



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**Estandarización en la obtención de células ovinas para la evaluación
del efecto de lactoferrina bovina sobre la adhesión de *Mannheimia
haemolytica* A2**

Tesis que presenta:

Lic. Enrique Nicolai Darquea Bustillos

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

En la especialidad de:

Biología Celular

Directora de tesis: Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya

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 dirección de la Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya, y con la asesoría del Dr. José de Jesús Serrano Luna y la Dra. Guadalupe Reyes Cruz.

El presente estudio fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto A1-S-8989. Beca de Maestría CONACYT 1144839.

DEDICATORIA

A mi madre Carmen Bustillos y a mi padre Carlos Darquea, quienes, a través de su ejemplo y enseñanzas, han constituido un pilar fundamental y una de mis más grandes motivaciones para alcanzar las metas y objetivos que me he propuesto.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por su apoyo y guía constante, así como por todo su cariño durante este proceso que implicó la lejanía de mi hogar en Ecuador.

A mi tutora, la Dra. Mireya de la Garza Amaya, por su guía y apoyo incondicional durante la realización de este trabajo de tesis.

A mis asesores, el Dr. José de Jesús Serrano Luna y la Dra. Guadalupe Reyes Cruz por su valiosa guía, aportes y comentarios, que me permitieron desarrollar de mejor manera esta investigación.

Al Dr. César Cuenca y a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (FES Cuautitlán, UNAM), por su apoyo y apertura en la proporción de las muestras usadas para esta investigación.

Al M.C. José Francisco Neri González y a sus tías, Cecilia González y Marga González por haberme abierto las puertas de su hogar cuando llegué a México desde Ecuador, y por hacerme sentir un miembro más de su familia.

Al Departamento de Biología Celular del CINVESTAV/IPN por las enseñanzas y guía durante mis estudios de maestría.

Al CONACYT por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	6
JUSTIFICACIÓN	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
METODOLOGÍA	13
Cepa bacteriana y lactoferrina.....	13
Viabilidad de la bacteria.....	14
Estandarización del ensayo de adhesión a células bucoepiteliales.....	14
• Obtención y transporte de muestras.....	14
• Obtención de células bucoepiteliales de ovino y humanas.....	14
• Obtención de la bacteria	15
• Ensayo de adhesión	15
• Montaje de placas.....	15
• Microscopía óptica	15
Ensayo de adhesión a monocitos y macrófagos ovinos de sangre periférica.....	15
• Obtención y transporte de muestras.....	15
• Cultivo celular de monocitos y macrófagos de sangre periférica y adición de lactoferrina.....	16
• Obtención y marcaje de la bacteria	18
• Ensayo de adhesión	18
• Microscopia confocal y de fluorescencia	19
• Análisis estadístico.....	19
RESULTADOS.....	20
Apo-LfB tiene un efecto bactericida en contra de <i>M. haemolytica</i> A2 en una manera dosis dependiente y temporal dependiente.....	20
<i>M. haemolytica</i> A2 se adhiere a células bucoepiteliales ovinas y humanas, pero no a monocitos ni a macrófagos humanos de sangre periférica	20

Las poblaciones de monocitos adquieren características morfológicas similares a las de macrófagos en el tercer día de haber sido purificadas.....	23
Apo-LfB disminuye la adhesión de <i>M. haemolytica</i> A2 a monocitos ovinos de sangre periférica en una manera dosis dependiente.....	24
Apo-LfB disminuye la adhesión de <i>M. haemolytica</i> A2 a macrófagos ovinos de sangre periférica en una manera dosis dependiente.....	27
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	38
PERSPECTIVAS	39
LITERATURA CITADA	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de <i>M. haemolytica</i> A2 de 24 horas en medio agar sangre por el método de siembra de purificación de colonias.	13
Figura 2. Alícuotas de apo-LfB almacenadas bajo congelación una vez preparadas...	14
Figura 3. Ovinos del corral de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la FES Cuautitlán, UNAM (A). Obtención de la sangre por punción intravenosa en la vena yugular interna del animal (B).....	16
Figura 4. Gradiente obtenido con Lymphoprep. Se pueden observar a las poblaciones celulares sanguíneas separadas de acuerdo a su densidad.	17
Figura 5. Separación de monocitos ovinos de sangre periférica mediante la utilización de perlas o anticuerpos CD14.....	17
Figura 6. <i>M. haemolytica</i> A2 marcada con FITC.....	18
Figura 7. Análisis y procesamiento de las fotografías tomadas mediante microscopía confocal, en el software LAS-X.	19
Figura 8. Viabilidad de <i>M. haemolytica</i> A2 en presencia de diferentes dosis de apo-LfB.. ..	20
Figura 9. Células bucoepiteliales ovinas (A) y células bucoepiteliales humanas (B) sin interacción con <i>M. haemolytica</i> A2.....	21
Figura 10. Bacterias adheridas a la superficie de una célula bucoepitelial ovina (A) y una célula bucoepitelial humana (B).. ..	22
Figura 11. Monocitos humanos de sangre periférica (A) y macrófagos humanos de sangre periférica (B) teñidos con DAPI.	22
Figura 12. Cuantificación del ensayo de adhesión de <i>M. haemolytica</i> A2 a células bucoepiteliales ovinas y humanas.. ..	23
Figura 13. Macrófagos ovinos de sangre periférica completamente diferenciados después de tres días de su purificación como monocitos.. ..	24
Figura 14. Microscopía confocal de monocitos ovinos de sangre periférica marcados con DAPI (izquierda), <i>M. haemolytica</i> A2 marcada con FITC (centro), y merge entre DAPI y FITC (derecha).. ..	26
Figura 15. Cuantificación del ensayo de adhesión de <i>M. haemolytica</i> A2 a monocitos ovinos de sangre periférica.	26

Figura 16. Microscopía confocal de macrófagos ovinos de sangre periférica marcados con DAPI (izquierda). <i>M. haemolytica</i> A2 marcada con FITC (centro), y merge entre DAPI y FITC (derecha)..	28
Figura 17. Cuantificación del ensayo de adhesión de <i>M. haemolytica</i> A2 a macrófagos ovinos de sangre periférica. El gráfico muestra el resultado de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado; * $p<0.05$, ** $p<0.01$	29

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

Apo-Lf	Apo-Lactoferrina
Apo-LfB	Apo-Lactoferrina bovina
Asn	Asparagina
C-terminal	Carboxilo terminal
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HEPES	Buffer de ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico
Holo-Lf	Holo-Lactoferrina
IL-6	Interleucina-6
LktA	Leucotoxina de <i>Mannheimia haemolytica</i>
LfB	Lactoferrina bovina
LfH	Lactoferrina humana
Lpp1	Lipoproteína 1
LPS	Lipopolisacárido
MOI	Multiplicidad de infección
N-terminal	Amino terminal
OmpA	Proteína A de membrana externa modificable por calor
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
OMPs	Proteínas de membrana externa
OMVs	Vesículas de membrana externa
TLR-4	Receptor 4 tipo toll
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Mannheimia haemolytica es un cocobacilo Gram-negativo perteneciente a la familia Pasteurellaceae. Esta especie bacteriana habita de manera normal en la cavidad nasal y en las criptas tonsilares de rumiantes sanos. Sin embargo, cuando el animal está inmunosuprimido, *M. haemolytica* pasa a ser un patógeno oportunista, que migra hacia los pulmones en donde invade el epitelio alveolar, provocando una patología respiratoria conocida como mannheimiosis. El serotipo A1 se relaciona con la mannheimiosis en bovinos, mientras que el serotipo A2 es el causante de la mannheimiosis ovina. La bacteria cuenta con una potente leucotoxina, así como varias adhesinas que median el primer contacto del microorganismo con las células a las cuales infecta. En la actualidad no se cuenta con un tratamiento farmacológico efectivo ni con vacunas que sean totalmente eficaces para tratar la mannheimiosis, por lo que ha surgido el uso de tratamientos alternativos, entre ellos podría ser el uso de lactoferrina. Esta glicoproteína del sistema inmune innato de mamíferos está presente en importantes concentraciones en el calostro y en la leche. Posee entre otras cosas, un efecto antibacteriano por su capacidad de unir hierro, o por interactuar directamente con los componentes de la membrana externa de bacterias Gram-negativas. En este sentido, la presente investigación, buscó analizar el efecto de apo-Lactoferrina bovina (apo-LfB), administrada en una manera dosis dependiente, sobre la adhesión de *M. haemolytica* A2 a células ovinas, específicamente a células bucoepiteliales, así como a monocitos y macrófagos de sangre periférica. Para esto, se procedió a estandarizar técnicas de obtención de estos tipos celulares. Se realizaron ensayos de adhesión a estas células, en presencia de diferentes concentraciones de apo-LfB, y se hizo uso de microscopía óptica, confocal y de epifluorescencia para el análisis y cuantificación del número de bacterias adheridas a cada tipo celular. Así, se determinó que la bacteria se une a células bucoepiteliales humanas, así como de ovino. Por otro lado, las dosis de 20, 30 y 50 μM de apo-LfB disminuyeron en un 58, 69 y 68%, respectivamente, la adhesión de *M. haemolytica* A2 a monocitos ovinos de sangre periférica. De manera similar, las dosis de 20, 30 y 50 μM de apo-LfB disminuyeron en un 34, 67 y 67%, respectivamente, la adhesión de *M. haemolytica* A2 a macrófagos ovinos de sangre periférica. Estos resultados sugieren un posible uso de apo-LfB para prevenir la adhesión de *M. haemolytica* A2 a estas células ovinas.

Palabras clave: lactoferrina, adhesión, *Mannheimia haemolytica* A2, células bucoepiteliales, monocitos, macrófagos.

ABSTRACT

Mannheimia haemolytica is a Gram-negative coccobacillus belonging to the Pasteurellaceae family. This bacterial species normally inhabits the nasal cavity and tonsillar crypts of healthy ruminants. However, when the animal becomes immunosuppressed, *M. haemolytica* becomes an opportunistic pathogen that migrates to the lungs, where it invades the alveolar epithelium, causing a respiratory disease known as mannheimiosis. Serotype A1 is associated with mannheimiosis in cattle, while serotype A2 is the causative agent of ovine mannheimiosis. The bacteria possesses a potent leukotoxin, as well as several adhesins that mediate the initial contact of the microorganism with the cells it infects. Currently, there is no effective pharmacological treatment or fully effective vaccines available to treat mannheimiosis. As a result, alternative treatments such as lactoferrin could be explored. This glycoprotein from the innate immune system of the majority of mammals is present in significant concentrations in colostrum and milk. It has an antibacterial effect due to its ability to bind iron or through a direct interaction with the components of the outer membrane of Gram-negative bacteria. In this regard, the present study aimed to analyze the effect of bovine lactoferrin, administered in a dose-dependent manner, on the adhesion of *M. haemolytica* A2 to ovine cells, specifically to bucoepithelial cells, as well as to peripheral blood monocytes and macrophages. To achieve this, techniques for obtaining these cell types were standardized. Adhesion assays were performed on these cells in the presence of different concentrations of apo-BLf, and optical, confocal, and epifluorescence microscopy were used for the analysis and quantification of the number of bacteria adhered to each cell type. Thus, it was determined that the bacteria binds to both human and ovine bucoepithelial cells. On the other hand, doses of 20, 30, and 50 μ M of bovine apo-lactoferrin decreased *M. haemolytica* A2 adhesion to ovine peripheral blood monocytes by 58%, 69%, and 68% respectively. Similarly, doses of 20, 30, and 50 μ M of apo-BLf decreased *M. haemolytica* A2 to ovine peripheral blood macrophage by 34%, 67%, and 67% respectively. These results suggest a potential use of apo-BLf to prevent and cure the adhesion of *M. haemolytica* A2 to these ovine cells.

Keywords: lactoferrin, adhesion, *Mannheimia haemolytica* A2, bucoepithelial cells, monocytes, macrophages.

INTRODUCCIÓN

Mannheimia haemolytica es una bacteria Gram-negativa, de forma cocobacilar y perteneciente a la familia Pasteurellaceae. Se caracteriza por ser anaerobia facultativa, poseer cápsula y ser carente de movilidad (Jaramillo *et al.*, 2009). Esta bacteria fermenta glucosa y otros carbohidratos, y es oxidasa positiva e indol negativa. En agar sangre lleva a cabo una hemólisis total (hemólisis beta), donde crece formando colonias de color blanco-grisáceo y de 1 a 2 milímetros de diámetro aproximadamente (Boyce *et al.*, 2004).

