



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS - IPN**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**EFFECTO DE LACTOFERRINA BOVINA SOBRE
LOS MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE
Mannheimia haemolytica A2: ADHESIÓN Y
FORMACIÓN DE BIOFILM. Estudio *in silico*.**

TESIS QUE PRESENTA:

Q. B. P. LUCERO RUIZ MAZÓN

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE:

BIOLOGÍA CELULAR

**DIRECTOR DE LA TESIS: DRA. GUADALUPE MIREYA DE LA
GARZA AMAYA**

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| Introducción | 7 |
| Bacterias Gram-negativas | 8 |
| Familia Pasteurellaceae..... | 9 |
| <i>Mannheimia haemolytica</i> | 9 |
| Patogenicidad de <i>Mannheimia haemolytica</i> | 11 |
| Factores de virulencia de <i>M. haemolytica</i> | 11 |
| Cápsula | 11 |
| Lipopolisacárido | 11 |
| Leucotoxina | 11 |
| Proteínas de membrana externa | 13 |
| Proteínas de unión a hierro..... | 13 |
| Adhesinas | 13 |
| Fimbrias | 14 |
| Proteasas..... | 14 |
| Sialoglicoproteasa | 14 |
| Neuraminidasa | 15 |
| Biofilm | 15 |
| Mannheimiosis neumónica | 16 |
| Control de la mannheimiosis neumónica..... | 17 |
| Lactoferrina | 17 |
| Funciones de la Lactoferrina | 18 |
| JUSTIFICACIÓN | 22 |
| HIPÓTESIS..... | 23 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 24 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 24 |
| METODOLOGÍA: | 25 |
| Identificación de las proteínas blanco de <i>M. haemolytica</i> que interaccionan con Lf..... | 26 |
| Proteínas de membrana externa de <i>M. haemolytica</i> | 26 |
| Optimización de proteínas | 27 |

| | |
|--|----|
| Interacción proteína-proteína..... | 27 |
| Obtención de modelos | 28 |
| Identificación de los aminoácidos presentes en las interacciones | 28 |
| RESULTADOS | 29 |
| DISCUSIÓN..... | 50 |
| CONCLUSIÓN | 54 |
| REFERENCIAS..... | 55 |

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por estar siempre a mi lado apoyándome en todo, dándome ánimos para nunca rendirme, gracias a sus consejos y su confianza depositada en mí he salido adelante. Sin ellos no hubiese llegado lejos, son la razón de todos mis logros. Gracias por todo mamá y papá.

A mis hermanas por motivarme día a día. Gracias por esos ánimos que me ayudaron a salir adelante y no rendirme. Gracias por llevarme siempre de la mano y mostrarme el camino a seguir. Siempre serán mi apoyo incondicional.

A mi primo Mario por esas veces que me sacó de apuros computacionales. Gracias por estar siempre ahí.

A Moy por acompañarme siempre, ayudándome a salir de apuros. Sus consejos y ánimos fueron indispensables para ir por un buen camino. Gracias por no dejarme sola.

A mi directora de tesis, Dra. Mireya por dejarme formar parte de su laboratorio y llevarme de la mano durante mi trabajo de investigación. Sin su apoyo y dedicación este trabajo no hubiese sido posible.

A mis asesores, Dr. Eduardo y Dr. Jesús por sus sugerencias que contribuyeron a la realización de este trabajo de investigación.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 52 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría de la Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya. Para el desarrollo de este proyecto el sustentante contó con una beca de Maestría CVU: 992577 que otorga el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo la convocatoria de Becas Nacionales a estudiantes inscritos en Programas de Posgrado de Calidad (PNPC).

RESUMEN

Objetivo: Determinar por estudios *in silico* el efecto de lactoferrina bovina (Lfb) sobre la adhesión y formación de biopelícula (biofilm) de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2.

Métodos: Se midió la interacción de Lfb con proteínas de membrana externa (OMPs, por sus siglas en inglés) de *M. haemolytica*, las cuales son responsables de su interacción con el hospedero y de parte de su patogenicidad, así como de proteínas similares de diferentes bacterias Gram-negativas. Esta interacción se determinó por medio de la técnica de “*docking*” molecular.

Resultados: La lactoferrina interactuó con las OMPs a través de interacciones hidrofóbicas tanto de *M. haemolytica* como de otras bacterias Gram-negativas con las que se encontró similitud, teniendo una mayor afinidad por porinas. Los aminoácidos que participan en estas interacciones son los que conforman el extremo amino terminal de Lfb.

Conclusiones: El mecanismo principal por el cual Lfb podría estar evitando la adhesión de *M. haemolytica* a las células del hospedero y la formación de “biofilm” es a través de la unión de esta glicoproteína a las OMPs de la bacteria y principalmente a porinas, de acuerdo a este estudio teórico.

Palabras clave: *M. haemolytica*, proteínas de membrana externa, Lactoferrina, interacción.

ABSTRACT

Objective: To determine by in silico studies the effect of bovine lactoferrin (bLf) on the adhesion and “biofilm” formation of *Mannheimia haemolytica* serotype A2.

Methods: The interaction of bLf with outer membrane proteins (OMPs) of *M. haemolytica*, which are responsible for its interaction with the host and part of its pathogenicity, as well as similar proteins of different Gram-negative bacteria. This interaction was determined employing the molecular docking' technique.

Results: Lactoferrin interacted with OMPs through hydrophobic interactions of both *M. haemolytica* and other Gram-negative bacteria with which similarity was found, having a higher affinity for porins. The amino acids that participate in these interactions are those that make up the amino-terminal end of bLf.

Conclusions: The main mechanism by which bLf could be preventing the adhesion of *M. haemolytica* to the host cells and the formation of “biofilm” is through the binding of this glycoprotein to the OMPs of the bacteria and mainly to porins, according to this theoretical study.

Keywords: *M. haemolytica*, outer membrane proteins, lactoferrin, docking.

Introducción

Las enfermedades respiratorias de bovinos y ovinos son responsables de enormes pérdidas económicas para las industrias láctea y de carne debido a la alta tasa de mortalidad, costos exhaustivos de tratamiento y prácticas de prevención (Hussain *et al.*, 2017). La tasa de incidencia de neumonía en corderos varía del 10 al 40%, mientras que la mortalidad supera el 20%; siendo estos porcentajes mayores en corderos jóvenes (Ramirez-Rico *et al.*, 2017). El principal agente causal de neumonía en ovinos es la bacteria *Mannheimia haemolytica* serotipo A2, patógeno oportunista perteneciente a la familia Pasteurellaceae. *M. haemolytica* posee factores de virulencia que favorecen su patogenicidad, estos son cápsula, fimbrias, lipopolisacárido (LPS), leucotoxina (Lkt), una proteasa específica de IgA, neuraminidasa, sialoglicoproteasa y su capacidad para formar "biofilm". Además, posee OMPs cuya función en la supervivencia de la bacteria es estabilizar la membrana, permitir el paso de sustratos y de iones esenciales para su crecimiento y participar en la adhesión de la bacteria y la formación de "biofilm". Debido al impacto económico que trae consigo la manheimiosis y a que en campo se han encontrado bacterias resistentes a varios de los antimicrobianos utilizados, se ha optado por la búsqueda de terapias alternativas a los antibióticos. Una opción es el uso de Lactoferrina (Lf), proteína de fase aguda del sistema inmune innato de los mamíferos, que ha mostrado tener efecto bactericida contra diferentes patógenos; sin embargo, el mecanismo por el cual causa su efecto no se conoce del todo. En este estudio, se analizaron las OMPs de *M. haemolytica* A2 responsables de su interacción con el hospedero y por consiguiente su contribución a su patogenicidad; mediante estudios *in silico* se analizó la interacción de la Lf con estas proteínas. Nuestros resultados muestran que la Lf de origen bovino (Lfb) tiene gran afinidad hacia las OMPs de *M. haemolytica*, sugiriendo que estas interacciones podrían ser la forma por la cual Lfb ejerce su efecto en contra de los mecanismos de patogenicidad de *M. haemolytica*.

Bacterias Gram-negativas

La envoltura celular de las bacterias Gram-negativas consta de dos membranas, la membrana externa (ME) y la membrana interna (MI) o citoplasmática. La MI está compuesta por una bicapa de fosfolípidos, mientras que la ME comprende una capa interior de fosfolípidos y una capa exterior de LPS; El LPS está compuesto por lípido A, el oligosacárido central y el antígeno O que se encuentra hacia la superficie (*Schwechheimer & Kuehn, 2015*).

Entre las dos membranas se encuentra el periplasma, que contiene la capa de péptidoglicano (PG), proteínas en tránsito hacia la ME y proteínas periplásmicas. La capa de PG comprende polímeros largos de repetido de disacárido N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico (NAG-NAM) que se enlazan a través de puentes peptídicos: tanto tradicionales 4-3 [D-Ala-ácido meso diaminopimérico (mDAP)], como no tradicionales 3-3 (mDAP – mDAP) (*Schwechheimer & Kuehn, 2015*).

Las proteínas de la envoltura pueden ser solubles (periplásmicas), transmembranales, o ancladas en la cubierta de cualquiera de las membranas a través de apéndices lipídicos unidos covalentemente (lipoproteínas). La estabilidad de la envoltura se debe a varios enlaces cruzados: el entrecruzamiento covalente de la lipoproteína de Braun (Lpp), que ancla la ME al PG; las interacciones no covalentes entre el PG y las porinas, como la proteína A de la ME (OmpA); y las interacciones no covalentes entre el PG y el complejo Tol-Pal (lipoproteína asociada a PG), que se compone de TolA, TolB, TolQ, TolR y Pal, y se extiende desde la MI a través del periplasma hasta la ME (*Schwechheimer & Kuehn, 2015*), como se puede observar en la Fig. 1.

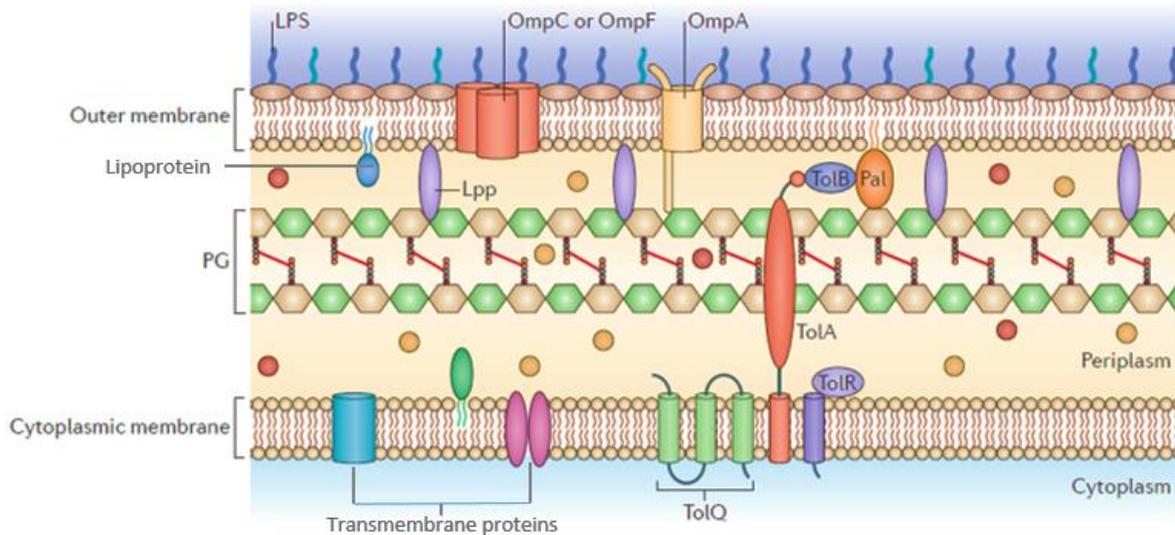


Figura 1. Composición de la envoltura celular de bacterias Gram-negativas (Schwechheimer & Kuehn, 2015).

Familia Pasteurellaceae

La familia Pasteurellaceae (orden Pasteurellales, clase Gammaproteobacteria) comprende un grupo muy heterogéneo de bacterias Gram-negativas; La familia Pasteurellaceae contiene 25 géneros: *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Avibacterium*, *Basfia*, *Bibersteinia*, *Bisgaardia*, *Chelonobacter*, *Cricetibacter*, *Frederiksenia*, *Gallibacterium*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Lonepinella*, *Mannheimia*, *Mesocricetibacter*, *Muribacter*, *Necropsobacter*, *Nicoletella*, *Otariodibacter*, *Pasteurella*, *Phocoenobacter*, *Testudinibacter*, *Ursidibacter*, *Vespertiliibacter*, y *Volucribacter* (Michael et al., 2018).

Mannheimia haemolytica

M. haemolytica es un miembro de la familia Pasteurellaceae. Fue nombrado por primera vez en 1885 como *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt, pero en 1932 se cambió su nombre a *Pasteurella haemolytica*, para reflejar su fenotipo débilmente hemolítico en placas de agar sangre de oveja (Rice et al., 2007). Finalmente el nombre *Mannheimia* se le dio en homenaje a Walter Mannheim, un biólogo alemán cuya investigación ha mejorado la comprensión de la taxonomía de

la familia Pasteurellaceae (Zecchinon et al., 2005). *M. haemolytica* es un cocobacilo Gram-negativo, inmóvil, no formador de esporas, anaerobio facultativo (Rice et al., 2007) con un tamaño aproximado de 0,2 µm por 2,0 µm. Esta bacteria es generalmente oxidasa positiva, reductora de nitrato y fermentadora de algunos carbohidratos (Snyder & Credille, 2020).

M. haemolytica es generalmente comensal del tracto respiratorio superior de rumiantes, habitando en la nasofaringe y las amígdalas en ganado clínicamente sano, pero es un patógeno oportunista bajo ciertas condiciones (Hussain et al., 2017). Puede aislarse de los corderos poco después del nacimiento (Rowe & I R Poxton, 2001). *M. haemolytica* fue clasificada en dos biotipos, A y T, según su capacidad para fermentar arabinosa y trehalosa, respectivamente (Zecchinon et al., 2005). Sin embargo, las cepas que alguna vez fueron reconocidas como el biotipo T de *M. haemolytica* ahora se clasifican como una especie separada, llamada *Pasteurella trehalosi* y a diferencia de *M. haemolytica*, que se presenta en bovinos y ovinos, *P. trehalosi* infecta solo a los ovinos y causa una enfermedad sistémica que es patológicamente distinta de la pasteurelosis neumónica (Davies et al., 2002).

