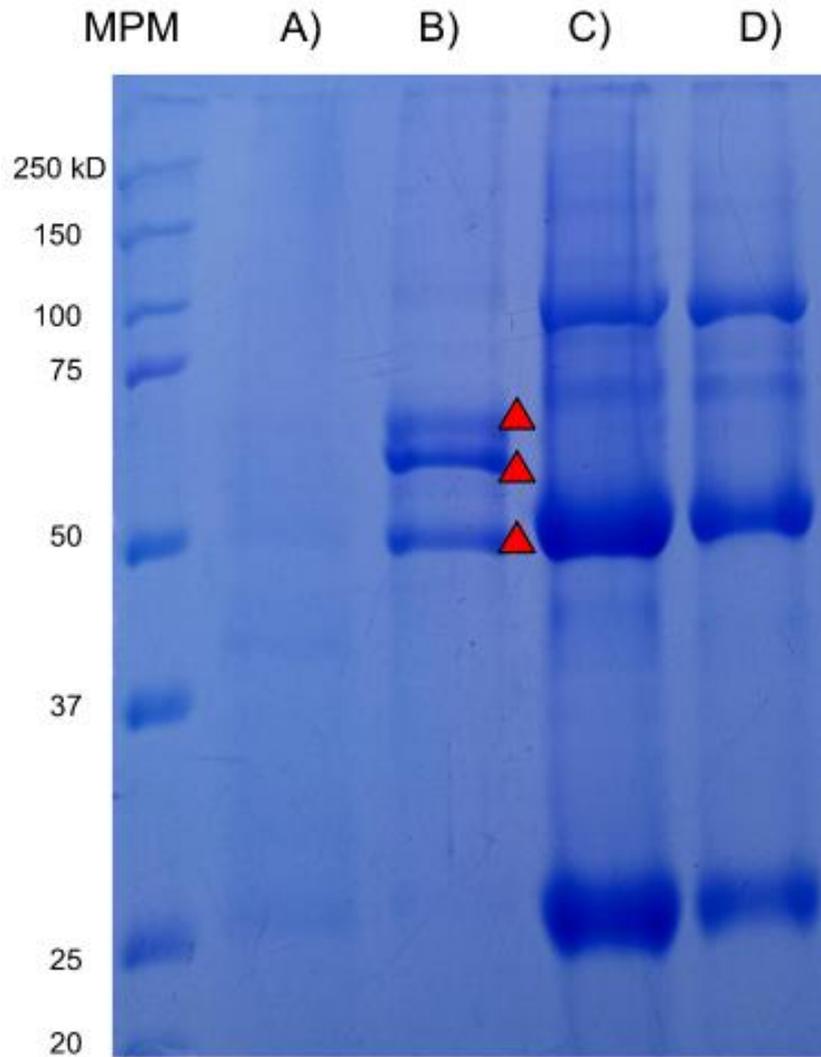


Figura 10. Degradación de sustratos (IgG y fibrinógeno desnaturalizados). Gel de poliacrilamida al 10% donde se aprecia la degradación de fibrinógeno por la fracción de 75 kDa de *M. haemolytica* (carril A), pero no la de IgG de bovino (carril D). Carril B) Fibrinógeno (triángulo rojo) Carril C) IgG. Las muestras se encuentran desnaturalizadas por la presencia de B-Mercaptoetanol.

Inmuno Reconocimiento

La fracción enriquecida que contiene la proteasa mostró un inmuno reconocimiento con suero de bovino con neumonía crónica (Figura 11, A), o suero de bovino con neumonía aguda (Figura 11, B), presentando dos bandas de 60 y 75 kDa. Sin

embargo, estas bandas no fueron reconocidas por sueros α -proteasa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* o *Actinobacillus seminis* (datos no mostrados).