Este microorganismo es un habitante normal de la cavidad nasal, así como de las criptas tonsilares de rumiantes sanos. Sin embargo, cuando el animal está inmunosuprimido, *M. haemolytica* pasa a ser un patógeno oportunista, que prolifera rápidamente en el tracto respiratorio anterior, y migra hacia los pulmones, en donde coloniza el epitelio alveolar, provocando una patología respiratoria conocida como mannheimiosis (Jaramillo *et al.*, 2009). En la actualidad se conocen 12 serotipos de la bacteria, de los cuales, los serotipos A1 y A2 son los más relevantes en el campo clínico, puesto que son los causantes de mannheimiosis en bovinos y ovinos, respectivamente (Davies & Donachie, 1996).

La inmunosupresión del animal puede estar causada por la combinación de varios factores como infecciones virales (por ejemplo: virus de parainfluenza-3, herpesvirus bovino-1, adenovirus, virus respiratorio sincitial, etc.), infecciones bacterianas (*Mycoplasma bovis* en bovinos), y factores asociados al estrés, que crean el medio adecuado para el desarrollo de la mannheimiosis. Dentro de los factores asociados al estrés es importante mencionar al traslado del animal de una granja a otra, condiciones de hacinamiento, traslado de los animales hacia los sitios de comercialización, cambios bruscos de temperatura, etc., que se traducen en un aumento de los niveles de cortisol en sangre (Zecchinon *et al.*, 2005).

La mannheimiosis provoca efectos negativos en el ganado bovino u ovino, tales como una baja ganancia de peso y una baja eficiencia de conversión alimenticia en los animales más afectados, lo que implica pérdidas económicas significativas en el sector ganadero cada año. Algunos de los signos clínicos más relevantes de esta enfermedad incluyen cierto grado de depresión y anorexia, fiebre que puede alcanzar los 42 °C, secreción nasal, tos, ritmo cardíaco elevado, respiración rápida y superficial, etc. (Zecchinon *et al.*, 2005). En los casos más graves, el cuadro puede derivar en una neumonía fibronecrotizante aguda, que finalmente conduce a la muerte del animal (Jeyaseelan *et al.*, 2002).

Las lesiones pulmonares en los estadios más avanzados de manheimiosis se caracterizan por ser lobulares, de distribución antero-ventral y por presentar una infiltración de neutrófilos bastante marcada, así como por depósitos y exudados de fibrina hacia los alveolos (Zecchinon *et al.*, 2005). La citólisis de macrófagos y neutrófilos por parte de la bacteria, provoca la liberación de las enzimas proteolíticas y de sustancias proinflamatorias de estos leucocitos, lo que contribuye a la gravedad en la presentación de las lesiones pulmonares, acelerando la necrosis del tejido alveolar y el proceso neumónico (Jeyaseelan *et al.*, 2022).

Para poder provocar el cuadro clínico, *M. haemolytica* cuenta con varios factores de virulencia, entre los que destaca la presencia de una cápsula, proteínas de membrana externa (OMPs por sus siglas en inglés), adhesinas, neuraminidasa, proteasas, un lipopolisacárido (endotoxina) y una potente leucotoxina (exotoxina) (Jeyaseelan *et al.*, 2022). De estos factores de virulencia, se considera a la leucotoxina como el más importante, puesto que su acción es específica contra leucocitos e incluso contra eritrocitos de rumiantes (Aulik *et al.*, 2012).

La leucotoxina (LktA) es un miembro de la familia RTX de exotoxinas de bacterias Gram-negativas, que se caracteriza por ser una proteína termolábil, estable al oxígeno, hidrosoluble y de pH estable (Jeyaseelan *et al.*, 2022). Se considera como una glicoproteína altamente inmunogénica que tiene un peso aproximado de 104 kDa y que participa formando poros en macrófagos, neutrófilos y eritrocitos bovinos y ovinos. La LktA se produce en grandes cantidades durante la fase de crecimiento logarítmico de la bacteria, para lo cual también necesita de hierro (Chang *et al.*, 1987).

Para lograr su efecto, la región amino terminal (N-terminal) de la LktA se une a través de interacciones electrostáticas al receptor β -integrina de sus células objetivo, para de esta manera, mediar la formación de poros y la posterior lisis y muerte celular. En concentraciones subletales, la LktA provoca la activación de macrófagos y neutrófilos alveolares, lo que a su vez conduce a la translocación del factor de transcripción nuclear NF- κ B hacia el núcleo de estas células. Además, esta señal produce la liberación de varios mediadores de la inflamación como radicales libres y proteasas, mediadores lipídicos, óxido nítrico, etc., lo que conduce a la apoptosis (Jeyaseelan *et al.*, 2022).

Por otro lado, considerando que la adhesión es el primer paso en el proceso de colonización de los patógenos, las adhesinas juegan un rol fundamental en la patogénesis,

y *M. haemolytica* no es la excepción. En este sentido, el serotipo A1 de la bacteria cuenta con varias adhesinas como son al menos dos fimbrias, una grande y rígida de 12nm, y una más pequeña y flexible de 5 nm (Jeyaseelan *et al.*, 2022). Además, se pueden mencionar dos proteínas de superficie de aproximadamente 30 kDa que actúan como adhesinas, una proteína A de membrana externa modificable por calor (OmpA) y una lipoproteína 1 (Lpp1). Estas últimas están mediando la adherencia de la bacteria a células bronquiales bovinas (Kisiela & Czuprynski, 2009).

En el caso de *M. haemolytica* A2, aún no se cuenta con estudios moleculares que hayan caracterizado las adhesinas de esta bacteria. Sin embargo, mediante análisis bioinformáticos se ha propuesto que en el serotipo A2, varias proteínas y moléculas podrían estar involucradas en el proceso de adhesión. Así, de manera *in silico*, se ha llegado a determinar que la proteína de membrana externa P2 (Omp-P2) está involucrada en la adhesión, formación de biofilm, así como difusión de metabolitos. Además, han identificado como proteínas involucradas específicamente en el proceso de adhesión, a la proteína de membrana externa HM (OMP-HM), así como a la lipoproteína (Ruiz-Mazón, 2021).

El tratamiento para la manheimiosis se basa en el uso de antibióticos como penicilina, oxitetraciclina, ampicilina, tilmicosina, florfenicol, tulatromicina, entre otros. Sin embargo, cada vez se registran más cepas bacterianas que presenten resistencia a estos fármacos (Jaramillo *et al.*, 2009). Con respecto a la prevención, no se cuentan con vacunas que sean totalmente efectivas. Así, por ejemplo, la inmunización con la cápsula sola o en combinación con otros factores de virulencia, ha resultado en una mayor severidad de las lesiones pulmonares entre los animales vacunados, respecto a los controles (Sreevatsan *et al.*, 1996).

Tomando en cuenta estos factores, en las últimas décadas ha surgido el uso de líneas de tratamiento y prevención alternativas para tratar las infecciones, como es el caso de lactoferrina. Lactoferrina es una glicoproteína del sistema inmune innato de mamíferos, tiene un peso aproximado de 80 kDa, y pertenece a la familia de las transferrinas, que tienen la capacidad de unir hierro a su estructura (Gruden & Poklar, 2021). Esta proteína es producida por el epitelio glandular de distintos órganos y estructuras del organismo, siendo el calostro y la leche, sus principales fuentes (Superti, 2020).

Lactoferrina también puede encontrarse en las lágrimas, secreciones nasales y bronquiales, saliva, secreciones biliares y pancreáticas, orina, así como también en fluidos vaginales y seminales. Además, está presente en las secreciones de los gránulos secundarios de los neutrófilos, en donde su concentración depende de la especie de mamífero. Si bien lactoferrina ha sido caracterizada en muchas especies de mamíferos, desde primates, pasando por roedores, hasta didelfimorfos y camélidos; son la lactoferrina bovina (LfB) y lactoferrina humana (LfH), las que han sido el objeto de estudio de varias investigaciones, principalmente por sus fuentes de producción y por sus características moleculares (Gruden & Poklar, 2021).

Desde un punto de vista estructural, lactoferrina consiste de una cadena polipeptídica única de 689 aminoácidos en el caso de LfB, y de 691 aminoácidos en LfH. Esta cadena polipeptídica se dobla para formar dos lóbulos globulares que representan el extremo N-terminal (aminoácidos 1 al 333) y C-terminal (aminoácidos 345 al 689/691). Ambos lóbulos se conectan por una α hélice corta de tres vueltas (aminoácidos 334 al 344). Cada lóbulo al mismo tiempo se divide en dos dominios (superior e inferior), que en su parte central contienen al sitio de unión al hierro que está formado por cuatro aminoácidos, los cuales son dos tirosinas, un aspartato y una histidina (Gruden & Poklar, 2021).

Existen dos formas de lactoferrina, aquella libre de hierro y menos compacta que se conoce como apo-lactoferrina (apo-Lf), y la que se encuentra saturada con hierro y más compacta, que se denomina holo-lactoferrina (holo-Lf). Cada molécula de lactoferrina puede unir hasta dos átomos de hierro de manera fuerte y reversible, en conjunto con dos aniones CO_3^{-2} acoplados de manera sinérgica. El papel del ion CO_3^{-2} en los sitios de unión al hierro parece estar relacionado con la liberación de hierro a un pH ácido (Baker *et al.* 2005).

La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más importantes por las que atraviesa lactoferrina. De hecho, las moléculas de lactoferrina de todas las especies están glicosiladas, pero los potenciales sitios de glicosilación varían dependiendo de la especie, lo que conlleva al mismo tiempo, al despliegue de su función. Así, LfH tiene tres potenciales sitios de glicosilación a nivel de la asparagina (Asn138, Asn479 y Asn624), mientras que LfB tiene cinco (Asn233, 281, 368, 476 y 545). Sin embargo, sólo dos sitios están usualmente glicosilados en la lactoferrina humana y cuatro en el caso de la bovina (Gruden & Poklar, 2021).

Respecto a las funciones de lactoferrina, se le han atribuido muchas propiedades que van desde su capacidad como molécula antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasítica, anticancerígena, inmunomoduladora, antiinflamatoria, hasta protectora de la microbiota. Participando, además, en el proceso de regeneración de hueso (manteniendo en equilibrio a las poblaciones de osteoblastos y osteoclastos) (Legrand *et al.*, 2008), y como herramienta para el diagnóstico temprano de Alzheimer (González-Sánchez *et al.*, 2020).

Lactoferrina puede ser cortada por varias enzimas como, por ejemplo, la pepsina, lo que da lugar a la formación de péptidos más pequeños llamados lactoferrinas (Tomita *et al.*, 1991). Estos péptidos han mostrado una actividad antimicrobiana mejorada respecto a la molécula integral de lactoferrina, por lo que su utilización en investigación ha sido bastante amplia. De esta manera, el papel antibacteriano de lactoferrina al mismo tiempo se puede dividir en una actividad bacteriostática y otra de carácter bactericida (Gruden & Poklar, 2021).

La actividad bacteriostática se relaciona con la capacidad de lactoferrina de quelar hierro, con lo que las bacterias quedan privadas de este nutriente fundamental para su crecimiento y metabolismo. Por otro lado, la actividad bactericida se relaciona con su capacidad de unión e interacción directa con el lipopolisacárido (LPS), así como con las OMPs en el caso de bacterias Gram-negativas. Así, lactoferrina produce la liberación del LPS, incrementando la permeabilidad de la membrana. En el caso de las bacterias Gram-positivas, el efecto bactericida, se corresponde con la capacidad de lactoferrina de unirse al ácido lipoteicoico, disminuyendo la carga negativa de la superficie y facilitando la acción de la lisozima (Leitch & Willcox, 1999).

Lactoferrina también tiene la capacidad de interactuar y de unirse a los receptores de membrana de muchas células involucradas en la respuesta inmunitaria. De esta manera, influye en la modulación de expresión génica que implica actividades tan variadas como la activación celular, así como la producción de citocinas. Se ha reportado que lactoferrina es capaz de unirse a receptores de membrana de macrófagos, tales como receptores mCD14 y el receptor 4 tipo toll (TLR-4) para producir distintos tipos de funciones como la producción de CD40, así como IL-6 en modelos de ratón (Drago-Serrano *et al.*, 2008).

ANTECEDENTES

Como antecedentes generales, se pueden mencionar algunos de los trabajos llevados a cabo en el laboratorio 52 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV/IPN y que involucran al efecto de lactoferrina sobre algunos de los factores de virulencia de *M. haemolytica* A2.