M. haemolytica se clasifica en al menos 12 serotipos de acuerdo al antígeno capsular (1, 2, 5-9, 12-14, 16 y 17); estos serotipos capsulares contribuyen a la especificidad y patogenicidad de la bacteria en el hospedero. *M. haemolytica* es la principal causa de pasteurelosis neumónica (mannheimiosis) en rumiantes (Snyder & Credille, 2020). Ambos serotipos A1 y A2 colonizan el tracto respiratorio superior de bovinos y ovinos (Rice et al., 2007). En particular, *M. haemolytica* A2 es la principal causa de mannheimiosis neumónica en ganado ovino y caprino. Esta bacteria produce varios factores de virulencia, que en conjunto conducen a una pleuroneumonía fibrinosa aguda en ovejas. El diagnóstico preciso de *M. haemolytica* se basa principalmente en el examen bacteriológico, las características bioquímicas, la biotipificación y la serotipificación de los aislados (Fez Firdaus et al., 2019).

Patogenicidad de *Mannheimia haemolytica*

M. haemolytica posee numerosos mecanismos de patogenicidad que permiten la invasión y colonización bacteriana que conducen a una lesión pulmonar. La patogenicidad de la bacteria es mediada por diversos componentes bacterianos, incluyendo la Lkt; el LPS; la cápsula; algunas OMPs; lipoproteínas de membrana; adhesinas; fimbrias; enzimas (neuraminidasa, metaloglicoproteasas y proteasas que degradan IgA e IgG) y plásmidos de resistencia a los antimicrobianos (Samaniego-Barron et al., 2016).

Factores de virulencia de *M. haemolytica*

Cápsula

La envoltura celular de *M. haemolytica* está rodeada por una capa de polisacárido (PC) que se ha implicado en una serie de funciones, incluida la adherencia de la bacteria a las superficies alveolares, la inhibición de la muerte mediada por el complemento y la inhibición de las actividades fagocíticas y bactericidas de los neutrófilos (Hounscome et al., 2011). La cápsula de serotipo A2 está compuesta de un homopolímero de ácido siálico, N-acetilneuramínico (Neu5Ac), enlaces α (2-8) (St Michael et al., 2011). Las cápsulas de ácido siálico no son inmunogénicas, ya que el ácido siálico es un componente normal de las membranas del hospedero (Highlander, 2001).

Lipopolisacárido

El LPS, también llamado endotoxina, de *M. haemolytica* es capaz de alterar las funciones de los leucocitos y causar la lisis de las plaquetas sanguíneas (Fez Firdaus et al., 2019). El LPS es responsable de la inducción de IL-1 beta e IL-8 a través de TNF-alfa, lo que conduce a la entrada de neutrófilos, provocando inflamación; además, daña las células endoteliales pulmonares bovinas (Highlander, 2001).

Leucotoxina

El más importante de los factores de virulencia de *M. haemolytica* es la leucotoxina (Lkt), miembro de la familia RTX de toxinas de bacterias Gram-negativas, la cual se secreta principalmente durante la fase de crecimiento logarítmico bacteriano. La Lkt

es una proteína soluble termolábil de 104 kDa, que es tóxica para los macrófagos, leucocitos y eritrocitos de rumiantes (*Avalos-Gomez et al., 2020*). La Lkt forma poros en la membrana de la célula hospedera, a altas concentraciones, provocando una rápida inflamación y lisis celular. Sin embargo, a concentraciones bajas o sublétricas, la Lkt provoca activación de neutrófilos, producción de citocinas inflamatorias, desgranulación y generación de radicales libres derivados del oxígeno y cambios morfológicos compatibles con apoptosis (*Davies et al., 2002*).

La Lkt interactúa con el “cluster” de diferenciación 18 (CD18) sobre la superficie de neutrófilos, macrófagos, plaquetas y linfocitos ovinos. Al estar en contacto los neutrófilos con la Lkt, éstos se desgranulan y liberan enzimas digestivas en el tejido adyacente. La Lkt actúa en sinergia con el LPS de la bacteria; la exposición a la endotoxina regula de manera positiva la expresión de CD18 sobre la superficie de las células inflamatorias provocando la presencia de más células con gran afinidad para la Lkt (*Snyder & Credille, 2020*). El operón de leucotoxina consta de cuatro genes contiguos denominados *lktCABD*. El gen *lktA* codifica la protoxina inactiva, el gen *lktC* es necesario para la activación postraduccional de la protoxina antes de la secreción, y los genes *lktB* y *lktD* son necesarios para la secreción de la toxina del organismo (*Davies et al., 2002*). Un esquema de la organización del operón *lkt* se muestra en la Fig. 2.

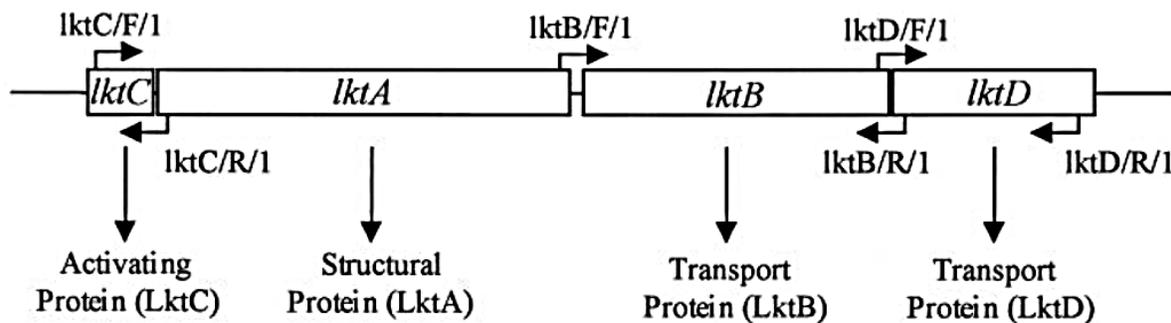


Figura 2. Operón *lktCABD* de *Mannheimia haemolytica*: estructura y función.
(*Davies et al., 2002*)

Proteínas de membrana externa

M. haemolytica OmpA, originalmente llamada PomA, es una proteína de aproximadamente 30 kDa, modificable por calor, expuesta a la superficie, altamente inmunogénica, con actividad de porina, y como miembro de la familia de proteínas OmpA, comparte homología parcial con las OMPs modificables por calor de numerosas bacterias (Confer & Ayalew, 2018). Además, Samaniego, et, al. identificaron una OMP de *M. haemolytica* A1 de 34,2 kDa, como porina (Samaniego-Barron et al., 2016). Se ha caracterizado también una proteína de tipo amiloide de membrana externa (ALP) de aproximadamente 50 kDa expresada por *M. haemolytica* como parte de sus biopelículas (Montes Garcia et al., 2018). También se ha identificado a la lipoproteína PlpE de membrana externa de 45 kDa expuesta a la superficie, en la cual la adsorción de anticuerpos séricos con PlpE recombinante redujo la muerte de *M. haemolytica* mediada por el sistema del complemento. La proteína se denominó PlpE, porque era la quinta lipoproteína asociada con la ME de *M. haemolytica*, siendo PlpA-C, tres lipoproteínas contiguas de 28-30 kDa y PlpD una lipoproteína de 31 kDa (Confer & Ayalew, 2018).

Proteínas de unión a hierro

La adquisición de hierro a partir de la transferrina es un mecanismo principal de sobrevivencia utilizado por *M. haemolytica*. Se han identificado dos proteínas de 100 y 71 kDa apenas detectables en células cultivadas en condiciones de abundancia de hierro, pero presentes en cantidades mayores en las células con restricción de hierro y otra proteína de 77 kDa en las células con restricción de hierro pero no en las repletas de hierro, implicadas en la unión de la transferrina (Confer & Ayalew, 2018; Deneer & Potter, 1989).

Adhesinas

La adherencia de patógenos respiratorios al epitelio de la mucosa es un paso inicial crítico en la colonización e infección del hospedero. Proteínas conocidas como adhesinas, facilitan la adhesión bacteriana tanto a superficies inanimadas como a células del hospedero. Se han descrito algunas adhesinas de *M. haemolytica*, entre ellas, la proteína A de la ME (OmpA) y la lipoproteína 1 (Lpp1) son dos adhesinas bacterianas que se unen a las células epiteliales respiratorias bovinas *in vitro*

(Kisiela & Czuprynski, 2009). La OmpA ha estado también implicada en la colonización del tracto respiratorio por *M. haemolytica* (Boukahil & Czuprynski, 2015). Esta proteína también se conoce como Omp modificable por calor o, en *M. haemolytica*, PomA. OmpA participa en la unión específica a los receptores celulares y media la adherencia de varias bacterias patógenas a las células del hospedero. Sobre la base de la homología de secuencia, se ha sugerido que la OmpA de *M. haemolytica* podría desempeñar un papel en la colonización de las vías respiratorias de ganado vacuno y ovino (Kisiela & Czuprynski, 2009). Así mismo, se ha reportado la purificación de una adhesina de 68 kDa de *M. haemolytica*, cuya secuencia N-terminal es ANEVNVYIYKQPPLYI, específica para N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y N-acetil ácido neurámico (NeuAc); esta adhesina puede estar participando en la adhesión de la bacteria a las células traqueales (Jaramillo et al., 2000).

Fimbrias

M. haemolytica presenta al menos dos tipos de fimbrias. La primera es una estructura rígida y no flexible de gran diámetro (12 nm) que fue observada en preparaciones proyectadas en sombras por microscopía electrónica. La segunda, una estructura más pequeña (-5 nm) y más flexible que fue visible en células teñidas negativamente; ambas podrían estar actuando como factores de unión primarios a las células epiteliales de la mucosa nasofaríngea y las tonsilas, participando en la iniciación y perduración de la colonización bacteriana del tracto respiratorio (Morck et al., 1987).

Proteasas

M. haemolytica es capaz de expresar y secretar una serie de dos proteasas específicas que escinden la IgA y evitan que se una al patógeno. El efecto final de estas proteasas es prevenir la opsonización o la muerte mediada por el complemento (Ayalew et al., 2019).

Sialoglicoproteasa

La sialoglicoproteasa es una enzima responsable de la liberación del sialoglicopéptido, la cual es una proteasa neutra dependiente de metales y específica para las sialoglicoproteínas (Otulakowski et al., 1983). Esto fue

comprobado posteriormente, donde se identificó que los serotipos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 12 de *M. haemolytica* contienen una actividad de glucoproteasa que degrada la glucoforina A; esta glucoproteasa es inmunogénica y puede tener un papel en la inducción de una respuesta inmune protectora contra este patógeno (Abdullah, 1990).

Neuraminidasa

Se han propuesto al menos dos mecanismos para la adhesión y colonización de la mucosa mediada por la neuraminidasa producida por *M. haemolytica*. En primer lugar, reduce la viscosidad del moco respiratorio y, por lo tanto, altera la eficacia de depuración de la capa mucociliar, lo que provoca una penetración más profunda de las bacterias en el epitelio respiratorio. En segundo lugar, escinde los residuos de ácido siálico en la superficie epitelial y disminuye la carga negativa neta, lo que permite una aproximación bacteriana más cercana a la superficie celular (Jeyaseelan et al., 2002).

Biofilm

Las biopelículas o “biofilms” son una comunidad de bacterias que se adhieren a superficies inertes o vivas. Una vez adheridas, las bacterias producen una matriz de exopolisacáridos para encerrar la biopelícula y protegerla contra la respuesta inmune del hospedero, de bacteriófagos y los antibióticos (Angulo-Zamudio et al., 2019). Se ha demostrado que las bacterias dentro de una biopelícula pueden ser más resistentes a los antibióticos que las células planctónicas. Como resultado, los “biofilms” plantean una preocupación adicional cuando se tratan infecciones con antibióticos. Varios miembros de la familia Pasteurellaceae son capaces de producir “biofilms”, mecanismo crucial para la persistencia de estos microorganismos, entre estos, *M. haemolytica* (Hathroubi, 2018). En previos estudios se ha mostrado que *M. haemolytica* forma biopelículas en plástico *in vitro*, requiriendo al menos 36 h para formar “biofilms” robustos, con una formación máxima a las 48 h (Boukahil & Czuprynski, 2016) y su caracterización indica que contienen carbohidratos (0.81 ug/cm²), proteínas 9.7 (ug/cm²) y ADN (0.47 cm²) como sus principales constituyentes (Montes Garcia et al., 2018); así como también se ha demostrado la capacidad de *M. haemolytica* para formar biopelículas en las células epiteliales

respiratorias bovinas (*Boukahil & Czuprynski, 2016*). La capacidad de *M. haemolytica* para formar biopelículas en las vías respiratorias le ayuda a adaptarse y sobrevivir a ambientes hostiles, además de protegerse de la exposición de antimicrobianos y respuestas del sistema inmune del hospedero (*Snyder & Credille, 2020*).

Mannheimiosis neumónica

En general, la enfermedad clínica causada por este microorganismo en el ganado bovino y ovino es el resultado de una combinación de estrés, infecciones concurrentes que involucran a otros patógenos respiratorios, cambios marcados en las condiciones climáticas, como lluvia y vientos fuertes, inmunosupresión e infección viral que, en última instancia, conduce a un crecimiento excesivo de *M. haemolytica* en las vías respiratorias inferiores de los animales individuales (*Scott, 2011*); (*Hussain et al., 2017*). Entre estos factores de riesgo destaca el estrés por transporte. Los terneros transportados a largas distancias están expuestos a humos de diésel, enfriamiento o sobrecalentamiento, dependiendo de las condiciones climáticas, deshidratación, inanición y agotamiento. Una vez en el corral de engorda, los factores estresantes adicionales incluyen el procesamiento, la mezcla adicional con otros animales, los ambientes polvorientos y la introducción de nuevos alimentos y agua (*Griffin et al., 2010*). Estos factores parecen alterar el epitelio del tracto respiratorio superior permitiendo que *M. haemolytica* lo colonice, migre y así se mueva de la nasofaringe a los pulmones, dando lugar a una neumonía de tipo bronco-alveolar que se acompaña de alta morbilidad y mortalidad (*Zecchinon & Fett, 2005*).

El ganado infectado revela signos clínicos que incluyen disnea, salivación y pirexia (*Hussain et al., 2017*), siempre hay algún grado de depresión y anorexia, fiebre de hasta 42 °C, aumento de la frecuencia cardíaca, una pérdida sustancial de peso y rinitis que resulta en una secreción nasal mucopurulenta o un hocico seco e incrustado. A menudo hay aumento de lagrimeo y tos. La frecuencia respiratoria aumenta en las primeras etapas, seguida de disnea, de tal gravedad que provoca respiración oral y gruñidos respiratorios en algunos casos (*Zecchinon et al., 2005*).

Histológicamente, los alvéolos están inundados con exudado rico en fibrina, un infiltrado variable de neutrófilos y macrófagos y las tradicionales "células de avena" que están aplanadas y fluyen macrófagos necróticos dentro de los alvéolos afectados. Los bronquiolos a menudo se conservan o contienen exudado rico en fibrina que puede extenderse desde los alvéolos (*Confer, 2009*). La manheimiosis neumónica se transmite de manera contagiosa de un animal a otro dentro de una población (*Zecchinon et al., 2005*) con una mortalidad que a menudo ocurre dentro de las 48 horas después de la observación de los síntomas iniciales (*Highlander, 2001*).