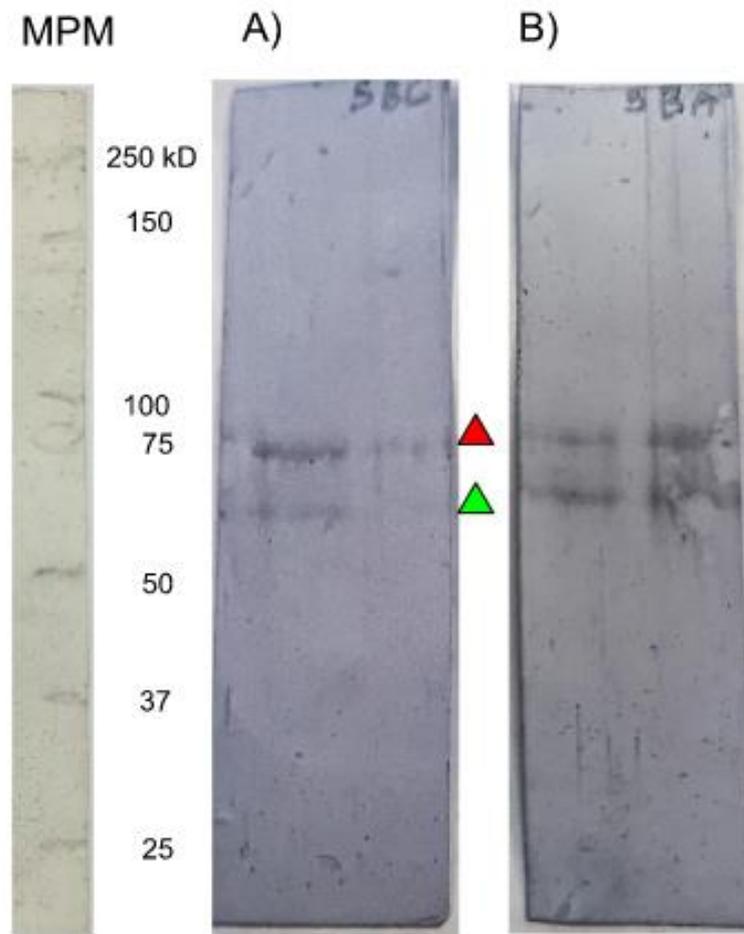


Figura 11. Reconocimiento inmune. Western Blot de bandas de 75 (triángulo rojo) y 60 (triángulo verde) kDa en muestras que contienen la actividad proteolítica de 75 kDa de *M. haemolytica* usando suero de bovino con neumonía crónica (A) y suero de bovino con neumonía aguda (B)

Discusión.

Muchos patógenos Gram negativos como lo es *M. haemolytica* han desarrollado mecanismos para colonizar superficies mucosas y aumentar la interacción bacteria-huésped. Para esto, un factor importante a tomar en cuenta son los factores de virulencia, como lo son las proteasas. Existen patógenos colonizadores de mucosas que expresan proteasas que son capaces de degradar distintas moléculas con el fin de inactivar moléculas defensivas expresadas por el hospedero, como inmunoglobulinas o fibrinógeno, estas proteasas también son de gran utilidad para degradar moléculas con el objetivo de exponer sitios de anclaje o entrada a una célula como un mecanismo de invasión (Cardenas, *et al.* 2014).

En el presente estudio se realizaron cultivos de *M. haemolytica* serotipo A1, el cual es el principal agente responsable de producir la neumonía fibrinosa en bovinos. Al haber una gran cantidad de bacterias presentes en el tracto respiratorio, estas ingresan al pulmón, y producen neumonía, caracterizada por exudación extensa de fibrina, entrada de neutrófilos y macrófagos, trombosis capilar y focos de necrosis de coagulación rodeados por una zona de bacterias y células inflamatorias en remolino degeneradas (Dassanayake *et al.* 2009).

El fibrinógeno es un elemento central de la homeostasis y la coagulación y juega un papel importante en la respuesta inflamatoria, alterando las funciones de los leucocitos, incluida la adhesión celular, la migración y la expresión de citoquinas, se despolimeriza en subunidades α y γ , que, junto con la trombina, forman parte de la membrana celular del hospedero, en forma de fibrina insoluble la cual se acumula en depósitos lo que causa inflamación en el pulmón como respuesta al daño pulmonar

(Mc Neil *et al.* 2002). Por lo tanto, si nuestra fracción enriquecida degrada este sustrato, podemos deducir que genera un daño directo en la membrana celular (Katsafadou, *et al.* 2019).