El trabajo de Ávalos-Gómez y colaboradores (2020), evaluó el efecto de apo-LfB sobre la secreción de vesículas de membrana externa (OMVs por sus siglas en inglés), así como de la LktA de *M. haemolytica* A2. En primer lugar, los autores determinaron que apo-LfB tiene un efecto bactericida en contra de *M. haemolytica* A2 a partir de una dosis de 16 μ M de la glicoproteína.

De esta manera, usaron concentraciones subletales de apo-LfB (2 a 8 μ M), en donde determinaron que, a mayor dosis de la misma, aumenta la secreción de OMVs, posiblemente por las condiciones de estrés a las que está sometida la bacteria. Además, se determinó que a mayor dosis de apo-LfB, también aumenta la secreción de la LktA en los sobrenadantes posiblemente por su capacidad de quelar el hierro. También se observó que apo-LfB induce una morfología alterada de la membrana externa bacteriana, así como de la membrana de las OMVs.

Ramírez-Rico y colaboradores (2021), analizaron el efecto de apo-LfB sobre la producción y secreción de proteasas de *M. haemolytica* A2 en sobrenadante de cultivo, así como en su liberación dentro de OMVs. Mediante ensayos de zimografía, se demostró que concentraciones subletales de apo-LfB disminuyeron la secreción de proteasas de la bacteria. Por otro lado, la caracterización química reveló que dichas proteasas correspondían a cisteína proteasas y metaloproteasas.

A través de Western blot, se determinó que apo-LfB disminuyó la secreción de una metaloproteasa de 100 kDa, toda vez que la proteasa se encontraba presente en el citoplasma y en las OMVs, pero no en los sobrenadantes. Además, se determinó que las proteasas de la bacteria llevan a cabo el corte de apo-LfB, lo que da lugar a la formación de péptidos más pequeños que como se conoce, tienen una acción antibacteriana mejorada.

Como antecedentes específicos, cabe resaltar el trabajo de Alugupalli y Kalfas (1995), que evaluó el efecto inhibitorio de lactoferrina sobre la adhesión de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Prevotella intermedia*, bacterias Gram-negativas asociadas a

la periodontitis, a monocapas de fibroblastos y células HEp-2, KB y HeLa. Mediante el radio marcaje de la bacteria, así como por tinción de Giemsa, se cuantificó al número de bacterias adheridas a cada tipo celular. Se concluyó que apo-LfB y humana disminuyeron significativamente la adhesión de las dos especies bacterianas en una manera dosis dependiente en el rango de concentración de 0.5 a 2500 µg/ml.

La investigación de Nascimento de Araújo & Gimenes Giugliano (2001) evaluó el efecto de lactoferrina y el componente secretor libre de la leche humana (fSC), inhibieron la adhesión de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) a células HeLa. Para este propósito, los autores fraccionaron las proteínas de la leche usando una metodología para purificar al fSC, lo que al mismo tiempo permitió el aislar a lactoferrina. Este estudio concluyó que fSC y lactoferrina inhibieron la adhesión de EPEC a células HeLa.

Berlutti y colaboradores (2004), evaluaron el papel de lactoferrina y la influencia del hierro en la agregación y la formación de biofilm en *Streptococcus mutans*, bacteria conocida por ser el agente etiológico principal de la caries dental. Aquí, se determinó que apo-LfB fue capaz de aumentar la agregación de este patógeno por su capacidad de unir hierro a su estructura. Con esto, el patógeno era capaz de iniciar con procesos de adhesión a superficies abióticas, así como con la formación de biofilm como parte de sus mecanismos o factores de virulencia.

En la investigación de Ochoa y colaboradores (2006), los autores evidenciaron la acción de lactoferrina sobre la adhesión de *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Así, lactoferrina bovina en concentraciones de 1.0 y 0.1 mg/ml, inhibió el crecimiento de EAEC y al mismo tiempo, disminuyó la adhesión de la bacteria a células HEp-2 como se pudo comprobar por microscopía electrónica, así como por el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Además, los autores determinaron que esta inhibición en la adhesión de EAEC se da por la inducción de la liberación y degradación de fimbrias adherentes agregativas, que juegan un papel fundamental en el proceso de adhesión.

En el trabajo de Kisiela y Czuprynski (2009), los autores identificaron y caracterizaron a las adhesinas de *M. haemolytica* A1. En primer lugar, demostraron mediante un ensayo de adhesión que la bacteria es capaz de adherirse a células epiteliales bronquiales bovinas. Además, por Western blot se determinó que las proteínas que se unían a estas células mostraban un peso molecular aparente de ~ 30 kDa. La secuenciación de péptidos de estas

proteínas arrojó como resultado que estas adhesinas son la proteína A de membrana externa modificable por calor (OmpA) y la lipoproteína 1 (Lpp1).

Finalmente, es importante mencionar el trabajo de tesis *in silico* de Ruiz-Mazón (2021), quien analizó el efecto de lactoferrina bovina sobre la adhesión y la formación de biofilm de *M. haemolytica* A2. La autora a través de análisis bioinformáticos determinó a la proteína de membrana externa P2 (Omp-P2) de 50kDa y 372 aminoácidos como una proteína involucrada en la adhesión, formación de biofilm, así como difusión de metabolitos. Además, en este trabajo se identificaron como proteínas involucradas específicamente en el proceso de adhesión, a la proteína de membrana externa HM (OMP-HM) de 40.5 kDa y 367 aminoácidos, así como a la lipoproteína de 30 kDa y 277 aminoácidos.

JUSTIFICACIÓN

M. haemolytica es considerada como el agente causal de la manheimiosis. El serotipo A1 es el responsable de producir manheimiosis en el ganado bovino, mientras que el serotipo A2 es el agente etiológico de la manheimiosis en ovinos (Juscamayta *et al.*, 2017). Aparte de todos los signos clínicos que contribuyen al deterioro en la salud de los animales, esta patología implica una baja ganancia de peso del ganado y una baja eficiencia de conversión alimenticia en los animales más afectados (Zecchinon *et al.*, 2005).

La manheimiosis representa costos extras de producción entre tratamientos, medidas de prevención, y las consecuencias de un bajo rendimiento y desempeño de los animales. En los estadios más avanzados, esta enfermedad conduce a la muerte del ganado por un proceso neumónico, por lo que la manheimiosis se traduce en grandes pérdidas económicas para el sector ganadero cada año (Hussain *et al.*, 2017).

Si bien se conoce que la manheimiosis bovina contribuye a un 30% de la mortalidad total en bovinos, y al menos 1% en las ganaderías de engorda (Lo, 2021), es prácticamente nula la información con la que se cuenta en la actualidad respecto a la incidencia, prevalencia o datos de morbilidad y mortalidad en el caso de manheimiosis en el ganado ovino causada por *M. haemolytica* A2 (Ávalos-Gómez *et al.*, 2020).

Por otro lado, y hablando específicamente del proceso de adhesión de la bacteria, si bien se han identificado y caracterizado algunas adhesinas, y se ha estudiado el proceso de adhesión en *M. haemolytica* A1 (Kisiela & Czuprynski, 2009), no se cuentan con datos respecto de las proteínas o moléculas que actúan como adhesinas en el serotipo A2. Tampoco se ha estudiado el proceso de adhesión propiamente dicho en este serotipo, ni tampoco se conoce el efecto que lactoferrina puede tener sobre la adhesión.

En este sentido, es de trascendental importancia en primer lugar, estandarizar metodologías y técnicas que permitan la obtención de los tipos celulares ovinos adecuados en donde se pueda posteriormente llevar a cabo ensayos de adhesión bacteriana. Así, se puede evaluar el efecto de lactoferrina bovina sobre la adhesión de la bacteria con el fin de alcanzar una comprensión sistemática e integral acerca del proceso de adhesión de *M. haemolytica* A2 a células ovinas en presencia de lactoferrina bovina.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los factores de virulencia, así como la patogenia de *M. haemolytica* A2 están poco caracterizadas. De tal manera, aún no se cuenta con información respecto al proceso de adhesión de este patógeno a las células ovinas que infecta, ni de su relación con tratamientos alternativos como el uso de lactoferrina. En este sentido, es importante estandarizar técnicas de obtención de las células en las que se puede estudiar este fenómeno, así como de los ensayos de adhesión correspondientes.

Así, surge la cuestión de cómo apo-LfB administrada en una manera dosis dependiente podría influir en el proceso de adhesión de este microorganismo a células bucoepiteliales de ovino, así como a monocitos y macrófagos ovinos de sangre periférica. Estos datos, sin duda, proporcionarán información relevante que permita analizar de mejor manera la adhesión de *M. haemolytica* A2 y caracterizar posteriormente de manera integral a este fenómeno con el fin de buscar soluciones a la problemática que enfrentan animales y el sector ganadero cada año al tratar de hacer frente a la mannheimiosis en ovinos.

HIPÓTESIS

Apo-lactoferrina bovina disminuirá la adhesión de *Mannheimia haemolytica* A2 a células ovinas en una manera dosis dependiente.

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar protocolos para la obtención de células ovinas, en las que se pueda evaluar el efecto de apo-Lactoferrina bovina sobre la adhesión de *Mannheimia haemolytica* A2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar los parámetros adecuados para la obtención de células bucoepiteliales ovinas, así como de monocitos y macrófagos ovinos de sangre periférica con la finalidad de evaluar el efecto de apo-Lactoferrina bovina sobre la adhesión de *Mannheimia haemolytica* A2 a estos tipos celulares.

Analizar el efecto de apo-Lactoferrina bovina sobre la adhesión de *Mannheimia haemolytica* A2 a células bucoepiteliales ovinas, así como a monocitos y macrófagos ovinos de sangre periférica.

METODOLOGÍA

Cepa bacteriana y lactoferrina

Se trabajó con el serotipo A2 de *M. haemolytica*, mismo que fue obtenido de los pulmones con neumonía de un ovino que falleció de manheimiosis. El serotipo bacteriano fue determinado anteriormente por el equipo de trabajo del laboratorio 52 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV/IPN. Para este propósito, se utilizó la técnica de hemaglutinación indirecta usando como referencia un antisuero. La bacteria fue sembrada en placas de agar de sangre e incubada por 24 horas a 37 °C (Figura 1).



Figura 1. Cultivo de *M. haemolytica* A2 de 24 horas en medio agar sangre por el método de siembra de purificación de colonias.

Se utilizó apo-LfB con una pureza del 97%, y un contenido de hierro de 5 mg/100 g; misma que fue adquirida de NutriScience Innovations, LLC, CT, Estados Unidos. La preparación de apo-LfB se esterilizó por filtración mediante el uso de filtros de nitrocelulosa de 0.22 (Millipore, Ireland), y posteriormente se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford, usando un lector de microplacas de absorbancia marca ELX808, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC. Finalmente, se almacenó en alícuotas bajo congelación (Figura 2).



Figura 2. Alícuotas de apo-LfB almacenadas bajo congelación una vez preparadas.

Viabilidad de la bacteria

Se colocó apo-LfB en dosis de 4 μM , 8 μM , 20 μM , 30 μM y 50 μM a tubos de vidrio estériles con 10 ml de medio de infusión cerebro corazón (BHI) líquido. El ensayo de viabilidad de la bacteria, partió con un inóculo de 1×10^6 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), que se colocó en cada tubo con apo-LfB, siendo las bacterias incubadas a 37 °C y en agitación por una hora. El monitoreo del crecimiento bacteriano fue evaluado mediante el plaqueo de cada muestra en agar BHI a los 0, 15 y 60 minutos. La incubación se llevó a cabo por 24 horas para después de este tiempo, poder efectuar la numeración de las UFC.

Estandarización del ensayo de adhesión a células bucoepiteliales

- **Obtención y transporte de muestras**

Las células bucoepiteliales ovinas se obtuvieron a través de la realización de un hisopado de los carrillos internos de un ovino. Las muestras se colectaron en tubos de vidrio estériles con buffer de ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES), y fueron trasladadas al laboratorio 52 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV/IPN. Posteriormente, se modificó el medio de transporte de buffer HEPES más contenido antibiótico, y finalmente a medio a Roswell Park Memorial Institute (RPMI) a manera de tratar de estandarizar el procedimiento.

- **Obtención de células bucoepiteliales de ovino y humanas**

Los tubos con las muestras de células bucoepiteliales ovinas en medio HEPES, se sometieron a centrifugación a 430 g por 10 minutos hasta obtener un primer pellet de células. Se desechó el sobrenadante y se realizaron tres lavados en el mismo buffer, centrifugando a 430 g por 10 minutos hasta la obtención del pellet final de células

bucoepiteliales de ovino. El mismo procedimiento se realizó para la obtención de células bucoepiteliales humanas.