Control de la manheimiosis neumónica

Debido al impacto económico que la manheimiosis neumónica trae consigo y a la falta de una vacuna eficaz, se han buscado opciones para contrarrestar esta enfermedad. Las pruebas de aislados de *M. haemolytica* A2 de animales con manheimiosis han revelado proporciones crecientes de resistencia a los antimicrobianos (*Avalos-Gomez et al., 2020*). Por lo tanto, se ha llevado a cabo el estudio de la Lf, la cual es proteína de la leche materna que ha mostrado tener función protectora para el hospedero, ejerciendo su efecto como antimicrobiana. (*Wang et al., 2019*).

Lactoferrina

La Lf es una proteína globular glicosilada de cadena sencilla de polipéptido, con un peso molecular de alrededor de 78 KDa. La Lf humana cuenta con 691 aa y la Lf bovina con 689 aa. La Lf fue aislada y descrita por primera vez de la leche bovina en 1939. La estructura terciaria de la Lf consiste de dos lóbulos (lóbulo C y lóbulo N) unidos por una α -hélice; estos lóbulos se dividen a su vez en dos subdominios (N1 y N2; C1 y C2) de tamaño similar. Se ha definido como proteína de unión a hierro debido a que secuestra iones libres (principalmente Fe^{3+}) y, por tanto, se incluye en el grupo de metaloproteínas. Basada en los niveles de saturación de hierro, se encuentra como apo-Lf en ausencia de hierro, como Lf monoférrica con un ion férrico y como holo-Lf cuando contiene dos iones férricos (*Wang et al., 2019*).

Lf se encuentra en las secreciones de mamíferos como la leche materna (especialmente en el calostro); en humanos se ha demostrado su presencia también en secreciones como, el líquido seminal, las secreciones uterinas, las lágrimas y la saliva (Wang *et al.*, 2019). La Lf es sintetizada por diferentes poblaciones de células, incluidos neutrófilos (linfocitos polimorfonucleares), macrófagos y células epiteliales glandulares (Moreno-Exposito *et al.*, 2018). Una característica importante de Lf es la producción de péptidos catiónicos llamados lactoferrinas (Lfcins) derivados de la escisión del extremo N-terminal por la pepsina gástrica, los cuales han sido estudiados por sus efectos antimicrobianos. Un péptido de quimera, obtenido al fusionar Lfcin17-30 de bovino y lactoferrampina (Lfampin) 265-284, también ha sido probado como antimicrobiano (Luna-Castro *et al.*, 2017). La estructura de holo-Lf se representa en la Fig. 3.

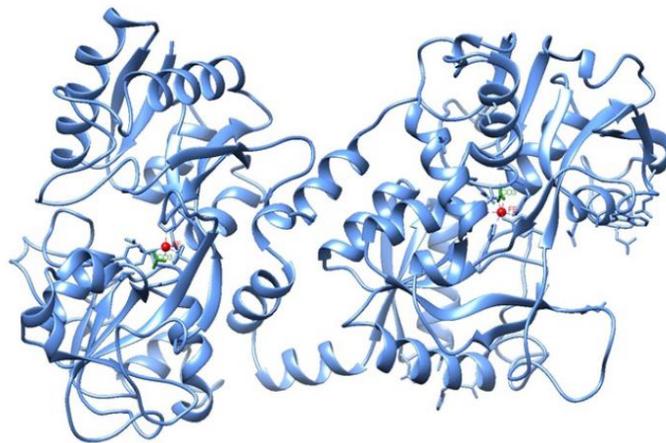


Figura 3. Estructura tridimensional de la holo-Lf bovina.

La molécula de Lfb se representa en azul, los átomos de Fe en rojo y los iones carbonato en verde.

(Luna-Castro *et al.*, 2017)

Funciones de la Lactoferrina

La Lf tiene un papel clave en el sistema de defensa del hospedero, esto se ha demostrado por el incremento en el contenido de Lf en fluidos corporales durante una inflamación (Wang *et al.*, 2019). También la alta concentración de Lf en su forma ausente de hierro dentro de los gránulos específicos de los neutrófilos, la exocitosis

de una porción de la reserva de gránulos específicos durante la respuesta de los neutrófilos a la inflamación y la incorporación de gránulos específicos en el fagolisosoma de los neutrófilos, sugirieron que Lf contribuye significativamente a la función de esta célula inflamatoria clave (*Ellison, 1994*). Su actividad anti-inflamatoria puede atribuirse a la carga positiva de su superficie, ya que es una proteína catiónica. Lf interactúa con motivos cargados negativamente sobre la superficie de las células inmunes; esta asociación desencadena vías de señalización, que llevan a una respuesta fisiológica anti-inflamatoria (*Wang et al., 2019*). Una de las principales funciones de Lf a nivel del sistema inmune es interactuar con células presentadoras de antígeno, incluyendo macrófagos, células dendríticas y linfocitos B (*Moreno-Exposito et al., 2018*).

Los macrófagos tienen un papel esencial controlando la infección, por medio de la destrucción de microorganismos intracelulares o inhibiendo su replicación a través de la secreción de citocinas o mediadores como óxido nítrico (NO). Éstos también están involucrados en inflamación, secretando mediadores inflamatorios y citocinas proinflamatorias, las cuales participan en la reparación de tejido como paso final del proceso inflamatorio. Los macrófagos son activados por interacción con la Lf por medio de sus receptores, de esta manera incrementa su capacidad fagocítica y la síntesis de IL-12, molécula que atrae más macrófagos al sitio de inflamación y activa los linfocitos T CD4+. Las células dendríticas (CD) controlan la inducción de inmunidad y tolerancia; la interacción de Lf con las CD a través de los receptores de superficie induce su maduración y actividad funcional. La Lf actúa sobre los linfocitos B y otras células presentadoras de antígenos activando y acelerando el procesamiento de antígeno, habilitando la interacción y activación de las células T. La presencia de Lf saturada con hierro estimula la diferenciación y maduración de linfocitos B incrementando su capacidad para presentar linfocitos T, de esta manera es como Lf ejerce su función inmunomoduladora sobre las células presentadoras de antígeno, en general, provocando su activación, maduración y migración al sitio de inflamación (*Moreno-Exposito et al., 2018*).

El efecto antiviral de Lf y sus mecanismos de acción han sido estudiados con diferentes virus que causan enfermedades humanas o pueden transmitirse de animales a humanos; se conocen dos mecanismos principales por los cuales Lf inhibe la infección viral: uno es por unión directa a partículas virales y otro por el bloqueo de los receptores del virus en la célula huésped (*Luna-Castro et al., 2017*).

La Lf ha mostrado tener efecto en contra de una variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Este efecto bactericida está directamente relacionado con la interacción de Lf con la superficie de la bacteria. Esta proteína inhibe la adhesión bacteriana a las células del hospedero ocupando la superficie de las células bacterianas (*Wang et al., 2019*). Lf puede interferir con la adhesión bacteriana al unirse al LPS, inhibiendo así uno de los factores de virulencia más importantes de estos microorganismos. Se sabe que la interacción de Lf con el LPS o con algunas proteínas de la membrana bacteriana mejora el efecto de bactericidas naturales como las lisozimas, que se secretan en altas concentraciones junto con Lf en la mucosa (*Moreno-Exposito et al., 2018*).

En estudios *in vitro* se ha observado que en *E. coli* enteropatogénica la Lf suprime la adhesión de la bacteria a células HEP-2 en un 88% (*Flores-Villaseñor et al., 2012*). También, se ha observado el efecto inhibitorio de la Lf en la adherencia de *E. coli* enterotoxigénica a células epiteliales humanas (*Kawasaki et al., 2000*). Además, nuestro grupo de investigación reportó que apo-bLf disminuyó la adherencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, miembro de la familia *Pasteurellaceae*, a células epiteliales bucales porcinas (*Luna-Castro et al., 2014*).

Por otro lado, se ha demostrado la capacidad de Lf para reducir la formación de "biofilm" de diferentes bacterias. Un estudio *in vitro* ha reportado que el tratamiento con Lf reduce la formación de "biofilm" de *E. coli* de un 95-98%, mientras que en *Klebsiella pneumoniae* esta reducción se observó en un 100% (*Sheffield et al., 2012*). Además, Lf quimera, un péptido heterodimérico que contiene lactoferrampina (LFampin265–284) y lactoferricina (LFcin17–30), en combinación con doxiciclina fue capaz de reducir la biomasa, el grosor de "biofilm" y el sustrato que recubre al biofilm en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bacteria perteneciente a la

familia Pasteurellaceae (*Carmela et al., 2019*). En *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, holo-bLf fue capaz de inhibir la formación de “biofilm” de tres cepas entre un 60-74%; mientras que apo-bLf inhibió la formación de solo dos cepas en un 50-75% (*Luna-Castro et al., 2014*).

JUSTIFICACIÓN

M. haemolytica serotipo A2 es una bacteria oportunista de ovinos capaz de colonizar el tracto respiratorio superior y migrar hacia los pulmones. Esta bacteria posee diferentes mecanismos de patogenicidad que permiten su invasión y colonización y contribuyen a la enfermedad pulmonar.

Debido a la alta mortalidad del ganado infectado y a que *M. haemolytica* ha mostrado resistencia a múltiples antibióticos, se han buscado opciones eficaces para contrarrestarla.

La Lf ha mostrado tener efecto bactericida contra *M. haemolytica*; sin embargo, el mecanismo por el cual causa su efecto aún no se conoce del todo. Debido a que la adhesión de *M. haemolytica* a las células epiteliales del tracto respiratorio es el primer paso para la colonización y que su capacidad para formar "biofilm" le ayuda a sobrevivir en ambientes hostiles, es importante conocer cómo podría estar actuando la Lf sobre estos mecanismos de patogenicidad, ya que esto nos permitirá un uso eficaz de esta proteína en el tratamiento de la manheimiosis neumónica.

HIPÓTESIS

La Lf bovina ejercerá su efecto bactericida contra *M. haemolytica* al inhibir la adhesión de la bacteria a las células epiteliales del tracto respiratorio del ovino y al inhibir la producción de “biofilm”, a través de la unión a proteínas de la membrana externa.

OBJETIVO GENERAL

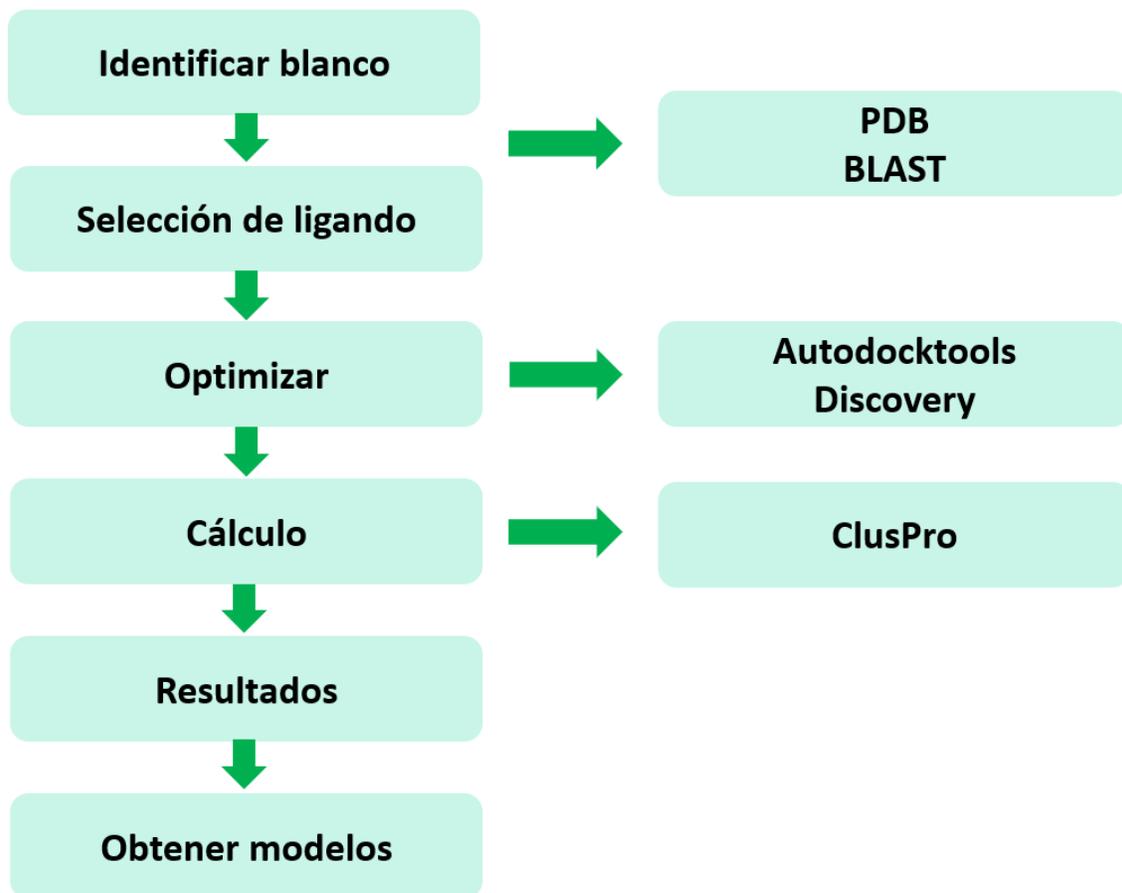
Determinar por estudios *in silico* el efecto de la Lf bovina sobre la adhesión y la formación de “biofilm” de *M. haemolytica*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las proteínas blanco para Lf implicadas en el proceso de adhesión y formación de “biofilm” de *M. haemolytica*.
- Realizar alineamientos de las secuencias de proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* y de proteínas de otros microorganismos para comparar similitudes.
- Modelar estructuras de proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*.
- Optimizar las diferentes estructuras de las proteínas modeladas y cristalizadas.
- Determinar la afinidad de la Lf con las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* y de los microorganismos similares por medio de la técnica de acoplamiento molecular (*docking*).