La degradación del fibrinógeno también puede afectar la opsonización y la fagocitosis, las cuales están mediadas por el complemento, ya que estos pueden ser inhibidos por fragmentos de fibrinógeno, a su vez, la deficiencia de fibrinógeno podría incrementar el riesgo de trombosis grave o hemorragia mortal (Lopez-Ruiz *et al.* 2013), proteasas que son capaces de degradar fibrinógeno han sido descritas anteriormente en *Actinobacillus seminis* (Cruz-Montoya, 2023), y en *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en la que se describió una metaloproteasa degrada parcialmente las cadenas α y β de fibrinógeno porcino (Lopez-Ruiz *et al.* 2013). Lo cual podría permitir a patógenos que se adhieran a superficies mucosas, evadir la respuesta inmune y obtener nutrientes (Jansen, *et al.*, 1995). Por otro lado, la fracción enriquecida que contiene la proteasa de *M. haemolytica*, no es capaz de degradar IgG, lo que nos indica que es una proteasa específica, sin embargo, se ha descrito en estudios previos la presencia de proteasas secretadas por esta bacteria que son capaces de degradar IgG1 e IgG2, (Lee & Shewen, 1996). Asimismo, se ha descrito en este microorganismo una proteasa de un peso aproximado de 155 kDa la cual es capaz de degradar otras proteínas, con funciones defensivas para el hospedero, como lo es la IgA (Ayalew *et al.* 2019).

Para determinar la naturaleza de las proteasas secretadas por *M. haemolytica*, se utilizaron una serie de inhibidores como lo son Fenantrolina 10 mM, EGTA 10 mM, PMSF 5 mM y pHMB 10 mM, mismos que fueron incubados con la muestra de la

fracción enriquecida con la proteasa, el análisis electroforético mostró que PMSF tiene un efecto inhibitorio en la actividad proteolítica de la muestra (Figura 6, E), ya que este inhibidor reacciona con los residuos de serína para inhibir diversas proteínas como son la tripsina, la quimotripsina, la trombina y la papaína (Maeda *et al.* 2014). Estas proteasas presentan un residuo de serína (Ser) en su sitio activo, responsable del ataque nucleofílico sobre el carbonilo del enlace peptídico blanco, que es donde actuará en PMSF para su inhibición. De igual manera, se han descrito serín-proteasas capaces de degradar fibrinógeno en *Staphylococcus aureus* (Ohbayashi, *et al* 2011) y *Streptococcus pyogeneses* (Matzuka, *et al* 1999).

Los resultados del inmuno reconocimiento muestran que las proteasas secretadas por *M. haemolytica* son inmunogénicas en presencia de suero de bovino con neumonía crónica (Figura 11A) o aguda (Figura 11B), lo cual nos indica que estas proteínas se expresan durante la enfermedad y se encuentran presentes durante el desarrollo de esta. Por otro lado, se realizaron inmuno reconocimientos con sueros α -proteasas de *A. seminis* y *A. pleuropneumoniae*, encontrando que no se presenta reactividad cruzada entre dichas proteasas y nuestra fracción enriquecida, lo cual nos da a entender que son estructuralmente diferentes.

En conjunto, los resultados recopilados indican que las proteasas secretadas por *M. haemolytica* tienen importancia en los mecanismos de patogenicidad y virulencia de la bacteria, así como en la invasión al hospedero, esto mediante la degradación de moléculas de importancia estructural como lo es el fibrinógeno.

Conclusiones

- Se logró obtener una proteasa secretada de *M. haemolytica* a un peso de 75 kDa.
- Los ensayos de inhibidores probaron que se trata de una serín proteasa no dependiente de calcio.
- La proteasa se encuentra activa en un rango de pH 6 a 10 a temperaturas menores a 60 °C
- La proteasa es capaz de degradar fibrinógeno.
- Una banda en un peso aproximado de 75 kDa fue reconocida por suero de bovino con neumonía crónica y suero de bovino con neumonía aguda, pero no por sueros α -proteasa de *A. pleuroneumoneuminiae* o α -proteasa de *A. seminis*.

Perspectivas

- Obtener una identificación de la proteasa con espectrofotometría de masas.
- Obtener un anticuerpo a partir de la proteasa.
- Conocer si la proteasa es capaz de degradar otros sustratos o inmunoglobulinas.