- **Obtención de la bacteria**

Se partió de un cultivo en placa de agar de sangre de *M. haemolytica* A2 de 24 horas. Posteriormente se pasó el cultivo a medio BHI líquido en un tubo de 10 ml. Se centrifugó a 840 g por 10 minutos y se obtuvo el pellet correspondiente a la bacteria. Se desechó el sobrenadante y se realizaron dos lavados añadiendo HEPES y centrifugando a 3780 g por 10 minutos hasta obtener el pellet final.

- **Ensayo de adhesión**

Se añadieron 1×10^6 UFC de la bacteria (multiplicidad de infección (MOI): 1:100) a cada tubo con el pellet de células bucoepiteliales ovinas y humanas, dejando un tubo control, y se dejó en interacción por una hora a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

- **Montaje de placas**

Se colocaron dos gotas de muestra de cada tubo en placas portaobjetos de vidrio previamente esterilizadas y se dejó secar por 20 minutos. Posteriormente se colocó una gota de paraformaldehído al 4% a cada muestra para fijar las mismas, dejando secar por 20 minutos. Se colocó azul de metileno a cada muestra hasta su secado por 20 minutos. Finalmente, se colocó cubreobjetos de vidrio previamente esterilizados sobre las muestras fijadas y secas, adicionando barniz para montar la placa en su totalidad.

- **Microscopía óptica**

Se observaron las muestras en un microscopio Zeiss Primo Star con el objetivo de 100X y usando aceite de inmersión. Se contaron 12 células bucoepiteliales ovinas y 12 humanas para poder realizar la cuantificación de la adhesión bacteriana.

Ensayo de adhesión a monocitos y macrófagos ovinos de sangre periférica

- **Obtención y transporte de muestras**

La sangre se obtuvo de un ovino procedente de los corrales de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (FES - Cuautitlán UNAM). Se obtuvieron 100 ml de sangre por punción intravenosa de la vena yugular del animal, mediante la utilización de una aguja Vacutainer verde de 50 x 20. La sangre se colectó en tubos

Vacutainer con heparina/sodio de 6 ml (Figura 3), y fue trasladada hacia el laboratorio 52 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV/IPN.



Figura 3. Ovinos del corral de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la FES Cuautitlán, UNAM (A). Obtención de la sangre por punción intravenosa en la vena yugular interna del animal (B).

- **Cultivo celular de monocitos y macrófagos de sangre periférica y adición de lactoferrina**

La sangre colectada se pasó a tubos cónicos de poliestireno de 50 ml para posteriormente generar un gradiente añadiendo Lymphoprep (siguiendo las indicaciones del fabricante), y realizando una centrifugación a 840 g por 15 minutos a temperatura ambiente (Figura 4). Una vez que se obtuvieron las poblaciones celulares sanguíneas separadas por el gradiente, se recuperó la capa de células blancas y se procedió a separar a los monocitos con perlas CD14 (Figura 5). La población purificada se pasó a dos placas Lab-Tek de 12 pozos en donde se añadió medio RPMI complementado (2ml de RPMI, 10% de suero del animal y 1% de antibiótico). Ambas placas se mantuvieron a 37 °C en 5% de CO₂ en una incubadora marca Forma Scientific.

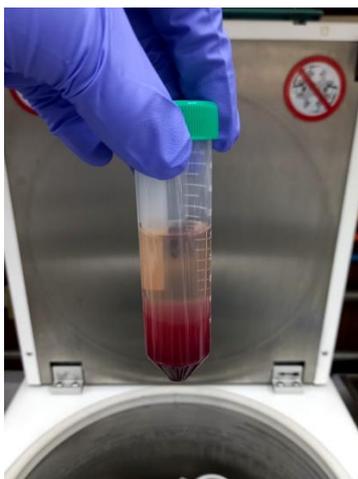


Figura 4. Gradiente obtenido con Lymphoprep. Se pueden observar a las poblaciones celulares sanguíneas separadas de acuerdo a su densidad.



Figura 5. Separación de monocitos ovinos de sangre periférica mediante la utilización de perlas o anticuerpos CD14.

En el caso de la placa con los monocitos, se colocó apo-LfB (en concentraciones de 4 μM , 8 μM , 20 μM , 30 μM y 50 μM) a cada uno de los pozos, dejando un tratamiento control, antes de ser ingresada a la incubadora por una hora, previa la realización del ensayo de adhesión bacteriana. Para los macrófagos, se procedió a cambiar de medio a las células cada día, añadiendo, además, 2 μl de factor de crecimiento colonia granulocito – macrófago (GM-CSF) a cada uno de los pozos. Al tercer día de haber realizado el cultivo, se procedió a efectuar el mismo tratamiento que para los monocitos, con la adición de apo-LfB en las mismas concentraciones, previa la realización del ensayo de adhesión.

- **Obtención y marcaje de la bacteria**

Se partió de un cultivo en placa de agar de sangre de *M. haemolytica* A2 de 24 horas. Posteriormente se pasó el cultivo a un medio de BHI líquido en un tubo de 10 ml. Se centrifugó a 2160 g por 10 minutos y se obtuvo el pellet correspondiente a la bacteria. Se desechó el sobrenadante y se realizaron dos lavados añadiendo buffer fosfato salino (PBS) y centrifugando a 2160 g por 10 minutos hasta obtener el pellet final. La bacteria se añadió a 10 ml de 0.01% de isotiocianato de fluoresceína (FITC por sus siglas en inglés) en 0.2 M de un buffer de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ a un pH de 9.6, siendo incubada a en hielo por 15 minutos (Figura 6).



Figura 6. *M. haemolytica* A2 marcada con FITC. Se observa el pellet con la bacteria marcada en el fondo del tubo después de haber centrifugado.

- **Ensayo de adhesión**

Se añadieron 1×10^6 UFC de la bacteria marcada con FITC (multiplicidad de infección (MOD): 1:100) a cada pozo de la placa con monocitos o macrófagos, y se los dejó interactuar por 15 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Posteriormente, se retiró el medio y se añadió 100 μl de paraformaldehído por 30 minutos para fijar la muestra, y luego se realizaron 3 lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se dejó incubar a la muestra con 150 μl de Tritón X-100 al 0,2% por 10 minutos para impermeabilizar la membrana nuclear de los monocitos o macrófagos. A continuación, se añadió 50 μl de DAPI para teñir al núcleo de monocitos o macrófagos. Finalmente, se montó la placa con la adición de Becta shield y un cubreobjetos de vidrio para poder observar la muestra.

- **Microscopía confocal y de fluorescencia**

Las bacterias adheridas a cada monocito o macrófago, se contaron utilizando un microscopio de epifluorescencia marca Nikon ECLIPSE E600, a través del uso del objetivo de 100X más aceite de inmersión. Se contaron 20 células por campo. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio confocal marca Leica DMI8 y analizadas y procesadas mediante la utilización del software LAS-X (Figura 7).

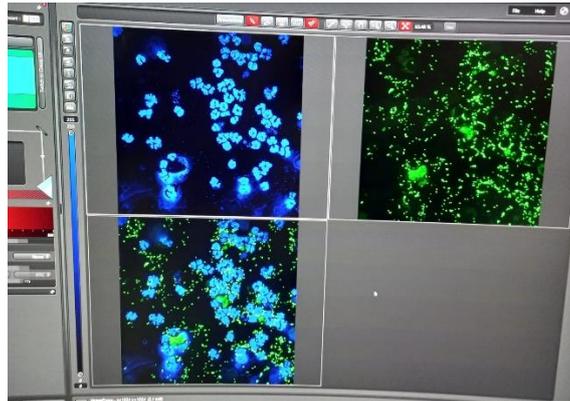


Figura 7. Análisis y procesamiento de las fotografías tomadas mediante microscopía confocal, en el software LAS-X.

- **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó cabo usando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, mismo que permite establecer la existencia o no de diferencias estadísticas significativas entre las medias de tres o más grupos. Para esto, se usó el programa GraphPad Prism versión 6. Además, se utilizó Microsoft Excel para la elaboración de las bases de datos y gráficos iniciales.

RESULTADOS

Apo-LfB tiene un efecto bactericida en contra de *M. haemolytica* A2 en una manera dosis dependiente y temporal dependiente

La cuenta viable muestra como apo-LfB tiene un efecto bactericida en contra de *M. haemolytica* A2 después de la primera hora de haber utilizado diferentes dosis de la glicoproteína. Se observa que a los 15 minutos (tiempo en el que se produce la interacción entre la bacteria y los monocitos y macrófagos ovinos de sangre periférica con apo-LfB en los ensayos de adhesión), apenas se puede evidenciar un ligero crecimiento de la curva y el inicio de la fase de crecimiento logarítmico de los cultivos (Figura 8).

De esta manera, para los ensayos de adhesión con monocitos y macrófagos ovinos de sangre periférica, se procedió a realizar la interacción de estas células blancas (previamente cultivadas con apo-LfB en dosis de 4 μ M, 8 μ M, 20 μ M, 30 μ M y 50 μ M de apo-Lf por una hora) con *M. haemolytica* A2 por el lapso de 15 minutos, después de haber analizado que la viabilidad de la bacteria no se ve afectada en este tiempo.

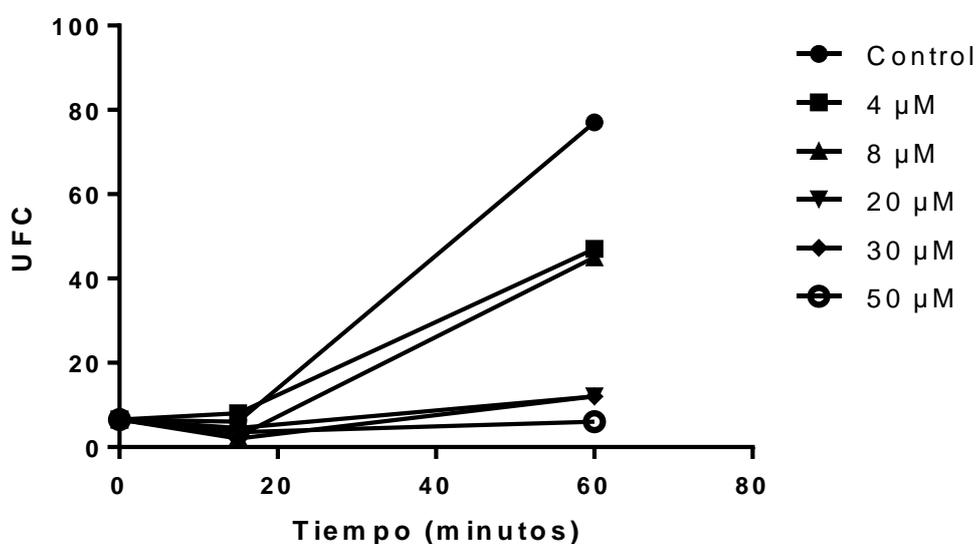


Figura 8. Viabilidad de *M. haemolytica* A2 en presencia de diferentes dosis de apo-LfB. Los cultivos se iniciaron con 1×10^6 de inóculo de la bacteria y fueron incubados a 37 °C en agitación por una hora. Se procedió a realizar la cuantificación del número de UFC en los tiempos indicados.

***M. haemolytica* A2 se adhiere a células bucoepiteliales ovinas y humanas, pero no a monocitos ni a macrófagos humanos de sangre periférica**

El ensayo de adhesión de *M. haemolytica* A2 a células bucoepiteliales ovinas y humanas, no se llevó a cabo en presencia de apo-LfB por la dificultad que se presentó al momento

de obtener un buen pellet de células bucoepiteliales ovinas, con el cual poder realizar el ensayo. Este hecho, dificultó la realización de un análisis estadístico respecto al pellet de células bucoepiteliales humanas, del cual se obtuvo un buen número de células en los cinco experimentos independientes llevados a cabo. Además, otro hecho que dificultó el ensayo, fue la presencia de poblaciones bacterianas compuestas sobre todo por cocos provenientes de la flora oral normal de los animales al momento de la toma de muestras (Figura 9).