METODOLOGÍA:

El “*Docking*” molecular es una técnica que muestra la interacción ligando-receptor. En este estudio tanto el ligando como el receptor son proteínas, por lo que buscaremos la interacción proteína-proteína; para ello, hicimos uso de diferentes herramientas bioinformáticas. Para cumplir con nuestros objetivos nos planteamos la siguiente metodología:



Identificación de las proteínas blanco de *M. haemolytica* que interaccionan con Lf. Se realizó la búsqueda del ligando (Lf) en la base de datos PDB (*protein data bank*) <https://www.rcsb.org/> para obtener su estructura cristalizada; así como también los posibles blanco, las OMPs de *M. haemolytica* de interés. Sin embargo, debido a que estas proteínas no han sido del todo estudiadas no se tiene la estructura cristalizada en la base de datos, por lo que realizamos la búsqueda de OMPs similares a las de *M. haemolytica*. Para ello, utilizamos la herramienta BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, en el cual colocamos la secuencia formato FASTA obtenida por la búsqueda en GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> de la proteína de nuestro interés de *M. haemolytica*, con el fin de que al realizar los alineamientos nos proporcione la lista de proteínas similares y así escoger la de mayor puntaje de identidad, pero además buscar la proteína en PDB para asegurar tener la estructura cristalizada, ya que no todas las proteínas han sido cristalizadas.

Esto se realizó con el fin de poder tener un molde en el cual poder guiarnos y comparar los valores obtenidos con algo ya realizado y poder justificar así los resultados obtenidos. Las proteínas para analizar que de acuerdo con los alineamientos realizados resultaron tener gran similitud con las OMPs de *M. haemolytica* y que ya han sido cristalizadas son: porina OmpK37 de *K. pneumoniae*, porina OmpF de *E. coli*, OmpW de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *P. oleovorans*, Omp de *H. influenzae* y Lipoproteína de *E. coli* y *N. meningitidis*.

Proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*

Para poder evaluar la interacción entre Lf y OMPs de *M. haemolytica*, tuvimos que realizar simulaciones de las estructuras, ya que no se encuentran las estructuras cristalizadas de las OMPs en la base de datos. Para ello, utilizando el software Jalview <https://www.jalview.org/>, se realizaron alineamientos de secuencia múltiple por medio de MAFFT para obtener proteínas de interés; los alineamientos los realizamos comparando las secuencias proporcionadas y dejando espacios en las secciones en donde no se encuentra similitud entre éstas, pero siempre llevando el orden de cada una de las secuencias.

Una vez identificadas las proteínas a analizar, se realizó la búsqueda de éstas en *GenkBank* para obtener las secuencias en formato FASTA de cada una. Posteriormente, se realizó la predicción de las estructuras de estas proteínas; ésto se llevó a cabo utilizando el servidor *I-TASSER* <https://zhanglab.dcmf.med.umich.edu/I-TASSER/>, el cual, de acuerdo a la secuencia que le proporcionamos realiza dos alineamientos, uno de ellos de acuerdo a secuencia de aminoácidos y otro de acuerdo a estructura, construyendo así los modelos de la proteína a analizar, arrojando un total de cinco modelos 3-D, de éstos de acuerdo a las estructuras ya obtenidas de las OMPs cristalizadas, se eligió el apropiado.

Optimización de proteínas

Previo al análisis de interacciones, se realizó un tratamiento a cada una de las estructuras de las proteínas ya identificadas obtenidas de la base de datos, este consiste en ediciones en la proteína con la finalidad de evitar sesgos en nuestros resultados de interacciones. Las herramientas *AutoDockTools* <http://autodock.scripps.edu/resources/adt> y *Discovery* <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>, visualizadores que permiten editar y diseñar estructuras de proteínas, se utilizaron para la optimización de cada una de las proteínas blanco, así como de Lf. Una vez tratadas estas proteínas se procede a buscar interacción ligando-receptor.

Interacción proteína-proteína

Para buscar interacción entre la Lf y las proteínas simuladas de *M. haemolytica*, así como de las proteínas cristalizadas similares de otras bacterias, se utilizó el servidor *ClusPro* <https://cluspro.bu.edu/login.php>, al cual se le especifica la proteína ligando (Lf) y la proteína receptora (OMP) y se envía al servidor cada par de estas proteínas ya previamente tratadas para su análisis. El servidor *ClusPro* realiza el análisis buscando afinidad en diferentes zonas de las proteínas (Lf y la OMP a analizar) arrojando valores en negativo de cada zona, ya que la medición la realiza con valor de la energía libre de Gibbs, por lo tanto, entre mayor sea el valor negativo, mejor es la afinidad entre esas proteínas; de igual manera arroja valores de acuerdo a cada una de las uniones dadas, como son: interacciones por puentes de hidrógeno,

interacciones hidrofóbicas e interacciones de Van Der Waals, para poder conocer también el tipo de interacción que predomina en cada unión de las proteínas analizadas. Además, proporciona los modelos de las interacciones de proteínas para poder visualizar como se están dando estas uniones.

Obtención de modelos

Debido a que los modelos de las interacciones de las proteínas proporcionados por *ClusPro* solo son una vista previa y no se pueden editar para una mejor visualización, se hizo uso de las herramientas *AutoDockTools* y *Discovery*, ambos visualizadores fueron necesarios para poder abrir y editar los modelos de las proteínas. Una vez elegido el modelo apropiado, se procedió a darle un diseño; para una clara visualización, el diseño elegido fue *Solid Ribbon* para todos los modelos y a cada proteína (ligando y receptor) se le asignó un color diferente para poder diferenciar entre éstas, también se le dio un fondo transparente y se mejoró la calidad de imagen.

Identificación de los aminoácidos presentes en las interacciones

Debido a que trabajamos con proteínas de gran tamaño, la desventaja es que los programas utilizados no identifican entre la proteína ligando y la proteína receptora, esto no hace posible conocer los aminoácidos de cada proteína presentes en las interacciones. Para ello, realizamos una separación del modelo de proteínas proporcionado por *ClusPro*, esto se realizó seleccionando todos los aminoácidos correspondientes a una sola proteína, por ejemplo, la Lf, los aminoácidos no seleccionados son los correspondientes a la otra proteína, la OMP, por tanto, fueron eliminados, con la finalidad de que solo quedara la Lf y poder guardarla por separado, posteriormente se realizó lo mismo en forma viceversa para guardar ahora la OMP.

Una vez realizado esto, se tienen las proteínas guardadas por separado y procedemos a hacer uso de la herramienta *Discovery* para abrir el receptor, la OMP, e insertar el ligando, la Lf, y nuevamente se tiene el mismo modelo de interacción de las proteínas proporcionado por *ClusPro* pero con la diferencia de que ahora se puede diferenciar entre ligando y receptor, esto hace posible que se pueda

seleccionar el tipo de interacción que deseemos visualizar y los aminoácidos correspondientes a cada proteína presentes en estas uniones.

RESULTADOS

Proteínas receptoras de *M. haemolytica* involucradas en su patogenicidad.

La búsqueda de las OMPs de *M. haemolytica* deseadas se realizó en la base de datos *GenBank* y por medio de alineamientos de secuencias se encontraron otras proteínas de interés para el análisis. En la Tabla 1 se muestran las OMPs de *M. haemolytica*, entre éstas, una porina, la OMP modificable por calor, la OMP de la familia W y algunas lipoproteínas, todas ellas identificadas como posibles receptores a Lf. Se muestra el nombre asignado, peso molecular, número de aminoácidos, el número de acceso a la base de datos y la participación que se le ha atribuido a cada una en la patogenicidad de la bacteria.

| OMPs de <i>M. haemolytica</i> | Masa (kDa) | Aminoácidos | Núm. acceso NCBI | Función |
|-------------------------------|------------|-------------|------------------|---|
| Omp-P2 | 50 | 372 | AGI35167.2 | Formación de "biofilm", adhesión y difusión de metabolitos. |
| OMP | 35 | 132 | TCS87041.1 | Estabilidad a la membrana. |
| OmpW | 30 | 223 | WP_126301821 | Estabilidad a la membrana. |
| Omp-HM | 40.5 | 367 | AAO85791.1 | Adhesión |
| PlpE | 45 | 355 | EEY10223.1 | Evitar muerte mediada por el complemento. |
| Lipoproteína | 30 | 277 | WP_006249127.1 | Adhesión |

Tabla 1. Proteínas de membrana externa de *Mannheimia haemolytica*.

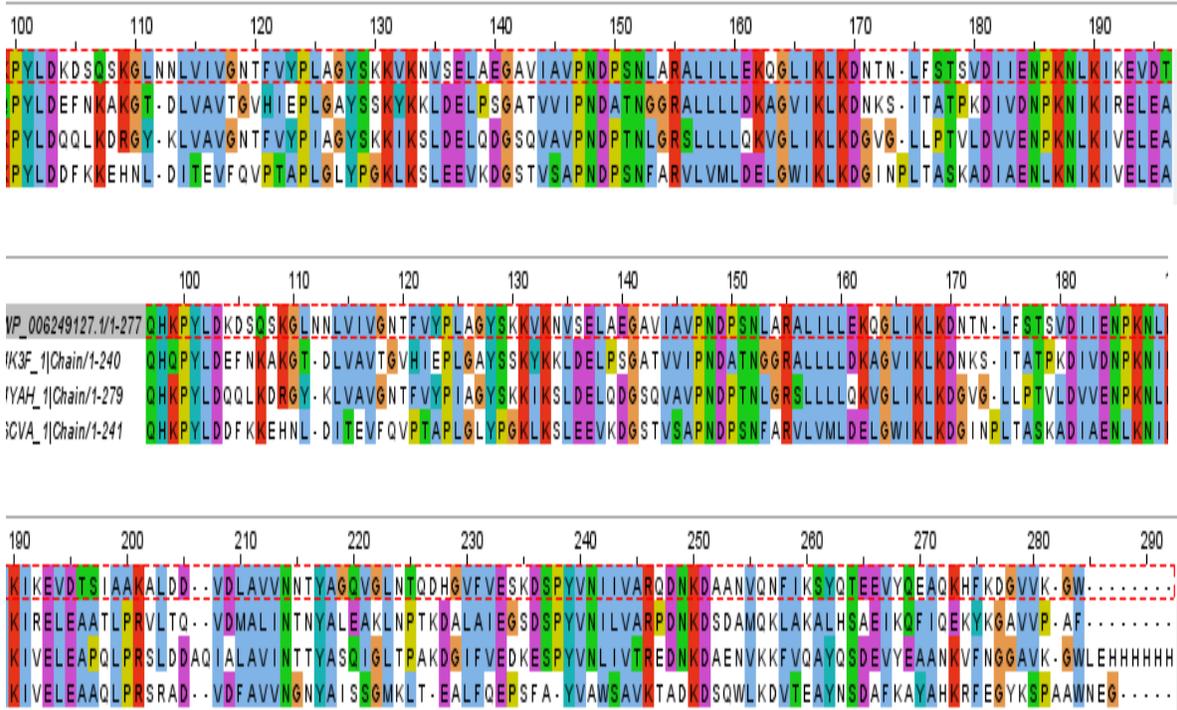


Figura 5. Alineamiento de lipoproteínas de membrana externa de *M. haemolytica* y de otras bacterias (*Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*).

El último alineamiento realizado fue entre OMPs identificadas como proteínas de la familia W (OmpW) o simplemente OMPs de las cuales, de acuerdo a los resultados obtenidos por BLAST, son proteínas que tienen gran similitud entre sí. Como era de esperarse, los resultados del alineamiento por medio del método de *MAFFT* muestran muchos dominios de similitud entre estas proteínas (Fig. 6), confirmando de igual manera estos resultados. Entre estas proteínas están, OMP de *Haemophilus influenzae*, OmpW de *Escherichia coli*, OmpW de *Pseudomonas aeruginosa* y OmpW de *Pseudomonas oleovorans*.

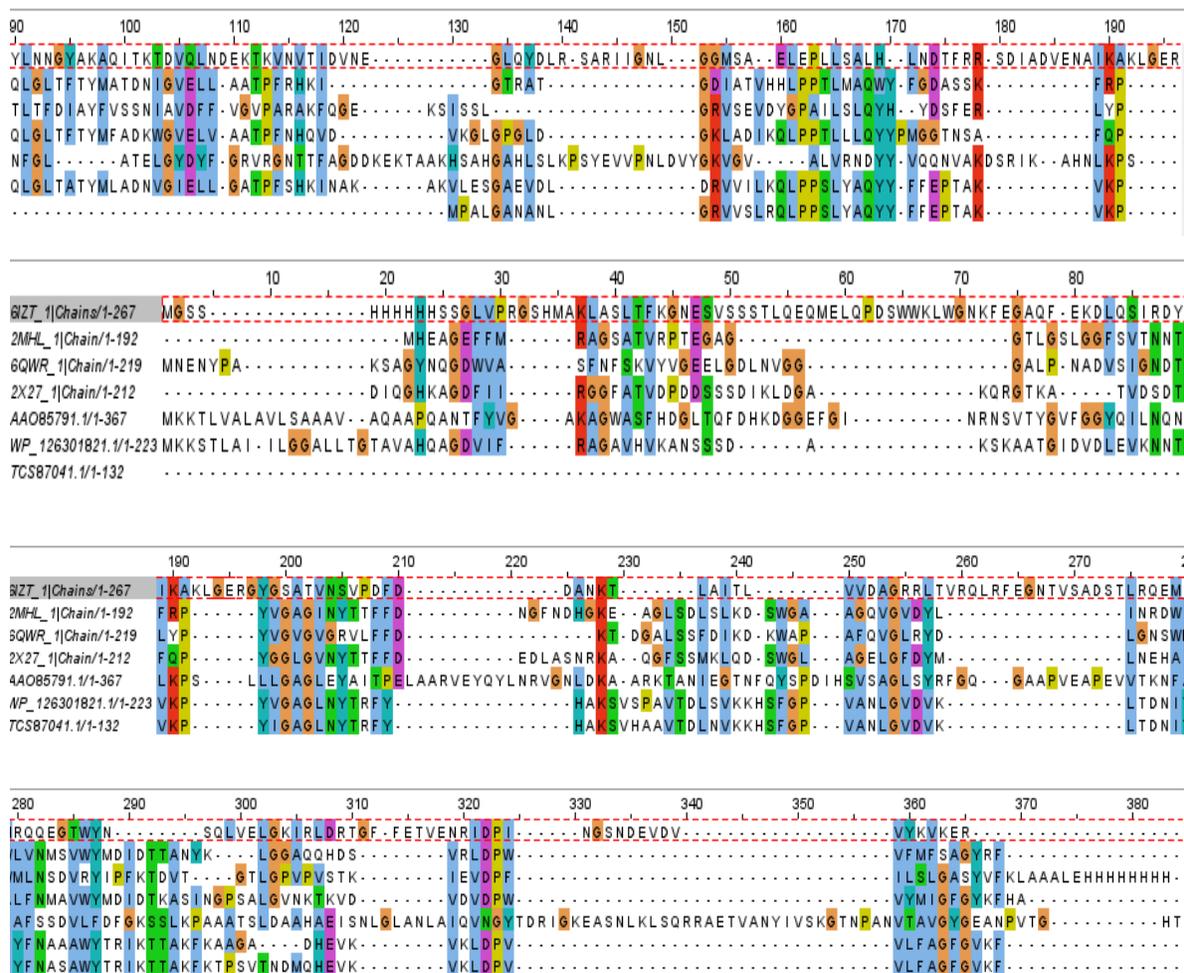


Figura 6. Alineamiento de proteínas de membrana externa de la familia OmpW de *M. haemolytica* y de otras bacterias (*Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans*)

Comparación de modelos de proteína simulada y cristalizada

Una vez obtenidos los modelos de las proteínas simuladas de *M. haemolytica*, comparamos las estructuras con las proteínas cristalizadas que resultaron similares. Esto se hizo con la finalidad de mostrar la gran similitud entre estas proteínas y corroborar así que los alineamientos realizados fueron de gran ayuda para encontrar proteínas muy similares a las cuales podemos también analizar y sobre todo se hizo para justificar nuestros resultados al comparar los valores obtenidos en las interacciones con cada una de las proteínas.