Bibliografía

- Aggarwal, N., y Sloane, B. F. (2014). Cathepsin B: Multiple roles in cancer. *Proteomics, clinical applications*, 8: 427–437. <https://doi.org/10.1002/prca.201300105>
- Ayalew, S., Murdock, B. K., Snider, T. A., y Confer, A. W. (2019). *Mannheimia haemolytica* IgA-specific proteases. *Veterinary*

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108487>

- Bautista-Bentarcu, P. (2020). Efecto de la epinefrina y norepinefrina en la expresión de proteínas de *Actinobacillus seminis*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM. <http://132.248.9.195/ptd2020/diciembre/0805873/Index.html>
- Boukahil, I. y Czuprynski, C. J. (2016). *Mannheimia haemolytica* biofilm formation on bovine respiratory epithelial cells. *Veterinary microbiology*, 197: 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.012>
- Boyanova, L. (2017) Stress hormone epinephrine (adrenaline) and norepinephrine (noradrenaline) effects on the aerobic bacteria. *Anaerobe*, 44: 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.01.03>
- Cárdenas-Perea, M., Cruz, L., Gándara-Ramírez, J. y Pérez-Hernández, M. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*, 94: 35-43.
- Confer, A. W., y Ayalew, S. (2018). *Mannheimia haemolytica* in bovine respiratory disease: Immunogens, potential immunogens, and vaccines. *Animal health research reviews*, 19: 79–99. <https://doi.org/10.1017/s1466252318000142>
- Cruz-Montoya, A. H. (2015). Caracterización de proteasas de *Actinobacillus seminis*. Tesis de licenciatura. <http://132.248.9.195/ptd2015/abril/0728663/Index.html>
- Cruz-Montoya, A. H., Ramirez-Paz-y-Puente, G. A., Vázquez-Cruz, C. A., Montes-García, J. F., y Negrete-Abascal, E. (2023) *Actinobacillus seminis* secretes a metalloprotease that degrades bovine fibrinogen and

<http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2023.020>

- Dassanayake, R. P., Shanthalingam, S., Herndon, C. N., Lawrence, P. K., Cassirer, E. F., Potter, K. A. y Srikumaran, S. (2009). *Mannheimia haemolytica* serotype A1 exhibits differential pathogenicity in two related species, *Ovis canadensis* and *Ovis aries*. *Veterinary microbiology*, 133: 366-371. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.07.015>
- Fullana, N. (2014). Producción y caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura. Tesis de maestría. Universidad de la República de Uruguay. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/5139>
- Galdino, A.C.M., Branquinha, M.H., Santos, A.L.S., y Viganor, L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* and its arsenal of proteases: weapons to battle the host, N. *Pathophysiological aspects of proteases*. 1: 978-981. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6141-7_16
- Garcia-Gomez, E. (2004). Identificación y caracterización de proteasas secretadas por *Mannheimia (pasteurella) haemolytica* aislada de pollo / Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM. <http://132.248.9.195/pd2005/0601239/Index.html>
- García-Gómez, E., Vaca, S., Pérez-Méndez, A., Ibarra-Caballero, J., Pérez-Márquez, V., Tenorio, V. R., y Negrete-Abascal, E. (2005). *Gallibacterium anatis*-secreted metalloproteases degrade chicken IgG. *Avian pathology*, 34, 426–429. <https://doi.org/10.1080/03079450500267866>
- Hamza, T. A. (2017). Bacterial protease enzyme: safe and good alternative for industrial and commercial use. *International journal of*

chemical biomolecular science, 3, 10-17.

- Het Lam, J., Derkman, T. H. J., van Garderen, E., Dijkman, R., y van Engelen, E. (2023). Distinct *Mannheimia haemolytica* serotypes isolated from fatal infections in veal calves and dairy cows. *The veterinary journal*, 292: 105-115. 105940. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105940>
- Jansen HJ, Grenier D, Van der Hoeven JS. (1995). Characterization of immunoglobulin-G degrading proteases of *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*. *Oral and immunogenic microbiology*. 10:138-145. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1995.tb00134.x>
- Jisha, V., Smitha, R., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, K., Sajith, S. y Benjamin, S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in enzyme research*, 1: 39-51. <https://doi.org/10.4236/aer.2013.13005>
- Katsafadou, A. I., Tsangaris, G. T., Anagnostopoulos, A. K., Billinis, C., Barbagianni, M. S., Vasileiou, N. G. y Fthenakis, G. C. (2019). Differential quantitative proteomics study of experimental *Mannheimia haemolytica* mastitis in sheep. *Journal of proteomics*, 205: 103-115. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103393>
- Jesse, F. F. A., Amira, N. A., Isa, K. M., Maqbool, A., Ali, N. M., Chung, E. L. T., y Lila, M. A. M. (2019). Association between *Mannheimia haemolytica* infection with reproductive physiology and performance in small ruminants: A review. *Veterinary world*. 12: 978–983. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.978-983>
- Jiménez-Suárez, C. O. (2022). Purificación parcial de una proteasa secretada por *Actinobacillus seminis*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