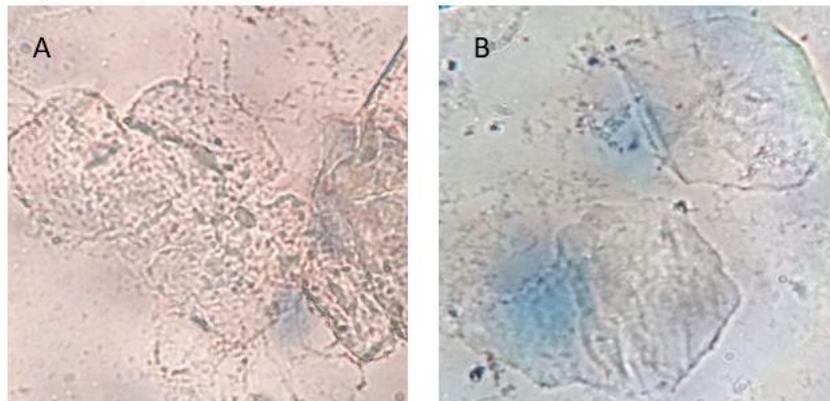


Figura 9. Células bucoepiteliales ovinas (A) y células bucoepiteliales humanas (B) sin interacción con *M. haemolytica* A2. Se puede observar que, en el caso de las células ovinas, están presentes algunos cocos, provenientes de la flora oral normal de los animales. Aumento 100X.

De esta manera, se procedió a recuperar 12 células bucoepiteliales de ovino (el máximo número de células recuperadas en uno de los experimentos) y a tomar en cuenta a sólo 12 células bucoepiteliales humanas, para poder realizar el análisis de la adhesión celular. Además, para la cuantificación se contó solamente a las bacterias con morfología cocobacilar, descartando a las poblaciones de cocos. Así, se pudo constatar en primer lugar como *M. haemolytica* A2 se unió tanto a células bucoepiteliales ovinas, así como humanas (Figura 10), lo que no ocurrió en el caso de monocitos ni de macrófagos humanos de sangre periférica, en donde no se evidenció adhesión por parte de la bacteria (Figura 11).

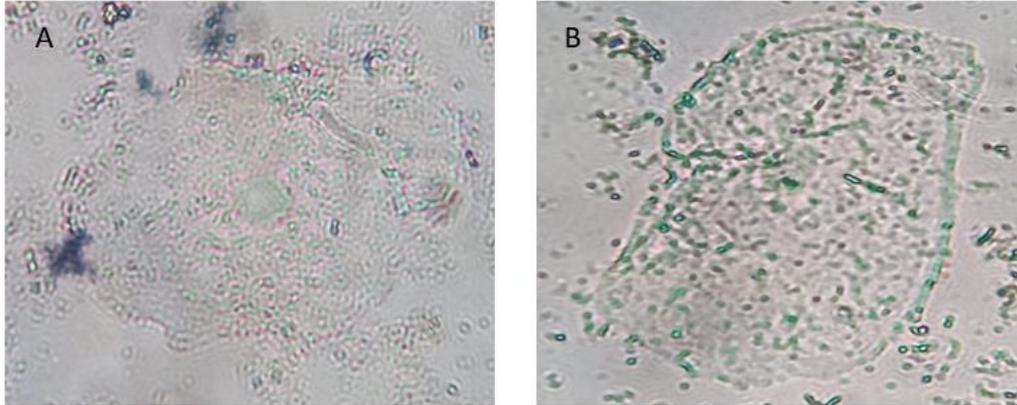


Figura 10. Bacterias adheridas a la superficie de una célula bucoepitelial ovina (A) y una célula bucoepitelial humana (B). Se puede observar que aparte de bacterias con morfología cocobacilar, se evidencian varias poblaciones de cocos, provenientes de la flora oral normal, tanto en ovinos como en humanos. Aumento: 100X.

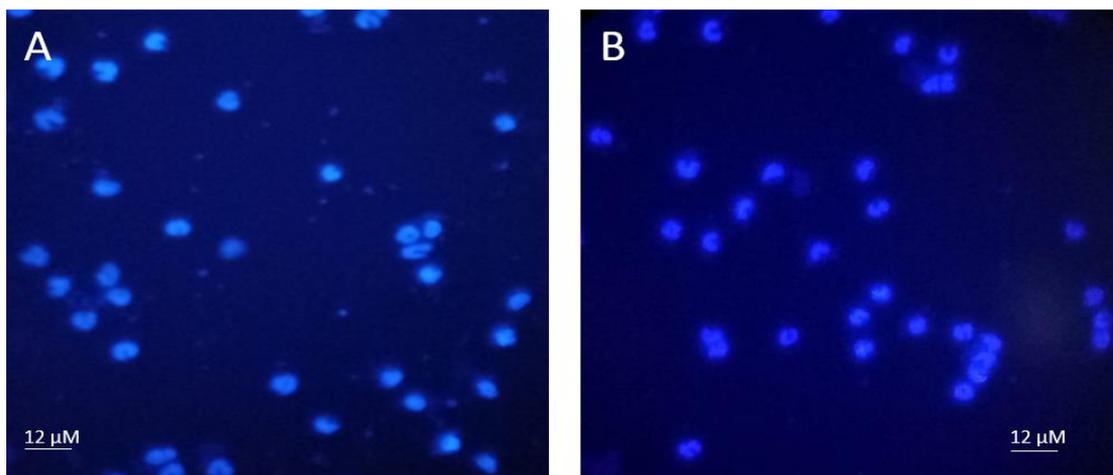


Figura 11. Monocitos humanos de sangre periférica (A) y macrófagos humanos de sangre periférica (B) teñidos con DAPI. No se observa la presencia de adhesión celular por parte de *M. haemolytica* A2 que fue marcada con FITC. Aumento: 40X.

Por otro lado, la cuantificación del ensayo de adhesión de *M. haemolytica* A2 a células bucoepiteliales ovinas y humanas, indicó que no existe diferencias significativas entre el número de bacterias adheridas entre los dos tipos celulares. A pesar de esto, no se pudo efectuar un análisis estadístico al tener un solo experimento sin repeticiones, por las dificultades en la obtención del pellet descritas anteriormente. De esta forma, el promedio de bacterias adheridas a células bucoepiteliales ovinas fue de 15,33 bacterias por cada célula bucoepitelial, mientras que en el caso de las células bucoepiteliales humanas, el promedio fue de 12,5 bacterias adheridas por célula (Figura 12).

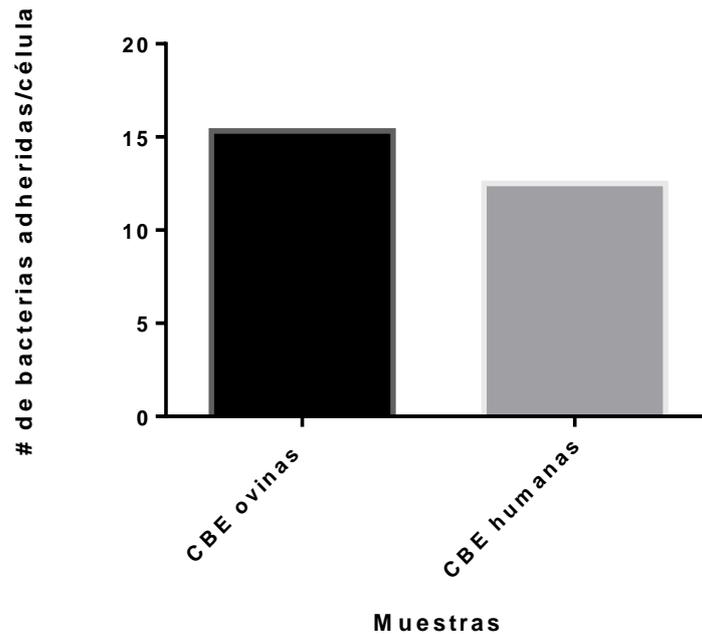


Figura 12. Cuantificación del ensayo de adhesión de *M. haemolytica* A2 a células bucoepiteliales ovinas y humanas. Se tomó en cuenta a 12 células ovinas y 12 células humanas. No se observa una diferencia marcada entre el número de bacterias adheridas a ambos tipos celulares. El gráfico muestra el resultado de un experimento independiente llevado a cabo.

Las poblaciones de monocitos adquieren características morfológicas similares a las de macrófagos en el tercer día de haber sido purificadas

Como se mencionó en la metodología, el ensayo de adhesión a monocitos ovinos de sangre periférica se efectuó el mismo día en el que se purificó a esta población celular, mientras que el mismo ensayo, pero con macrófagos, se realizó al tercer día. Esto básicamente se debió a que las poblaciones de monocitos evidenciaron una morfología similar a la de poblaciones de macrófagos en el tercer día de su incubación. Los macrófagos presentan una morfología irregular caracterizada por varias prolongaciones, propia de su proceso de diferenciación, lo contrario de los monocitos ovinos de sangre periférica (Figura 13).

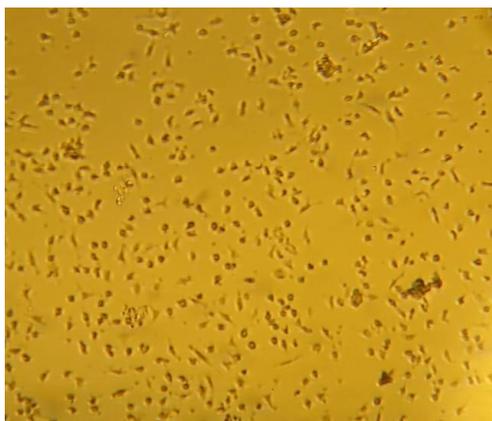
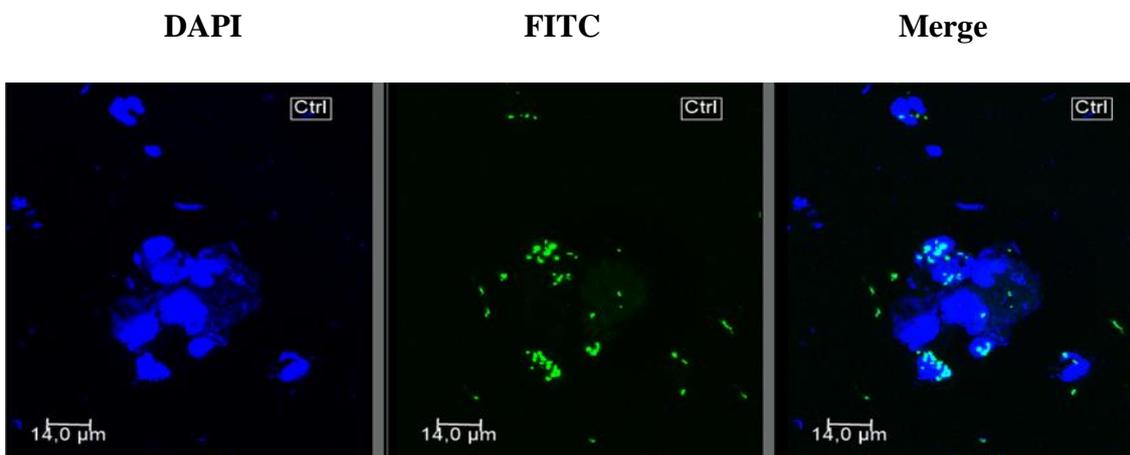


Figura 13. Macrófagos ovinos de sangre periférica completamente diferenciados después de tres días de su purificación como monocitos. Aumento: 10X.