En la Fig. 7 se muestran las estructuras de las proteínas porinas, a) la Omp-P2 simulada de *M. haemolytica* en comparación con la b) OmpK37 de *K. pneumoniae* y la c) OmpF de *E. coli*. Como se observa, las estructuras de estas proteínas son muy similares, dato que nos indica que podíamos proceder a realizar el análisis de interacciones.

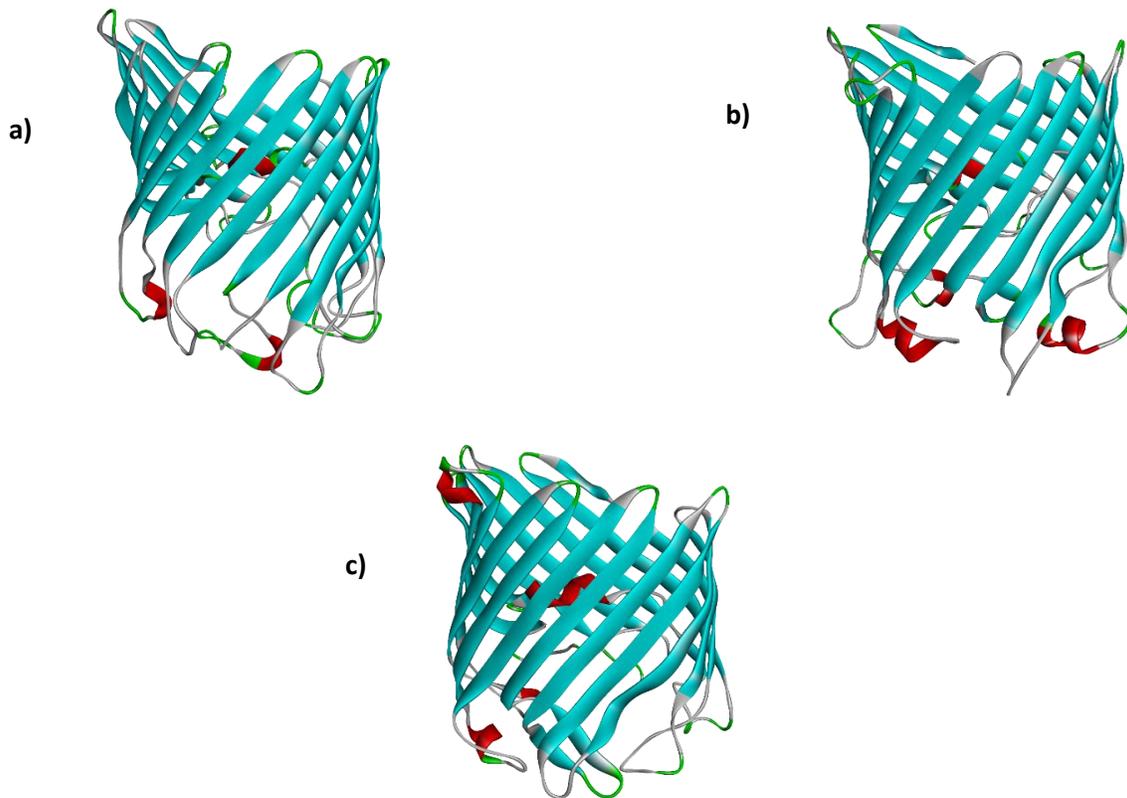


Figura 7. Estructura de la porina de a) *Mannheimia haemolytica*, b) *Klebsiella pneumoniae* y c) *Escherichia coli*.

La lactoferrina se une a proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* teniendo mayor afinidad por las porinas.

El análisis de las interacciones se obtuvo por medio del software *ClusPro*. La afinidad en cada una de las interacciones de Lf con las OMPs se muestra con valores de la energía libre de Gibbs (interacciones por puentes de hidrógeno, hidrofóbicas e interacciones de Van Der Waals), indicándonos que las interacciones de mayor valor negativo resultan más afines; siendo las porinas las proteínas a las que la Lf se une con mayor afinidad en comparación de las lipoproteínas y OmpW.

Además, se obtuvieron los valores de interacciones por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones por Van Der Waals, siendo las interacciones hidrofóbicas las que prevalecen en todas las proteínas analizadas, excepto la lipoproteína de *E. coli*, en la cual las interacciones por puentes hidrógeno son las que prevalecieron. Los resultados fueron consistentes en todas las proteínas analizadas (Tabla 2).

| Proteína | Microorganismo | Balance | Puentes H | Hidrofóbicas | VdW |
|---------------|-------------------------------|---------|-----------|--------------|--------|
| Omp-P2 porina | <i>Mannheimia haemolytica</i> | -1220.2 | -1268.5 | -1805.1 | -224.8 |
| OMP | | -1065.8 | -1123.2 | -1399.7 | -189.6 |
| OmpW | | -1098.5 | -1098.6 | -1566.0 | -215.8 |
| OMP H-M | | -1031.4 | -1209.8 | -1375.7 | -268.4 |
| PIpE | | -884.1 | -1026.7 | -1111.9 | -258.7 |
| Lipoproteína | | -800.8 | -820.0 | -866.1 | -212.1 |

| Proteína | Microorganismo | Balance | Puentes H | Hidrofóbicas | VdW |
|---------------|-------------------------------|---------|-----------|--------------|--------|
| OMPW | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -1209.4 | -1480.8 | -1849.7 | -400.3 |
| OmpK37 porina | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | -1208.5 | -1267.9 | -1829.3 | -377.5 |
| OmpF porina | <i>Escherichia coli</i> | -1132.4 | -1277.6 | -1607.7 | -304.4 |
| OmpW | <i>Escherichia coli</i> | -1111.5 | -1255.1 | -1743.9 | -267.8 |
| OmpW | <i>Pseudomonas oleovorans</i> | -1104.2 | -1255.9 | -1751.6 | -305 |
| OMP | <i>Haemophilus influenzae</i> | -936.7 | -1089.4 | -1115.6 | -365.4 |
| Lipoproteína | <i>Escherichia coli</i> | -792.0 | -900.9 | -850.8 | -252.6 |
| Lipoproteína | <i>Neisseria meningitidis</i> | -766.8 | -968.9 | -1035.0 | -322.4 |

Tabla 2. Interacciones de la lactoferrina con las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* y proteínas similares de otras bacterias.

Los aminoácidos del extremo amino de la Lf son los involucrados en las interacciones

El diseño de los modelos de las interacciones de Lf con las proteínas receptoras se obtuvo por medio de los visualizadores *AutoDockTools* y *Discovery*. Se muestran en diseño *Solid Ribbon* con dos colores para una mejor visualización, también se muestra la nube del tipo de interacción que prevalece, estas interacciones son hidrofóbicas. El grado de intensidad se muestra con una barra de tres colores (azul, blanco y café) y valores de 0 a 3 y 0 a -3, en donde, entre más se aproxime al valor 3, la intensidad del color café es más notoria, indicándonos mayor grado de hidrofobicidad. También se muestra nombre y posición de los aminoácidos que participan en cada una de las interacciones (Figs. 8-19).

Lf, (color amarillo ocre) resultó tener una mayor afinidad a la porina simulada de *M. haemolytica*, la Omp-P2 (color turquesa), a la cual se le ha descrito su participación en la adhesión de la bacteria a las células del hospedero, además de encontrarse formando parte del “biofilm” de *M. haemolytica*. Las interacciones hidrofóbicas son las que prevalecen (se incluye nube que indica el grado de hidrofobicidad). Como era de esperarse, los aminoácidos involucrados en éstas son los que conforman el amino terminal de Lf, al cual se le ha atribuido el efecto bactericida de esta proteína, en los que se incluyen: Lys243, Leu266, Lys269, Asn281, Asp285 (Fig. 8).

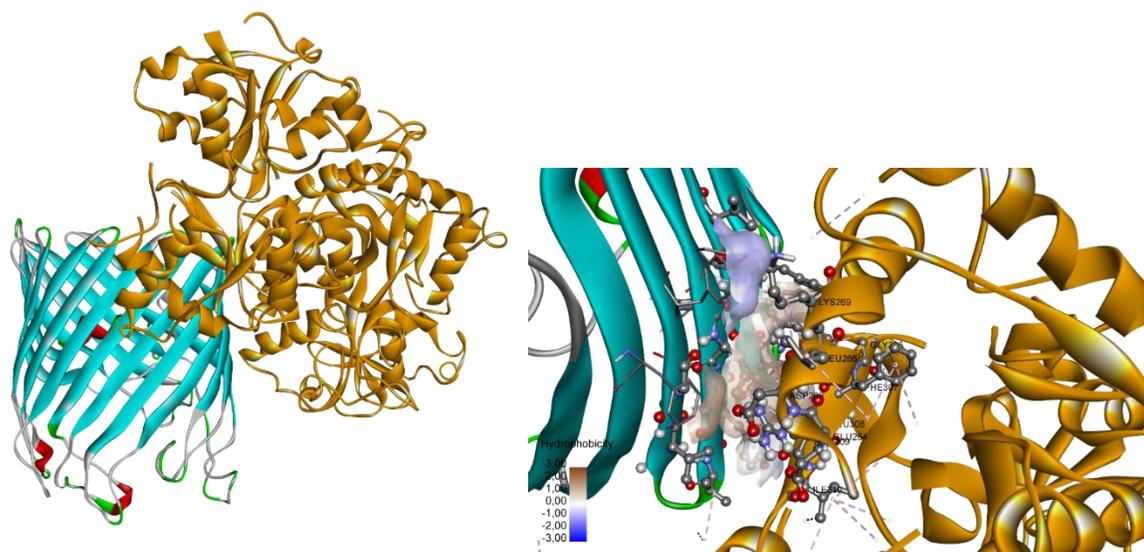


Figura 8. Interacción de lactoferrina (amarillo ocre) con Omp-P2 de *Mannheimia haemolytica* (turquesa), dada principalmente por interacciones hidrofóbicas.

La interacción de Lf (color azul) con la porina cristalizada de *K. pneumoniae*, la OmpK37 (color rosa) analizada, tuvo un valor similar al obtenido con la porina de *M. haemolytica* en cuanto a afinidad; esto era de esperarse por la similitud en estructura de las porinas entre las bacterias Gram-negativas, además de la ubicación que tienen en la membrana externa bacteriana, siendo las interacciones hidrofóbicas las que predominan (se incluye nube que indica el grado de hidrofobicidad). Los aminoácidos pertenecientes al amino terminal de Lf son los que participan en esta interacción, en los que se incluyen: Ala40, Arg38, Lys53, Cys183, Arg186 (Fig. 9).

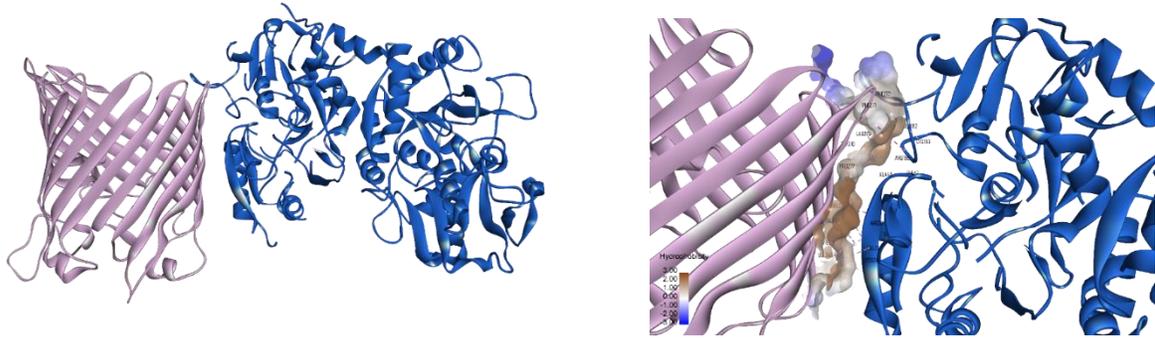


Figura 9. Interacción de lactoferrina (azul) con una porina de *Klebsiella pneumoniae* (rosa), dada principalmente por interacciones hidrofóbicas.

Con la finalidad de corroborar los resultados anteriores, buscamos interacción de Lf (color morado) con una tercera porina, la OmpF (color verde), perteneciente a *E. coli*, obteniendo valores cercanos a los obtenidos con las porinas analizadas anteriormente (Omp-P2 y OmpK37) en cuanto a afinidad, de igual manera se encontró prevalencia de interacciones hidrofóbicas (se incluye nube que indica el grado de hidrofobicidad). Así mismo, los aminoácidos pertenecientes al amino terminal de Lf son los que participan en esta interacción, siendo: Phe17, Arg20, Trp24, Arg25, Pro292 (Fig.10).

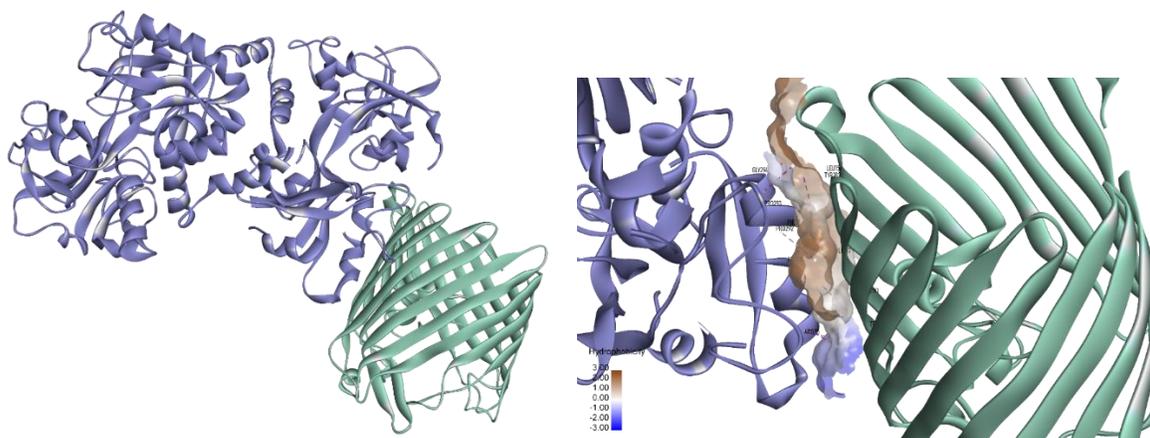


Figura 10. Interacción de lactoferrina (morado) con una porina de *Escherichia. coli* (verde), dada principalmente por interacciones hidrofóbicas.