<http://132.248.9.195/ptd2022/marzo/0823916/Index.html>

- Laub, M., Chatzinikolaidou, M., Rumpf, H., y Jennissen, H. P. (2002). Modeling of protein-protein interactions of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) by 3D-Rapid Prototyping. *Materialwissenschaft und werkstofftechnik*, 33: 729-737. <https://doi.org/10.1002/mawe.200290003>
- Lee, C. W., y Shewen, P. E. (1996). Evidence of bovine immunoglobulin G1 (IgG1) protease activity in partially purified culture supernatant of *Pasteurella haemolytica* A1. *Canadian journal of veterinary research*, 60: 127-140.
- Lo, R. Y. C. (2001). Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Veterinary microbiology*, 83: 23–35. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(01\)00374-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00374-1)
- López-Ruiz, B., Vaca, S., de la Garza, M., y Negrete-Abascal, E. (2013). *Actinobacillus pleuropneumoniae* secretes a metalloprotease that degrades porcine fibrinogen. *African journal microbiology research*, 7: 2803-2807. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5432>.
- Maeda S, Ohno K, Uchida K, Igarashi H, Goto-Koshino Y, Fujino Y, y Tsujimoto H. (2014) Intestinal protease-activated receptor-2 and fecal serine protease activity are increased in canine inflammatory bowel disease and may contribute to intestinal cytokine expression. *The journal of veterinary medical science*. 76:1119-1127. doi: 10.1292/jvms.
- Matsuka, Y. V., Pillai, S., Gubba, S., Musser, J. M., y Olmsted, S. B. (1999). Fibrinogen cleavage by the *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease and generation of antibodies that inhibit

enzyme proteolytic activity. *Infection and immunity*, 67: 4326-4333.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.044503-0>

- Montes-García, J. F. (2015). Identificación de proteínas amiloides expresadas por *Mannheimia haemolytica*. Tesis de maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. <http://132.248.9.195/ptd2015/enero/0724042/Index.html>
- Krishnegowda, DN., Dhama, K., Kumar Mariappan, A., Munuswamy, P., Iqbal Yattoo, Mohd., Tiwari, R. y Reddy, M. R. (2020). Etiology, epidemiology, pathology, and advances in diagnosis, vaccine development, and treatment of *Gallibacterium anatis* infection in poultry: A review. *Veterinary quarterly*, 40: 16–34. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1712495>
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V., Guerrero, A., García, R., Reyes, M., y De la Garza, M. (1998). Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin, and immunoglobulin A. *Canadian journal of veterinary research*, 58: 83–86. <https://doi.org/9684047>
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V. R., y de la Garza, M. (1999). Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* Isolates. *Current microbiology*, 38: 64–67. <https://doi.org/10.1007/pl00006775>
- Ohbayashi, T., Irie, A., Murakami, Y., Nowak, M., Potempa, J., Nishimura, Y., y Imamura, T. (2011). Degradation of fibrinogen and collagen by staphopains, cysteine proteases released from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 157: 786-792. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.9.4326-4333.1999>

- Ramírez Rico, G., Martínez-Castillo, M., González-Ruíz, C., Luna-Castro, S., y de la Garza, M. (2017). *Mannheimia haemolytica* A2 secretes different proteases into the culture medium and in outer membrane vesicles. *Microbiology pathogenesis*, 113: 276–281. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.027>
- Rice, J. A., Carrasco-Medina, L., Hodgins, D. C., y Shewen, P. E. (2007). *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Animal health research reviews*, 8: 117–128. <https://doi.org/10.1017/s1466252307001375>
- Singh, K., Ritchey, J. W., y Confer, A. W. (2010). *Mannheimia haemolytica*: bacterial–host interactions in bovine pneumonia. *Veterinary pathology*, 48: 338–348. <https://doi.org/10.1177/0300985810377182>
- Snyder, E., y Credille, B. (2020). *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in bovine respiratory disease. *Veterinary clinics of north america: Food animal practice*, 36: 253–268. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.02.00>