Apo-LfB disminuye la adhesión de *M. haemolytica* A2 a monocitos ovinos de sangre periférica en una manera dosis dependiente

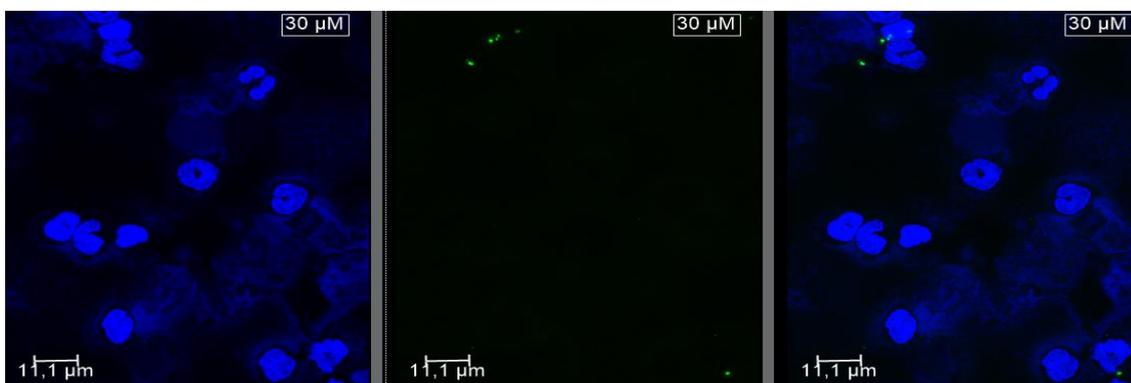
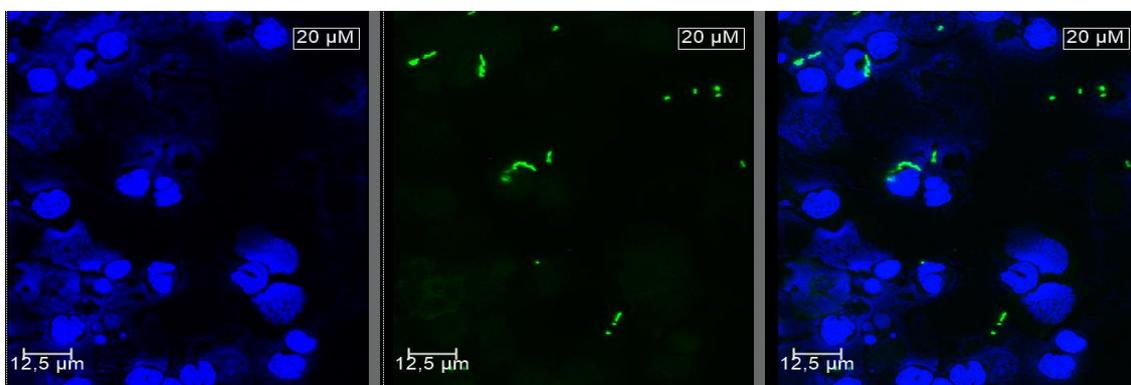
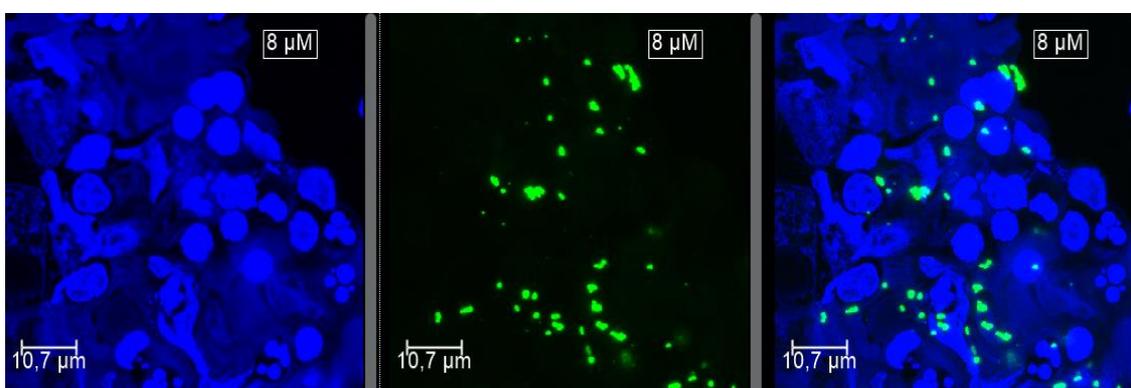
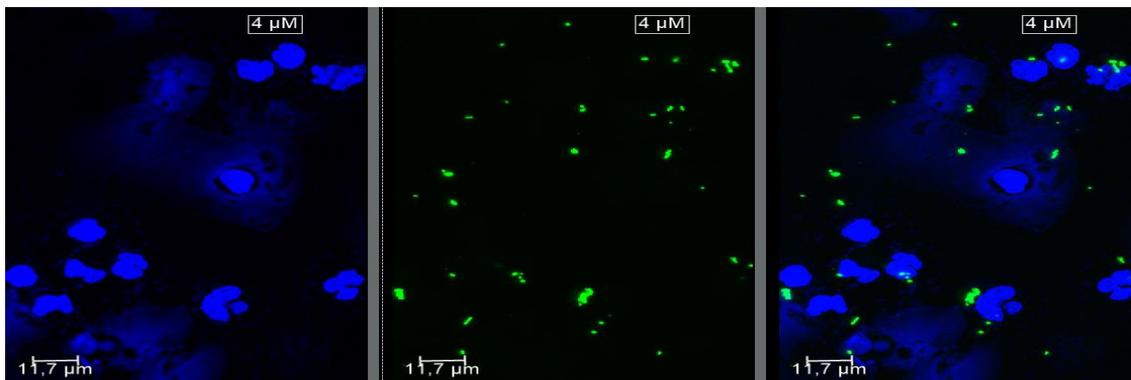
Las imágenes de microscopía confocal muestran en el lado izquierdo a los núcleos de los monocitos teñidos con DAPI, en el centro a las bacterias teñidas con FITC, y en el lado derecho se puede observar el merge entre DAPI y FITC, del grupo control (sin apo-LfB), así como de los tratamientos de 4 μ M, 8 μ M, 20 μ M, 30 μ M y 50 μ M de apo-LfB en el ensayo de adhesión bacteriana. Se observa como el número de bacterias adheridas a cada monocito, disminuye a medida que aumenta la dosis de apo-LfB (Figura 14).



DAPI

FITC

Merge



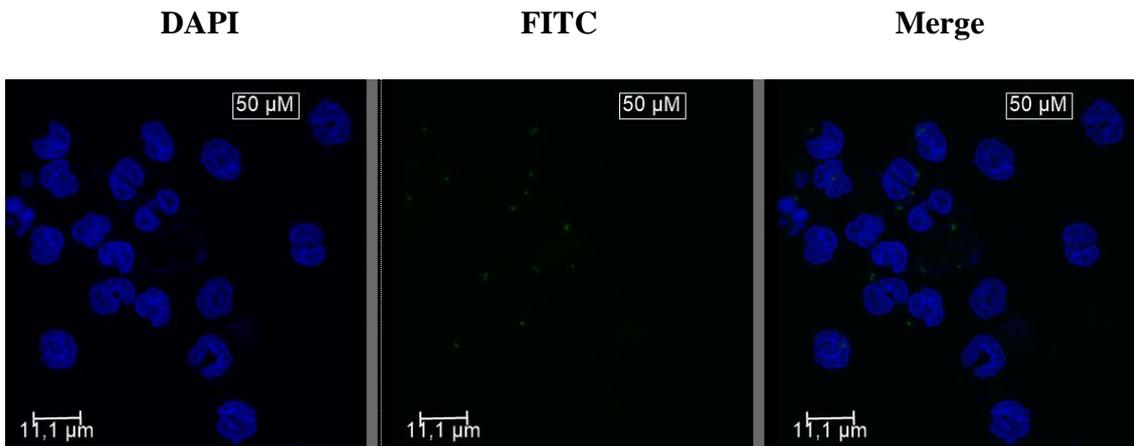


Figura 14. Microscopía confocal de monocitos ovinos de sangre periférica marcados con DAPI (izquierda), *M. haemolytica* A2 marcada con FITC (centro), y merge entre DAPI y FITC (derecha). Se observa que a una mayor dosis de apo-LfB, la adhesión disminuye en este tipo celular.

La cuantificación de este ensayo permitió evidenciar como apo-LfB disminuye la adhesión *M. haemolytica* A2 a monocitos ovinos de sangre periférica en una manera dosis dependiente. Así, las dosis de 20 μM , 30 μM y 50 μM de apo-LfB son las que mostraron una disminución más marcada de la adhesión bacteriana, con un porcentaje de inhibición en la adhesión de 58 %, 69 %, and 68 %, respectivamente (Figura 15). Por lo tanto, apo-LfB disminuyó la adhesión de *M. haemolytica* A2 a monocitos ovinos de sangre periférica en una manera dosis dependiente.

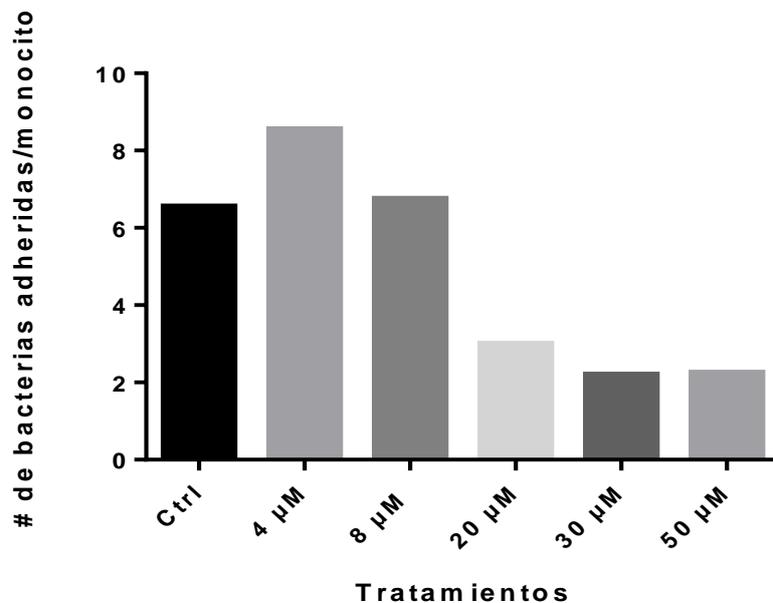
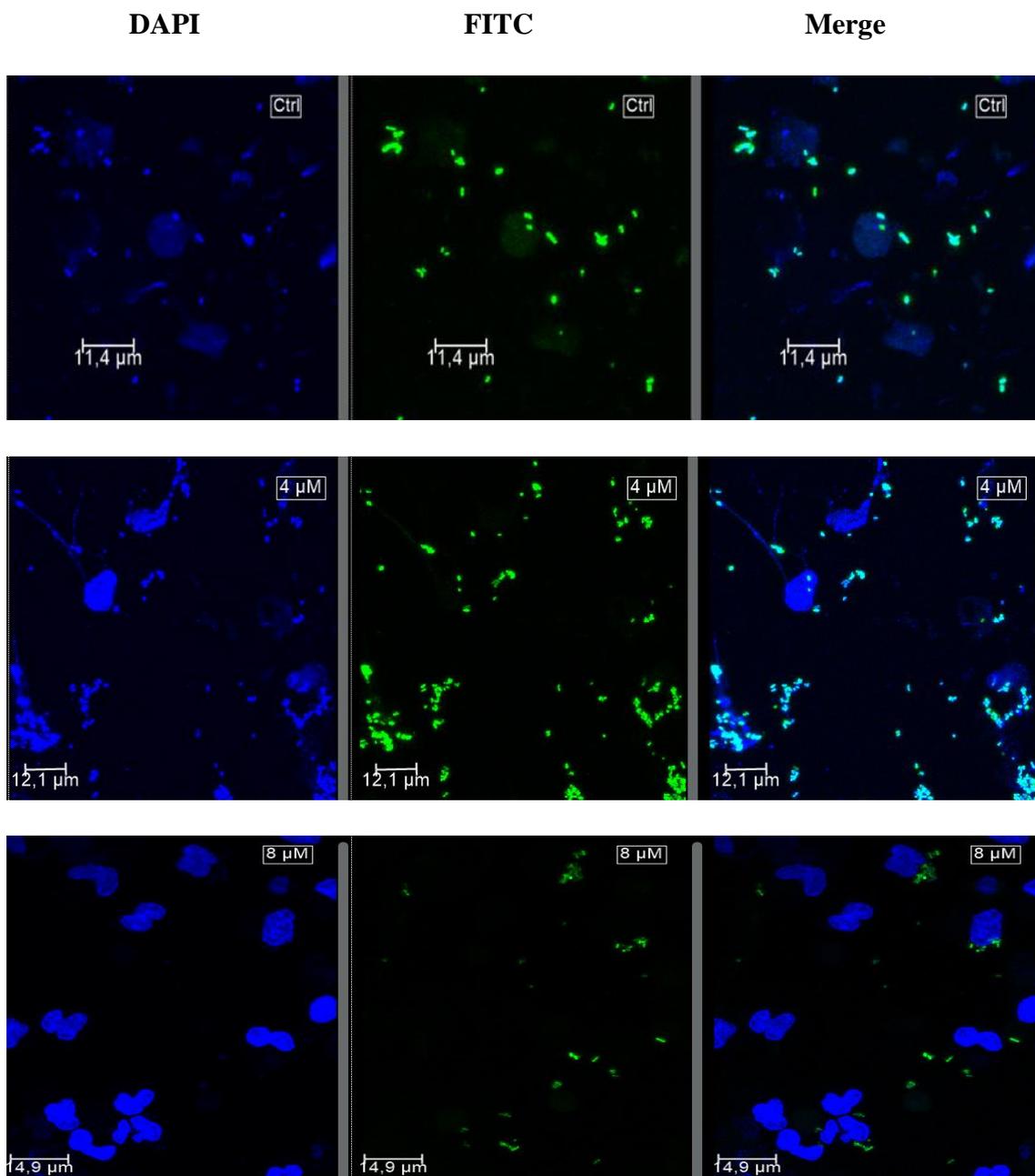


Figura 15. Cuantificación del ensayo de adhesión de *M. haemolytica* A2 a monocitos ovinos de sangre periférica. El gráfico muestra el resultado de un experimento independiente llevado a cabo.