Lf (color café) también mostró tener gran afinidad con una OMP simulada de *M. haemolytica* (color verde), tipo de proteínas a las que se les atribuye la principal función de brindar estabilidad a la membrana bacteriana, interaccionando por uniones hidrofóbicas (se incluye nube que indica el grado de hidrofobicidad). Así mismo, la interacción se da entre aminoácidos pertenecientes al extremo amino terminal de Lf, entre estos: Ala40, Phe41, Trp138, Asp162, Pro167 (Fig.11).

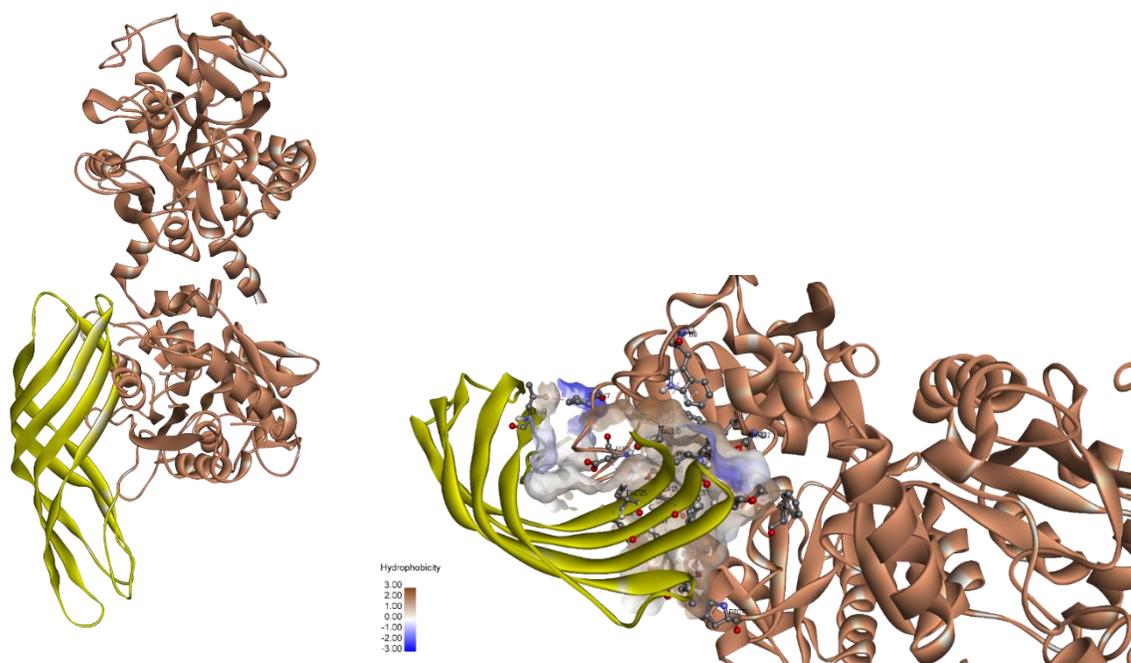


Figura 11. Interacción de lactoferrina (café) con una OMP de *Mannheimia haemolytica* (verde), dada principalmente por interacciones hidrofóbicas.

Para corroborar el resultado anterior, buscamos interacción de Lf (color azul) con una OMP (color amarillo ocre) de *H. influenzae*, bacteria perteneciente a la familia Pasteurellaceae. Se obtuvo, un valor menor en cuanto a afinidad, en comparación con la OMP de *M. haemolytica*, esto coincidiendo con los alineamientos realizados en donde la OMP de *H. influenzae* estuvo entre las proteínas con menor similitud. Sin embargo, sí se obtuvo el mismo resultado en cuanto al tipo de interacciones dadas, ya que hubo prevalencia de uniones hidrofóbicas (se incluye nube que indica el grado de hidrofobicidad); además, los aminoácidos involucrados en esta interacción son los pertenecientes al amino terminal de Lf, siendo: Phe17, Arg20, Trp24, Phe41 (Fig. 12).

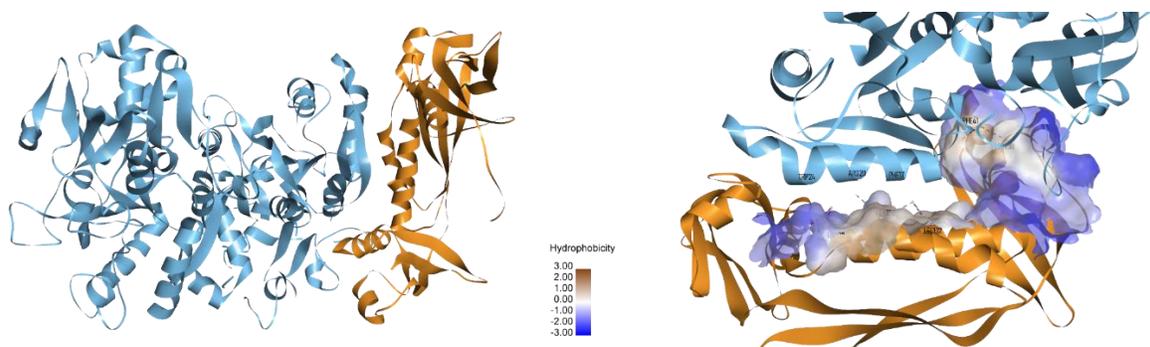


Figura 12. Interacción de lactoferrina (azul) con una OMP de *Haemophilus influenzae* (amarillo ocre), dada principalmente por interacciones hidrofóbicas.

Lf (color turquesa) también mostró gran afinidad con otra OMP simulada de *M. haemolytica*, OmpW (color café), principalmente por medio de interacciones hidrofóbicas (se incluye nube que indica el grado de hidrofobicidad). El tipo de interacción entre estas proteínas resultó un poco diferente a las obtenidas anteriormente, ya que hubo participación de algunos aminoácidos pertenecientes al carboxilo terminal de Lf, estos son: Ala605, His606, Leu687; sin embargo, hubo mayor participación de aminoácidos pertenecientes al amino terminal de Lf, como son: Pro134, Tyr135, Arg323, Ala335, Lys339 (Fig. 13).

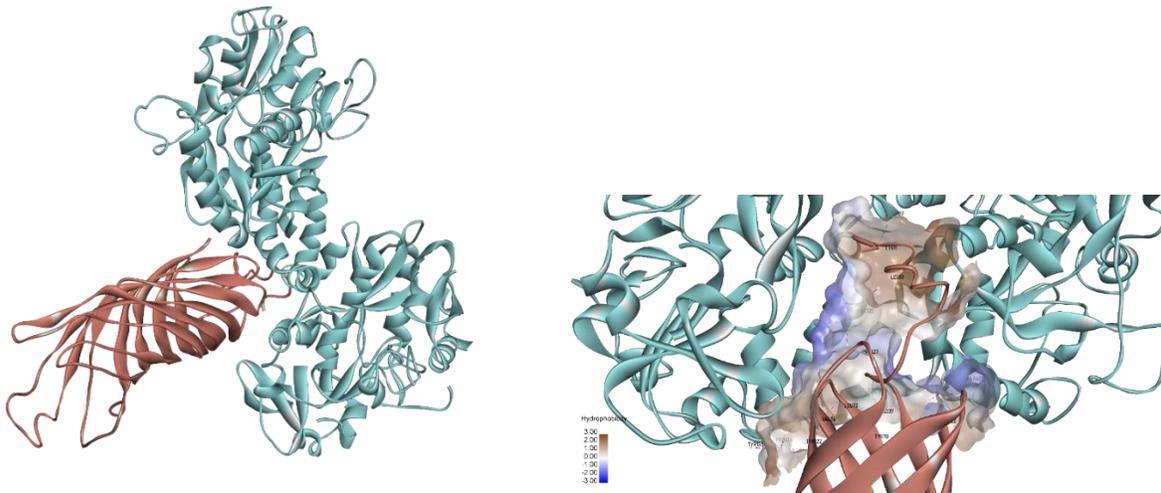


Figura 13. Interacción de lactoferrina (turquesa) con OmpW de *Mannheimia haemolytica* (café), dada principalmente por interacciones hidrofóbicas.

De igual manera, para poder realizar una comparación, se buscó interacción de Lf (color amarillo ocre) con una OMP de *P. aeruginosa*, OmpW (color verde), con gran similitud a la proteína de *M. haemolytica*; el valor de afinidad entre estas proteínas fue incluso mayor que el obtenido entre Lf y la OmpW de *M. haemolytica*; además, el grado de hidrofobicidad fue más notorio que el resto de las interacciones analizadas. Los aminoácidos involucrados en esta unión son los pertenecientes al amino terminal de Lf, entre estos: Leu142, Gln146, Gln164, Ala165, Gly177 (Fig. 14).

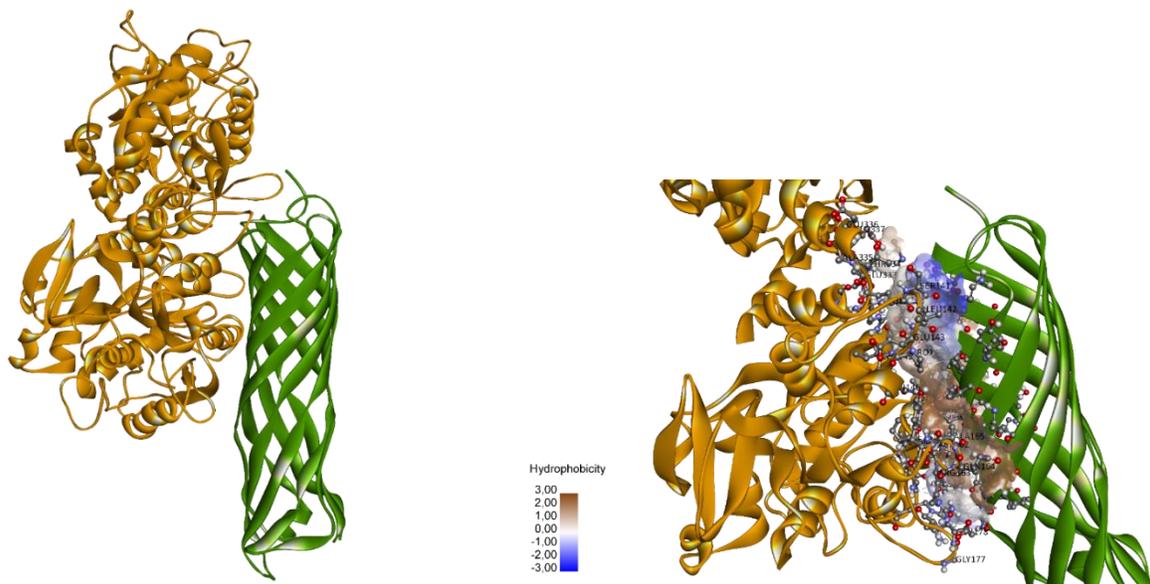


Figura 14. Interacción de lactoferrina (amarillo ocre) con OmpW de *Pseudomonas aeruginosa* (verde), dada principalmente por interacciones hidrofóbicas.

También se analizó la interacción de Lf (color gris) con una OMP del mismo género *Pseudomonas* pero diferente especie, OmpW de *P. oleovorans* (color rosa), para saber si se obtenía el mismo patrón. En cuanto a afinidad, se obtuvo un valor ligeramente menor al obtenido con la OmpW analizada del mismo género, pero éste fue aún más similar al obtenido en la interacción de la Lf con la OmpW de *M. haemolytica*, al igual que el grado de hidrofobicidad (se incluye nube que indica el grado de hidrofobicidad). Los aminoácidos pertenecientes al amino terminal de Lf son los que estuvieron involucrados en esta unión, estos son: Arg20, Arg38, Arg47, Ala182, Arg186 (Fig. 15).

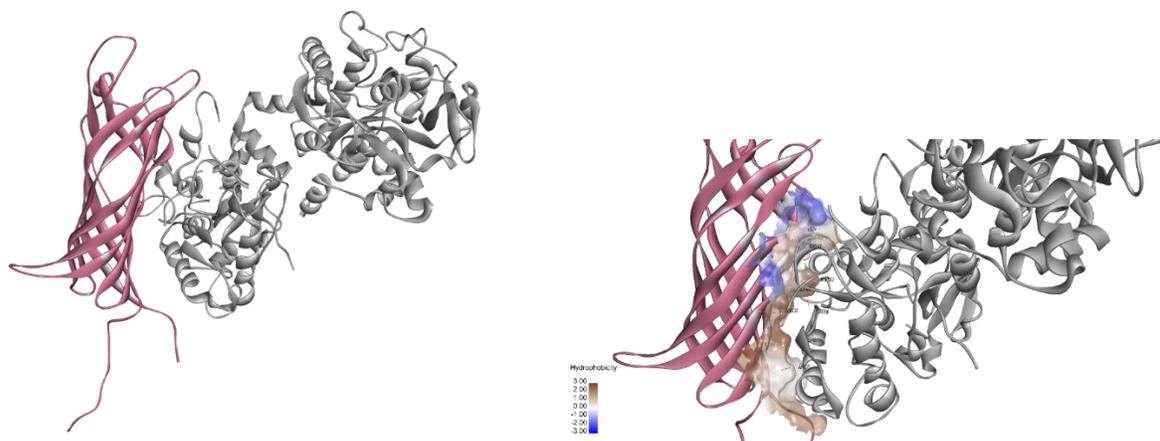


Figura 15. Interacción de lactoferrina (gris) con OmpW de *Pseudomonas oleovorans* (rosa), dada principalmente por interacciones hidrofóbicas.

En cuanto a la estructura, se encontró similitud entre las OmpW analizadas anteriormente con una OmpW de *E. coli*, por lo tanto, la interacción de la Lf (color morado) con la proteína de *E. coli*, OmpW (color café) fue también analizada. Se obtuvo de igual manera un valor cercano en cuanto a afinidad al obtenido en la unión de Lf con la OmpW de *M. haemolytica*, así también el grado de hidrofobicidad (se incluye nube que indica el grado de hidrofobicidad). Los aminoácidos del amino terminal de Lf estuvieron involucrados en esta unión, como son: Phe17, Arg20, Arg38, Ala40, Ala182 (Fig. 16).