Apo-LfB disminuye la adhesión de *M. haemolytica* A2 a macrófagos ovinos de sangre periférica en una manera dosis dependiente

De manera similar que en el experimento anterior, las imágenes de microscopía confocal muestran en el lado izquierdo a los núcleos de los macrófagos teñidos con DAPI, en el centro a las bacterias teñidas con FITC, y en el lado derecho se puede observar el merge entre DAPI y FITC, del grupo control (sin apo-LfB), así como de los tratamientos de 4 μ M, 8 μ M, 20 μ M, 30 μ M y 50 μ M de apo-LfB en el ensayo de adhesión bacteriana. Se observa como el número de bacterias adheridas por macrófago, disminuye a medida que aumenta la dosis de apo-Lf (Figura 16).



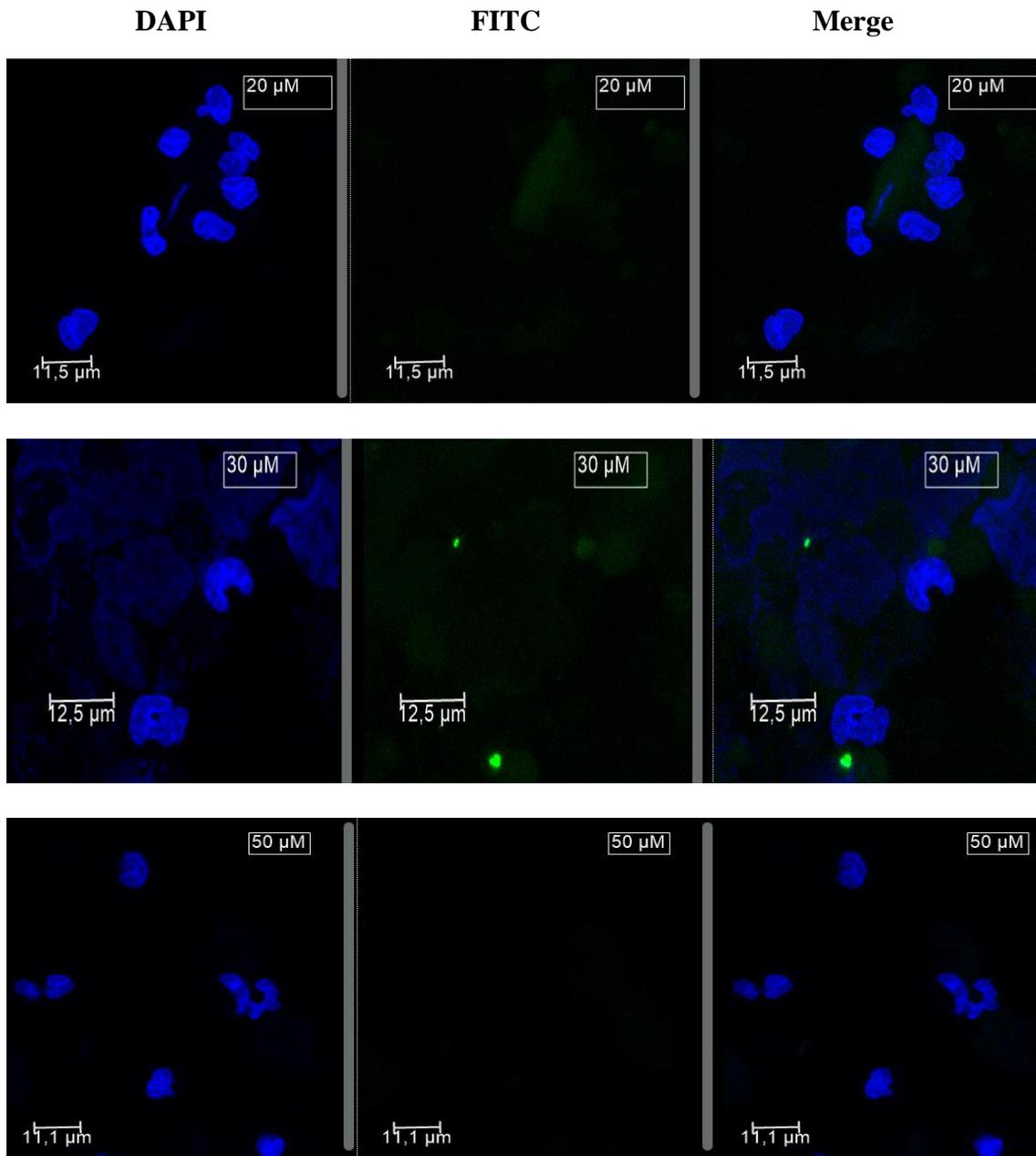


Figura 16. Microscopía confocal de macrófagos ovinos de sangre periférica marcados con DAPI (izquierda), *M. haemolytica* A2 marcada con FITC (centro), y merge entre DAPI y FITC (derecha). Se observa que a una mayor dosis de apo-LfB, la adhesión disminuye en este tipo celular.

La cuantificación de este ensayo permitió evidenciar como apo-LfB disminuye la adhesión *M. haemolytica* A2 a macrófagos ovinos de sangre periférica en una manera dosis dependiente. Así, las dosis de 20 μM , 30 μM y 50 μM de apo-LfB son las que mostraron una disminución más marcada de la adhesión bacteriana, con un porcentaje de inhibición en la adhesión de 34 %, 67 % y 67 %, respectivamente (Figura 17). El análisis de ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de 20 μM , 30 μM y 50 μM , respecto al control. Por lo tanto, apo-LfB disminuyó la

adhesión de *M. haemolytica* A2 a macrófagos ovinos de sangre periférica en una manera dosis dependiente.

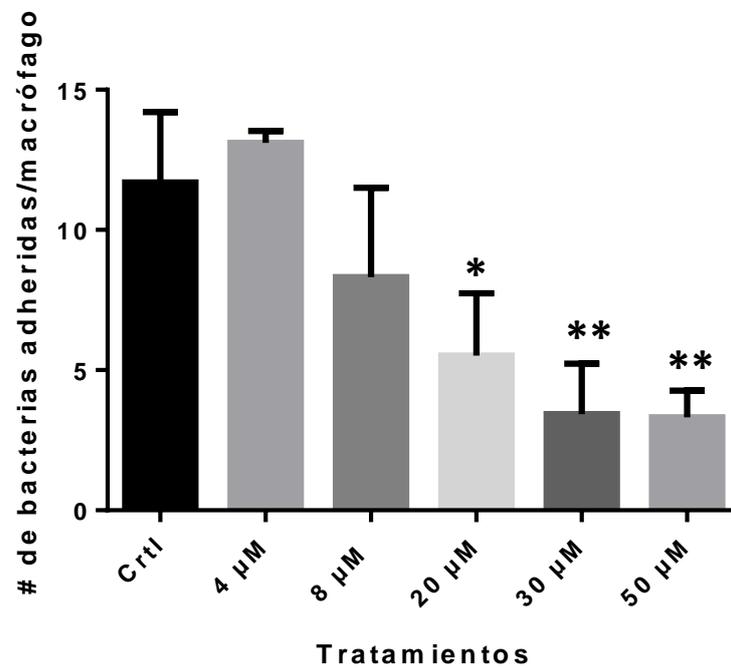


Figura 17. Cuantificación del ensayo de adhesión de *M. haemolytica* A2 a macrófagos ovinos de sangre periférica. El gráfico muestra el resultado de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo en lo referente a la viabilidad de *M. haemolytica* A2 en presencia de diferentes dosis de apo-LfB, evidenciaron que la glicoproteína tiene un efecto bactericida en contra de este microorganismo. Dicho efecto es muy evidente después de una hora de haber iniciado con la cuenta viable, en todos los tratamientos (4 μM , 8 μM , 20 μM , 30 μM y 50 μM de apo-LfB), respecto al control. A su vez el efecto bactericida es muy marcado en los tratamientos de 20 μM , 30 μM y 50 μM después de una hora. Sin embargo, a los 15 minutos el crecimiento bacteriano aún está iniciando, por lo que los cambios en la curva no son aún tan evidentes, por tratarse de un lapso de tiempo muy corto (Figura 1).

Estos resultados podrían ser analizados en conjunto con los de viabilidad de la bacteria, obtenidos previamente en nuestro laboratorio. Así, utilizando dosis de apo-LfB de 4 μM , 8 μM , 12 μM , 16 μM y 20 μM , se observó como los cultivos bacterianos de *M. haemolytica* A2 inician con la fase de crecimiento logarítmico después de una hora de haber sido colocado el inóculo, y alcanzan la fase estacionaria alrededor de la quinta y sexta hora, pudiéndose evidenciar la muerte paulatina de los cultivos bacterianos desde la octava hora.

Posteriormente, se observa un efecto bactericida total a las 24 horas de haber iniciado con el experimento en las dosis de 12 μM , 16 μM y 20 μM . Por lo tanto, si bien se tienen dosis diferentes de apo-LfB en ambos experimentos de viabilidad, a los 15 minutos aún no se puede hablar de muerte de la bacteria, partiendo de un cultivo no sincronizado. Los datos de la cuenta viable sugieren que, para la viabilidad de la bacteria llevada a cabo para la realización de este trabajo, se puede hablar de muerte bacteriana a partir de una hora de haber colocado el inóculo para los diferentes tratamientos de apo-LfB.

En este punto también es importante recalcar el hecho de que, para la realización de esta investigación, las diferentes dosis de apo-LfB (4 μM , 8 μM , 20 μM , 30 μM y 50 μM) se colocaron en el medio con las células, es decir tanto a monocitos, así como a macrófagos ovinos de sangre periférica, por el lapso de una hora. Por lo tanto, es relevante puntualizar que no se puso en interacción directa a apo-LfB con las bacterias, sino que el inóculo de *M. haemolytica* A2 (1×10^6 UFC) fue colocado después de este período de interacción entre la glicoproteína y las células y por un tiempo de 15 minutos.

En síntesis, en este trabajo, se utilizaron tres dosis de apo-LfB superiores a las consideradas como letales (20 μ M, 30 μ M y 50 μ M) para *M. haemolytica* A2 por el hecho de que la glicoproteína no se puso en interacción directa con la bacteria, sino con el cultivo de monocitos y macrófagos ovinos de sangre periférica. El objetivo de realizar esta interacción entre apo-LfB y las células ovinas, fue que la proteína se una a los receptores de membrana de monocitos y de macrófagos, ya que como menciona el trabajo de Drago-Serrano y colaboradores (2008), lactoferrina es capaz de unirse a receptores de membrana de macrófagos, tales como receptores mCD14 y el receptor 4 tipo toll (TLR-4).

Gao y colaboradores (2018), reportaron que lactoferrina es capaz de desencadenar varias funciones en macrófagos a través de su unión, en conjunción con IgG a TLR-4 y Fc γ RIIa (CD32a). Una vez que logra su unión, este complejo de lactoferrina e IgG lleva a cabo toda una cascada de señalización celular en la que induce un cambio en la expresión del fenotipo de estas células blancas.

En este sentido, lactoferrina es capaz de unirse a receptores de membrana de monocitos y macrófagos, con lo que podría inhibir la unión o adhesión de bacterias a la membrana celular de estos leucocitos. Por tal razón, y como ya se expresó anteriormente, la proteína se colocó en interacción con las células blancas por una hora, para posteriormente llevar a cabo la interacción entre monocitos o macrófagos (con apo-LfB unida a sus receptores) y *M. haemolytica* A2.

Por otro lado, y tal como expresa Jeyaseelan y colaboradores (2022), la LktA de *M. haemolytica* es termolábil. Por lo tanto, cuando inicialmente se llevó a cabo el ensayo de adhesión a 37 °C y por un tiempo de 30 minutos, la exotoxina lisó a muchas de las células y el ensayo no pudo seguir adelante. Entonces, se procedió a realizar el ensayo a 4 °C, en donde si bien la LktA no lisó a las células, muchos de los monocitos y macrófagos se despegaron de la placa. En este sentido, se procedió a efectuar el ensayo de adhesión a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) y por el transcurso de 15 minutos, siendo estas las condiciones óptimas para la realización de los experimentos, al no tener muerte de los leucocitos y conservar su adherencia a la placa.