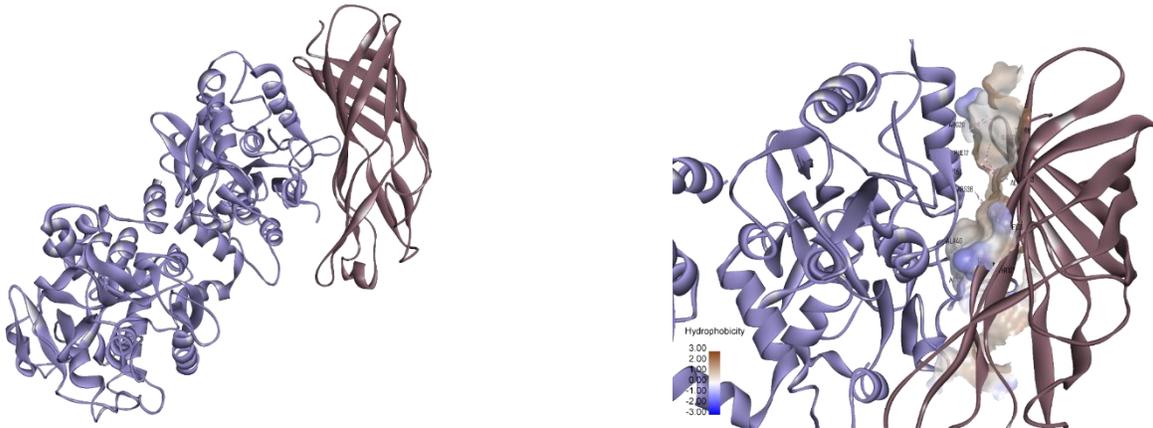


Figura 16 Interacción de lactoferrina (morado) con OmpW de *Escherichia coli* (café), dada principalmente por interacciones hidrofóbicas.

Finalmente, se buscó interacción de la Lf (color rosa) con la lipoproteína de *M. haemolytica*, Lpp (color azul), la cual ha sido caracterizada como adhesina por su participación en la adhesión de la bacteria a las células del hospedero. El valor obtenido en esta interacción en cuanto a afinidad resultó ser menor en comparación de todas las interacciones de las proteínas analizadas. Esto puede deberse a un efecto estérico, ya que como se observa, la estructura de la lipoproteína es muy diferente al resto de las proteínas de membrana externa estudiadas, así como también a la posición en que se encuentra en la membrana externa bacteriana. Sin embargo, también se encontró prevalencia de interacciones hidrofóbicas (se incluye nube que indica el grado de hidrofobicidad) y los aminoácidos involucrados en esta unión son de igual manera los pertenecientes al amino terminal de Lf, estos son: Phe17, Ala40, Gly177, Glu176 (Fig. 17).

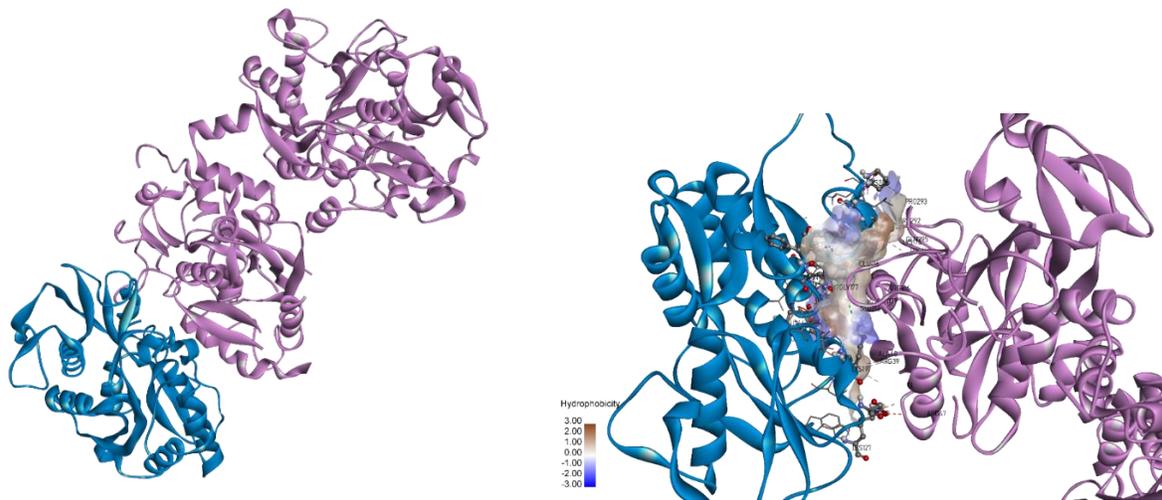


Figura 17 Interacción de lactoferrina (rosa) con una lipoproteína de *Mannheimia haemolytica* (azul), dada principalmente por interacciones hidrofóbicas.

Con la finalidad de corroborar nuestros resultados, buscamos interacción entre la Lf (color azul) y otras lipoproteínas de membrana externa de diferentes bacterias con las que se encontró similitud con la Lpp de *M. haemolytica*, como lo fue la lipoproteína de *N. meningitidis*, Lpp (color guinda). Como era de esperarse, el valor en cuanto a afinidad resultó de igual manera más bajo que el resto de las OMPs analizadas y cercano al valor obtenido en la interacción de Lf con la Lpp de *M. haemolytica*, corroborando así que puede deberse a la estructura de este tipo de proteínas y a la posición en que se encuentran en la membrana externa bacteriana. El tipo de interacciones que predominaron fueron al igual que el resto las hidrofóbicas (se incluye nube que indica el grado de hidrofobicidad) y los aminoácidos pertenecientes al amino terminal de Lf también tuvieron participación en esta interacción, entre estos: Asp80, Val82, Tyr103, Glu110, Asp180 (Fig. 18).

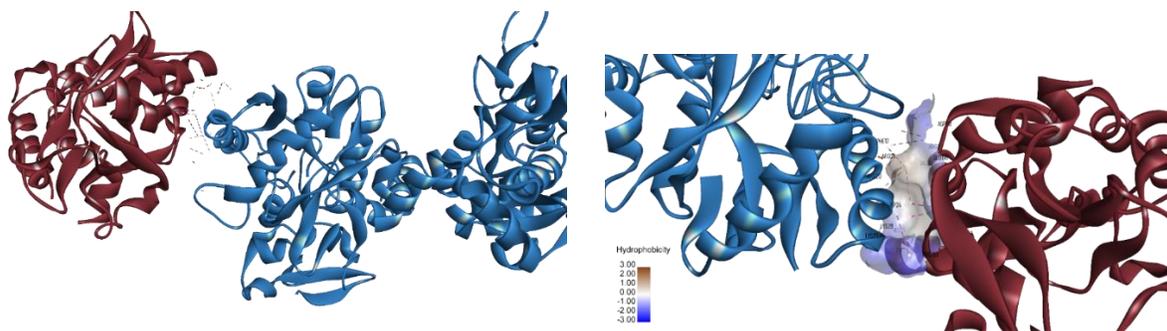


Figura 18. Interacción de lactoferrina (azul) con una lipoproteína de *Neisseria meningitidis* (guinda), dada principalmente por interacciones hidrofóbicas.

Por último, para confirmar nuestros resultados, buscamos interacción de la Lf (color gris) con una lipoproteína de *E. coli*, Lpp (color verde) con la que también se encontró gran similitud, y esto puede notarse al observar las estructuras. De igual manera, en cuanto a afinidad se obtuvo un valor similar al obtenido con las lipoproteínas analizadas anteriormente, justificando así la validez de nuestros resultados. Sin embargo, en esta unión hubo prevalencia de interacciones por puentes de hidrógeno (se muestra barra que indica donador y aceptor), pero la diferencia no fue muy notoria, ya que también se encontró un valor cercano en interacciones hidrofóbicas; en cuanto a los aminoácidos involucrados en esta unión fueron también los pertenecientes al amino terminal de Lf, entre estos: Phe17, Arg21, Trp24, Arg25, Arg284 (Fig. 19).

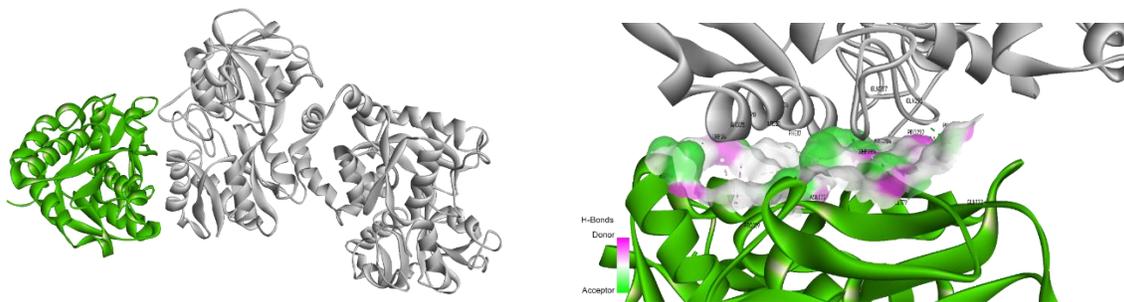


Figura 19 Interacción de lactoferrina (gris) con una lipoproteína de *Escherichia coli* (verde), dada principalmente por interacciones hidrofóbicas.

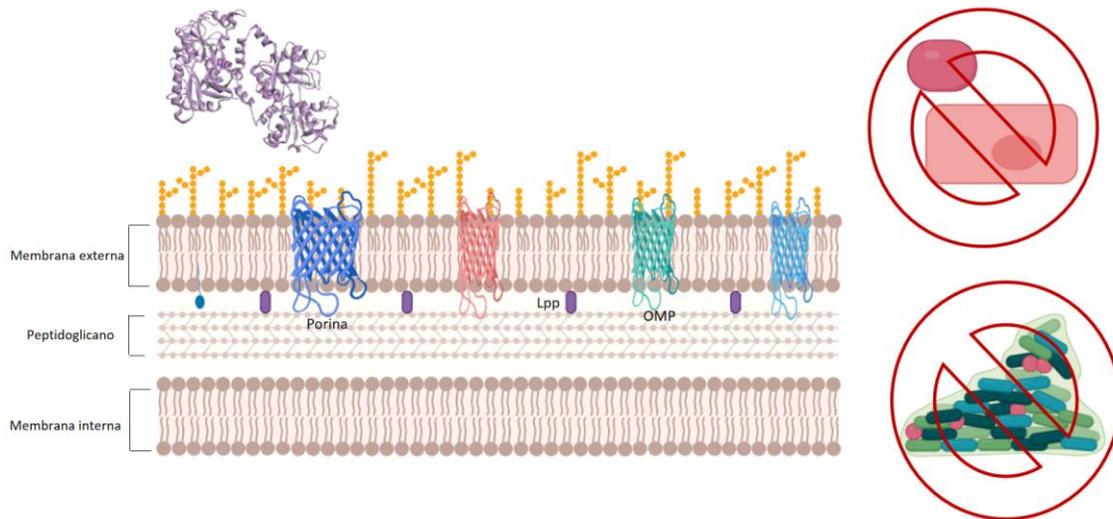


Figura 20. Esquema del efecto de lactoferrina sobre los mecanismos de patogenicidad de *Mannheimia haemolytica*.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran la interacción “*docking*” molecular de holo-Lf bovina con proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*.

Las OMPs, entre ellas lipoproteínas, tienen un papel primordial en la estabilidad de la membrana de la bacteria, además de que han sido descritas como adhesinas, por su participación en la adhesión de la bacteria a las células del hospedero (*Kisiela & Czuprynski, 2009*) Además, algunas OMPs tienen actividad de porina, permitiendo el paso de metabolitos necesarios para el crecimiento de la bacteria.

Se ha demostrado la capacidad de Lf para ejercer su efecto bactericida tanto para bacterias Gram-positivas (*Wang et al; 2019*), como Gram-negativas (*Moreno-Exposito et al., 2018*), inhibiendo mecanismos de patogenicidad necesarios para que la bacteria ejerza daño, como lo es la formación de “biofilm” (*Sheffield et al., 2012*); sin embargo, el mecanismo por el cual lo lleva a cabo aún no ha sido del todo explorado.

Los resultados obtenidos muestran que Lf interactúa con OMPs de *M. haemolytica* y de bacterias similares, principalmente a través de interacciones hidrofóbicas. Esto puede explicarse por la naturaleza catiónica de Lf y la negatividad de la membrana externa de las bacterias.

Los aminoácidos del amino terminal de Lf son los que participan en estas interacciones, coincidiendo con lo reportado anteriormente por nuestro grupo de investigación, en donde se demostró que holo-Lf se une por medio de su amino terminal a dos proteínas identificadas de *M. haemolytica*, una porina y una proteína modificable por calor (*Samaniego-Barron et al., 2016*). Estos resultados eran de esperarse, ya que al amino terminal de Lf se le atribuye el efecto bactericida de Lf; además de que en el amino terminal de Lf se encuentra la máxima densidad de cargas positivas (*P Valenti & G Antonini, 2005*) hecho que justifica el por qué se están dando las interacciones principalmente entre el extremo amino de Lf y las OMPs de *M. haemolytica*.

Nuestros resultados también muestran que Lf se une con una mayor afinidad a la porina de *M. haemolytica*, en comparación con el resto de las proteínas analizadas, lo que concuerda con lo reportado por Gadó y colaboradores en donde demostraron que en *E. coli*, Lf se une específicamente a porinas (Gadó et al., 1991).

La porina de *M. haemolytica* ha sido caracterizada en el "biofilm" de ésta, además de demostrarse que tiene participación en la adhesión de la bacteria a las células del hospedero, ya que al utilizar anticuerpos contra esta proteína, se observó una inhibición en la adhesión de dos cepas de *M. haemolytica* a células epiteliales basales alveolares de carcinoma humano (Montes Garcia et al., 2018); Este resultado sugiere que, al unirse la Lf a esta porina con gran afinidad, podría estar ocupando el sitio de unión de la porina a las células epiteliales del hospedero, inhibiendo así la adhesión de la bacteria y por consiguiente la formación de "biofilm", dos de los principales mecanismos de patogenicidad primordiales en el inicio y persistencia de la infección al hospedero. Además, una de las principales funciones de las porinas es permitir el paso de metabolitos necesarios en el crecimiento bacteriano, como lo es el hierro, por lo que se podría sugerir que la Lf con esta unión podría estar inhibiendo el paso de estos metabolitos y ejerciendo así su efecto bacteriostático.

Para corroborar estos resultados, se realizaron alineamientos de secuencias de porinas de otras bacterias para identificar proteínas similares a la porina de *M. haemolytica* y, además, que su estructura cristalizada se encuentre en la base de datos; esto se hizo con el fin de realizar una comparación en cuanto a estructura y al valor de afinidad obtenido entre la proteína simulada de *M. haemolytica* y las proteínas cristalizadas de otras bacterias. Los alineamientos realizados arrojaron gran similitud de la Omp-P2 de *M. haemolytica* con la porina OmpK37 de *K. pneumoniae* y la porina OmpF de *E. coli*, dos bacterias Gram-negativas al igual que *M. haemolytica*; y, al realizar la búsqueda de interacción se obtuvieron valores similares en cuanto a afinidad al obtenido entre la unión de Omp-P2 y Lf, sugiriendo que Lf se une con gran afinidad a este tipo de proteínas.

Posteriormente, se siguió con el análisis de interacción de Lf con otras OMPs de *M. haemolytica* las cuales comparten similitud en cuanto a estructura y ubicación en la membrana plasmática, éstas son nombradas como OMP de la familia W (OmpW), OMP modificable por calor (Omp-HM) o simplemente OMP; a las cuales se les atribuye la principal función de brindar estabilidad a la membrana bacteriana. El valor obtenido de las interacciones en cuanto a afinidad fue menor que el obtenido con las porinas, pero la diferencia no fue muy notoria, por lo que podemos sugerir que Lf tiene también una fuerte afinidad por estas OMPs analizadas. Estos resultados sugieren que Lf pudiera estarse uniendo a estas proteínas y por lo tanto provocar una inestabilidad de la membrana bacteriana, ejerciendo así su efecto bactericida contra *M. haemolytica*.

Para corroborar estos resultados, buscamos interacción entre Lf con OMPs de otras bacterias que, de acuerdo a los alineamientos, resultaron ser similares a las OMPs de *M. haemolytica*, y debido a que ya se tiene la estructura cristalizada de estas proteínas, podemos utilizarlas como moldes para comparar los valores y poder tener resultados confiables.

Como era de esperarse, los valores obtenidos en cuanto a afinidad de las interacciones entre Lf y las OMPs de otras bacterias fueron muy similares a los obtenidos en las interacciones entre Lf y las OMPs de *M. haemolytica*, comprobando así que Lf tiene afinidad similar entre este tipo de OMPs de las bacterias.

Por último, buscamos interacción entre Lf y una lipoproteína de *M. haemolytica*, ya que este tipo de proteína ha sido caracterizada como adhesina, debido a que al utilizar anticuerpos contra esta proteína se observó una disminución en la adhesión de *M. haemolytica* a células epiteliales bronquiales bovinas. Los valores obtenidos en cuanto a afinidad resultaron ser menores en comparación de todas las proteínas analizadas anteriormente, observándose una diferencia notoria entre éstos. Con la finalidad de corroborar este resultado, de igual manera buscamos la interacción de la Lf con lipoproteínas de otras bacterias que resultaron muy similares de acuerdo a los alineamientos realizados, estas fueron, lipoproteínas de *E. coli* y *N. meningitidis*. En estos casos se tuvieron valores menores, pero aún cercanos en

cuanto interacción al obtenido entre la Lf y la lipoproteína de *M. haemolytica*; estos resultados pueden deberse a un efecto estérico, ya que como se aprecia en los modelos, este tipo de proteínas tiene una estructura diferente en comparación con el resto de las OMPs, además de tener una ubicación diferente en la membrana externa de la bacteria, pudiéndole resultar algo complicado a la Lf tener acceso a ellas.

Sin embargo, no se puede descartar que estas interacciones se estén llevando a cabo y así provocar de igual manera una desestabilización de la membrana bacteriana, ejerciendo así su efecto bactericida. Así también podría estar disminuyendo la adhesión de la bacteria a las células epiteliales del hospedero al ocupar el sitio que utiliza la adhesina para unirse a estas células.

Estos resultados sugieren que uno de los posibles mecanismos por el cual Lf ejerce su efecto bactericida en contra de *M. haemolytica* es a través de la unión de ésta a porinas, es bloqueando la adhesión de la bacteria a las células del hospedero y por consiguiente la formación de "biofilm". Otro mecanismo sería uniéndose a las OMPs y provocando una inestabilidad en la membrana bacteriana (Fig. 20); estudios experimentales serán necesarios para apoyar estos resultados.

CONCLUSIÓN

La Lf bovina se une a proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*, teniendo mayor afinidad por porinas, siendo los aminoácidos del N-terminal de Lf los involucrados en estas interacciones. Estos resultados sugieren que el mecanismo principal por el cual la Lf podría estar evitando la adhesión de *M. haemolytica* a las células del hospedero y la formación de “biofilm” es a través de la unión de ésta a las proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* y principalmente a porinas, de acuerdo a este estudio teórico.

PERSPECTIVAS

- Medir la adhesión de *M. haemolytica* a las células epiteliales del tracto respiratorio ovino en presencia de Lf.
- Medir la formación de “biofilm” *in vitro* en presencia de Lf.
- Obtener las concentraciones adecuadas de Lf y definir el método preferible para su uso en ovinos, con el fin de contrarrestar la manhemiosis neumónica.

REFERENCIAS

- Abdullah, K. M., Lo, R. Y., & Mellors, A. (1990). Distribution of glycoprotease activity and the glycoprotease gene among serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *Biochem Soc Trans*, 18(05), 901-3. doi:10.1042/bst0180901.
- Angulo-Zamudio, U. A., Vidal, J. E., Nazmi, K., Bolscher, J. G. M., Leon-Sicairos, C., Antezana, B. S., Leon-Sicairos, N. (2019). Lactoferrin Disaggregates Pneumococcal Biofilms and Inhibits Acquisition of Resistance Through Its DNase Activity. *Front Microbiol*, 10(2386), 1-13. doi: 10.3389/fmicb.2019.02386.
- Avalos-Gomez, C., Reyes-Lopez, M., Ramirez-Rico, G., Diaz-Aparicio, E., Zenteno, E., Gonzalez-Ruiz, C., & de la Garza, M. (2020). Effect of apo-lactoferrin on leukotoxin and outer membrane vesicles of *Mannheimia haemolytica* A2. *Vet Res*, 51(01), 36. doi:10.1186/s13567-020-00759-z.
- Ayalew, S., Murdock, B. K., Snider, T. A., & Confer, A. W. (2019). *Mannheimia haemolytica* IgA-specific proteases. *Vet Microbiol*, 239 (108487), 1-7. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108487.
- Boukahil, I., & Czuprynski, C. J. (2015). Characterization of *Mannheimia haemolytica* biofilm formation in vitro. *Vet Microbiol*, 175(1), 114-122. doi:10.1016/j.vetmic.2014.11.012.
- Boukahil, I., & Czuprynski, C. J. (2016). *Mannheimia haemolytica* biofilm formation on bovine respiratory epithelial cells. *Vet Microbiol*, 197, 129-136. doi:10.1016/j.vetmic.2016.11.012.
- Carmela T Lachica, M. R., Anutrakunchai, C., Prajaneh, S., Nazmi, K., Prajaneh, S., Bolscher, J. G. M., Taweekhaisupapong, S. (2019). Synergistic effects of LFchimera and antibiotic against planktonic and biofilm form of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *PLoS One*, 14(7), 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0217205. eCollection 2019.
- Confer, A. W. (2009). Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev*, 10(02), 145-148. doi:10.1017/S1466252309990193.
- Confer, A. W., & Ayalew, S. (2018). *Mannheimia haemolytica* in bovine respiratory disease: immunogens, potential immunogens, and vaccines. *Anim Health Res Rev*, 19(02), 79-99. doi:10.1017/S1466252318000142.
- Davies, R. L., Campbell, S., & Whittam, T. S. (2002). Mosaic Structure and Molecular Evolution of the Leukotoxin Operon (lktCABD) in *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. *J Bacteriol*, 184(01), 266-277. doi: 10.1128/JB.184.1.266-277.2002.
- Deneer, H. G., & Potter, A. A. (1989). Iron-repressible outer-membrane proteins of *Pasteurella haemolytica*. *J Gen Microbiol*, 135(02), 435-443. doi:10.1099/00221287.
- Ellison, R. T. (1994). The effects of lactoferrin on gram-negative bacteria. *Adv Exp Med Biol*, 357, 71-90. doi:10.1007/978-1-4615-2548-6_8.

- Fez Firdaus, A., Nur Azhar, A., Kamarulrizal Mat, I., Arsalan, M., Naveed Mohamad, A., Teik Chung, E., & Mohd Azmi, M., (2019). Association between Mannheimia haemolytica infection with reproductive physiology and performance in small ruminants: A review. *Veterinary World*, 12(07), 978-983. doi: 10.14202/vetworld.2019.978-983.
- Gadó, I., Naidu, S. S., Erdei, J., Czirók, E., Kalfas, S., Thorén, A., Forsgren, A., Naidu, A. S. (1991). Specific binding of lactoferrin to Escherichia coli isolated from human intestinal infections. *APMIS*, 99(12):1142-50. PMID: 1772651.
- Griffin, D., Chengappa, M. M., Kuszak, J., & McVey, D. S. (2010). Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26(02), 381-394. doi:10.1016/j.cvfa.2010.04.004.
- Highlander, S. K. (2001). Molecular genetic analysis of virulence in Mannheimia (pasteurella) haemolytica. *Front Biosci*, 06(03), 1128-1150. doi:10.2741/highland.
- Hounscome, J. D., Baillie, S., Noofeli, M., Riboldi-Tunncliffe, A., Burchmore, R. J., Isaacs, N. W., & Davies, R. L. (2011). Outer membrane protein A of bovine and ovine isolates of Mannheimia haemolytica is surface exposed and contains host species-specific epitopes. *Infect Immun*, 79(11), 4332-4341. doi:10.1128/IAI.05469-11.
- Hussain, R., Mahmood, F., Ali, H. M., & Siddique, A. B. (2017). Bacterial, PCR and clinico-pathological diagnosis of naturally occurring pneumonic pasteurilosis (mannheimiosis) during subtropical climate in sheep. *Microb Pathog*, 112, 176-181. doi:10.1016/j.micpath.2017.09.061.
- Jaramillo, L., Diaz, F., Hernandez, P., Debray, H., Trigo, F., Mendoza, G., & Zenteno, E. (2000). Purification and characterization of an adhesin from Pasteurella haemolytica. *Glycobiology*, 10(01), 31-37. doi:10.1093/glycob/10.1.31.
- Jeyaseelan, S., Sreevatsan, S., & Maheswaran, S. K. (2002). Role of Mannheimia haemolytica leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurilosis. *Anim Health Res Rev*, 03(02), 69-82. doi:10.1079/ahrr200242.
- Kawasaki, Y., Tazume, S., Shimizu, K., Matsuzawa, H., Dosako, S., Isoda, H., Tsukiji, M., Fujimura, R., Muranaka, Y., & Isihida, H. (2000). Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of enterotoxigenic Escherichia coli to host cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64(2), 348-54. doi: 10.1271/bbb.64.348.
- Kisiela, D. I., & Czuprynski, C. J. (2009). Identification of Mannheimia haemolytica adhesins involved in binding to bovine bronchial epithelial cells. *Infect Immun*, 77(01), 446-455. doi:10.1128/IAI.00312-08.
- 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(05), 891-903. doi: 10.1007/s10534-014-9752-5.

- Luna-Castro, S., Samaniego-Barrón, L., Serrano-Rubio, L. E., Ceballos-Olvera, I., Avalos-Gómez, C., & de la Garza, M. (2017). Lactoferrin: A Powerful Antimicrobial Protein Present in Milk. *J Adv Dairy Res*, 05(04), 1-10. doi: 10.4172/2329-888X.1000195.
- Michael, G. B., Bosse, J. T., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in Pasteurellaceae of Veterinary Origin. *Microbiol Spectr*, 06(03), 1-33. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0022-2017.
- Montes Garcia, J. F., Vaca, S., Delgado, N. L., Uribe-Garcia, A., Vazquez, C., Sanchez Alonso, P., Negrete Abascal, E. (2018). Mannheimia haemolytica OmpP2-like is an amyloid-like protein, forms filaments, takes part in cell adhesion and is part of biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111(12), 2311-2321. doi:10.1007/s10482-018-1122-9.
- 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. *Can J Vet Res*, 51(01), 83-88. PMID: PMC1255278.
- Moreno-Exposito, L., Illescas-Montes, R., Melguizo-Rodriguez, L., Ruiz, C., Ramos-Torrecillas, J., & de Luna-Bertos, E. (2018). Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin. *Life Sci*, 195, 61-64. doi:10.1016/j.lfs.2018.01.002.
- Otulakowski, G. L., Shewen, P. E., Udoh, A. E., Mellors, A., & Wilkie, B. N. (1983). Proteolysis of sialoglycoprotein by Pasteurella haemolytica cytotoxic culture supernatant. *Infect Immun*, 42(01), 64-70. doi:10.1128/IAI.42.1.64-70.1983.
- Ramirez-Rico, G., Martínez-Castillo, M., González-Ruiz, C., Luna-Castro, 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. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.027.
- Rice, J. A., Carrasco-Medina, L., Hodgins, D. C., & Shewen, P. E. (2007). Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev*, 08(02), 117-128. doi:10.1017/S1466252307001375.
- Rowe, H. A., Poxton, I. R., & Donachie, W. (2001). Survival of Mannheimia (Pasteurella) haemolytica in tracheobronchial washings of sheep and cattle. *Veterinary Microbiology*, 81(04), 305-314. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00361-3.
- Samaniego-Barron, L., Luna-Castro, S., Piña-Vazquez, C., Suarez-Guemes, F., & de la Garza, M. (2016). Two outer membrane proteins are bovine lactoferrin-binding proteins in Mannheimia haemolytica A1. *Vet Res*, 47(01), 93. doi:10.1186/s13567-016-0378-1.
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol*, 13(10), 605-619. doi:10.1038/nrmicro3525.
- Scott, P. R. (2011). Treatment and control of respiratory disease in sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27(01), 175-186. doi:10.1016/j.cvfa.2010.10.016.

- Sheffield, C. L., Crippen, T. L., Poole, T. L., & Beier, R. C. (2012). Destruction of single-species biofilms of *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* by dextranase, lactoferrin, and lysozyme. *Int Microbiol*, 15(4), 185-9. doi: 10.2436/20.1501.01.171.
- Snyder, E., & Credille, B. (2020). *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in Bovine Respiratory Disease: How Are They Changing in Response to Efforts to Control Them?. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 36(02), 253-268. doi:10.1016/j.cvfa.2020.02.001.
- St Michael, F., Vinogradov, E., & Cox, A. D. (2011). Structural analyses of the core oligosaccharide from the lipopolysaccharide of bovine and ovine strains of *Mannheimia haemolytica* serotype 2. *Carbohydr Res*, 346(11), 1333-1336. doi:10.1016/j.carres.2011.05.001.
- Wang, B., Timilsena, Y. P., Blanch, E., & Adhikari, B. (2019). Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 59(04), 580-596. doi:10.1080/10408398.2017.1381583.
- Zecchinon, L., Fett, T., & Desmecht, D. (2005). How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet Res*, 36(02), 133-156. doi:10.1051/vetres:2004065.