Además, no se puede dejar de mencionar el hecho de que para estudios futuros de adhesión de *M. haemolytica* A2, se pueda disminuir la dosis de apo-LfB hasta una dosis máxima de 20 μ M, para poder observar su efecto sobre la adhesión, puesto que el trabajo de Ávalos-Gómez y colaboradores (2020), en lo que respecta a la cuenta viable de esta

bacteria, indica que a partir de las dosis de 16 μM en adelante, se consideran como letales para la bacteria. De igual forma, en la investigación de Ramírez-Rico y colaboradores (2021), los autores mencionan que dosis superiores a 11.5 μM son consideradas como letales y afectan la viabilidad de la bacteria para la realización de experimentos en los que se evalúen algunos factores de virulencia.

Por otro lado, durante la realización de esta investigación, no se pudo obtener un buen pellet de células bucoepiteliales ovinas, todo lo contrario del pellet de células bucoepiteliales humanas, del cual se pudo recuperar un buen número de células en los cinco experimentos independientes llevados a cabo para el ensayo de adhesión de la bacteria a estas células. Hay que mencionar que se pretendió estandarizar una metodología para la obtención de células bucoepiteliales ovinas, recopilando la información metodológica de investigaciones previas. Sin embargo, no se obtuvieron buenos resultados probablemente por el medio usado al momento de la toma de muestras, así como durante el transporte de las mismas.

De esta manera, es importante modificar las dos condiciones antes descritas para poder obtener un adecuado pellet de células bucoepiteliales ovinas que permita realizar el ensayo de adhesión de *M. haemolytica* A2 a estas células. Así, se podría seguir la metodología del trabajo de Hamer-Barrera y colaboradores (2003) en donde se evalúa la adhesión del serotipo 1 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a células bucoepiteliales de cerdo. Así, los autores después de haber realizado la colecta de células del carrillo interno de estos animales, procedieron a resuspender a las mismas en 0.1 M de Tris-HCl a un pH de 7.2. Posteriormente los autores llevaron a cabo la viabilidad celular mediante la utilización de azul de tripano, obteniendo buenos resultados.

Otro hecho importante que podría mejorar la recuperación de células bucoepiteliales ovinas, podría ser el incorporar parte de la metodología de Taweechaisupapong y colaboradores (2005), en el que los investigadores extraen células bucoepiteliales humanas para probar el efecto de un extracto de *Streblus asper* sobre la adhesión de *Candida albicans* a dichas células. Para este propósito se usó medio salino (NSS) para transportar las muestras, y los posteriores lavados para la obtención del pellet, también se llevaron a cabo en el mismo medio, conservando un buen número de células para el análisis que realizaron. En este punto, sería importante llevar a evaluar la viabilidad de las células, tomando en cuenta que se habla de poblaciones celulares procedentes de diferentes especies.

Otra opción que podría mejorar la recuperación de células bucoepiteliales, así como su viabilidad, corresponde a su colecta en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) tal y como proponen Hammad y colaboradores (2007). Estos autores buscaron analizar el efecto de un extracto acuoso de *Thymus vulgaris* sobre la adhesión de *S. mutans* a células bucoepiteliales humanas. Los lavados para la obtención del pellet de células bucales también se realizaron mediante la utilización de esta solución salina. En este caso, al igual que en el anterior, es muy importante el análisis de la viabilidad celular.

También es importante mencionar el hecho de que las células bucoepiteliales ovinas podrían ser colectadas y transportadas en medio RPMI más contenido antibiótico, para poder eliminar a las poblaciones bacterianas procedentes de la flora oral normal a este nivel. Como ya se expresó previamente en los resultados, las células ovinas colectadas ya cuentan con poblaciones bacterianas como es el caso de cocos. Una vez en el laboratorio, las muestras pueden ser lavadas con medio RPMI para poder realizar una mejor estandarización del protocolo y de esta manera, proseguir con el ensayo de adhesión de *M. haemolytica* A2 a este tipo celular en presencia de apo-LfB.

En otro de los resultados obtenidos en este trabajo, se pudo observar como apo-LfB disminuyó la adhesión de *M. haemolytica* A2 a monocitos y macrófagos ovinos de sangre periférica en una manera dosis dependiente. No se puede dejar de mencionar el hecho de que apo-LfB fue colocada al cultivo de monocitos y macrófagos ovinos de sangre periférica por una hora, y no a *M. haemolytica* A2 de manera directa, como ya se expresó. Dicha interacción se llevó a cabo por la capacidad de la proteína de unirse a receptores de superficie de estas células blancas. En este sentido, la inhibición de la adhesión bacteriana que se observó en este trabajo, podría deberse a que, al momento de la interacción entre la bacteria con los monocitos y los macrófagos, el cocobacilo ya no contaba con sitios para su unión, por estar los mismos ocupados con apo-LfB.

A pesar de esta variación en la metodología, los resultados de este trabajo se relacionan con los obtenidos por la investigación de Alugupalli y Kalfas (1995), en la que se evaluó el efecto inhibitorio de lactoferrina sobre la adhesión de *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia* a monocapas de fibroblastos y células HEp-2, KB y HeLa. En este trabajo, la glicoproteína se colocó al momento de realizar interacción entre la bacteria y las células objetivo. Se pudo evidenciar que apo-LfB y humana disminuyeron la adhesión de las dos especies bacterianas en una manera dosis dependiente en el rango de concentración de 0.5 a 2500 µg/ml.

La información derivada de los resultados de este trabajo requiere ser analizada con los resultados de la investigación de Clarke y Morton (2000), en donde los autores desarrollaron un ensayo fluorométrico in vitro para estudiar la adhesión de la hasta ese entonces llamada *Pasteurella haemolytica* (ahora *M. haemolytica*) a células bovinas. De esta manera, a diferencia de la estandarización llevada a cabo en este trabajo para los ensayos de adhesión, los autores mencionan que el inóculo óptimo para poder realizar el análisis fluorométrico fue de 1×10^8 UFC, y que el tiempo de incubación fue de 45 minutos, a diferencia de los 15 minutos del trabajo aquí expuesto.

Los autores utilizaron a la línea celular bovina de riñón Madin Darby (MDBK) y células del cornete nasal bovino. Además, utilizaron FITC para marcar a las bacterias. Como era de esperarse, los autores exponen que el serotipo A1 de *P. haemolytica* presentó un mayor porcentaje de adhesión a los dos tipos celulares, lo contrario que el serotipo A2. Esto refleja justamente como el serotipo A2, que es con el que se trabaja en esta investigación, está asociado con la manheimiosis en ovinos, por lo que es coherente su baja afinidad a unirse a células bovinas, aun hablando de una línea celular.

Son relevantes las conclusiones del trabajo de Nascimento de Araújo & Gimenes Giugliano (2001), en donde se evaluó el efecto de lactoferrina y el componente secretor libre de la leche humana (fSC). Dichos componentes inhibieron la adhesión de *E. coli* enteropatógena (EPEC) a células HeLa. Para este propósito, los autores fraccionaron las proteínas de la leche usando una metodología para purificar al fSC, lo que al mismo tiempo permitió el aislar a lactoferrina. Este estudio concluye que tanto fSC como lactoferrina inhibieron la adhesión de EPEC a células HeLa, lo que básicamente se relaciona con los resultados del presente trabajo, a pesar de que no se usó una línea celular y de haber colocado lactoferrina a los leucocitos y no al cultivo bacteriano.

Los resultados aquí presentados también guardan relación con la investigación de Ochoa y colaboradores (2006), en la que lactoferrina disminuyó la adhesión de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) a células HEP-2. Las concentraciones de lactoferrina donde se pudo observar una mayor inhibición de la adhesión fueron las de 1.0 y 0.1 mg/ml. Así, lactoferrina inhibió el crecimiento de EAEC y al mismo tiempo, disminuyó la adhesión de la bacteria. Como ya se había mencionado antes, los autores determinaron que esta inhibición en la adhesión de EAEC se da por la inducción de la liberación y degradación de fimbrias adherentes agregativas, lo cual sienta las bases para la realización de estudios

posteriores que permitan un mejor entendimiento de la inhibición en el proceso de adhesión de la bacteria.

Es fundamental evaluar los resultados obtenidos con respecto a los del trabajo de Berlutti y colaboradores (2004), en donde se analizó el papel de lactoferrina y la influencia del hierro en la agregación y la formación de biofilm en *S. mutans*. En esta investigación se pone en evidencia que a pesar de que la saliva por si misma es capaz de permitir la agregación de este patógeno causante de la caries dental, la capacidad de quelar hierro por parte de apo-LfB, también es responsable de este proceso.

De esta manera, la proteína en su forma libre de hierro es capaz de incrementar los agregados de la bacteria, así como la formación de biofilm flotante en fase fluida, al mantener bajos los niveles de hierro en la saliva. Estos fenómenos se dan previo a la adhesión del patógeno a superficies abióticas y por el aumento de la capa de biofilm adherente. Sin embargo, independiente a su capacidad de unir hierro, apo-LfB puede inhibir la adhesión, así como la formación de agregados y de biofilm en *S. mutans* libre, lo que se relaciona con los resultados derivados de este trabajo.

Hay que recalcar que el ensayo de adhesión a los diferentes tipos celulares ovinos podría realizarse colocando previamente distintas dosis de apo-LfB (sin incluir dosis letales) directamente a la bacteria. De esta manera, podría evaluarse de manera más integral el efecto que la glicoproteína podría tener sobre la adhesión bacteriana. Recordemos que Leitch & Willcox (1999), expresan que lactoferrina tiene una actividad antibacteriana debido a su efecto bacteriostático y su efecto bactericida. El efecto bacteriostático es dependiente de la capacidad de la proteína de unir hierro a su estructura, mientras que el efecto bactericida se da por la capacidad de lactoferrina de unirse directamente a los componentes de membrana de las bacterias. Así, esta evaluación, que no se realizó en este trabajo es clave para obtener una comprensión sistemática del fenómeno en cuestión y abre las puertas para futuras investigaciones.

Otro factor clave a considerar se relaciona con el hecho de que, durante el desarrollo de este trabajo, se congeló a apo-LfB para su almacenamiento una vez preparada y cuantificada. Probablemente este hecho guarde relación con la contradicción de la cuantificación de la adhesión bacteriana entre el control y el tratamiento de 4 μ M de apo-LfB. Hay que recordar que tanto para monocitos, así como para macrófagos, el tratamiento de 4 μ M de apo-LfB fue ligeramente mayor que el grupo control. En esta

línea, se recomienda seguir lo establecido por Ramírez-Rico y colaboradores (2021), en cuyo trabajo se recomienda almacenar a apo-LfB en refrigeración (aproximadamente 4 °C).

Este hecho también podría relacionarse con los resultados contradictorios obtenidos en el segundo experimento independiente del ensayo de adhesión a monocitos ovinos (datos no presentados). Así, para este experimento se utilizó apo-LfB que ya había sufrido varios procesos de congelación y exposición a temperatura ambiente. Los resultados evidenciaron que no existió ninguna diferencia entre el promedio de adhesión de *M. haemolytica* A2 en ninguno de los tratamientos, incluido el grupo control.

Continuando con lo expuesto, Wang y colaboradores (2016), mencionan el rol que juega la temperatura en la desnaturalización de la glicoproteína, siendo apo-Lf más sensible a estos cambios y sufriendo desnaturalización a menor temperatura que holo-Lf, que por su estructura más compacta es un poco más resistente a estos cambios. Así, lo más recomendable es trabajar con apo-LfB almacenada solamente en refrigeración, sin ser sometida a cambios bruscos de temperatura, y que sea de reciente preparación.

Con la finalidad de evitar posibles errores durante la realización del ensayo de adhesión, es importante que se cuente con material disponible previo a la realización de los ensayos. Así, por ejemplo, se debe priorizar la disponibilidad de placas Lab-Tek para usarlas dejando espacios entre los pozos en donde se colocan los tratamientos con la finalidad de evitar cualquier tipo de contaminación entre los mismos. Ante la posible falta de material, estos ensayos pueden realizarse utilizando placas de cultivo como lo realizan Kisiela & Czuprynski (2009) en su trabajo donde para la identificación y caracterización de las adhesinas de *M. haemolytica* A1, llevan a cabo ensayos de adhesión de la bacteria a células epiteliales bronquiales bovinas.

El trabajo aquí presentado, constituyó una estandarización, tanto en la obtención de células bucoepiteliales ovinas, así como en los ensayos de adhesión a los distintos grupos celulares de ovino. En este sentido, los resultados de esta investigación reflejan una serie de fortalezas e inconvenientes propios de cualquier trabajo en el que se pretenda estandarizar una determinada metodología, que evidentemente no había sido efectuada previamente en nuestro laboratorio. Sin duda, estos resultados permiten una primera visión para comprender de mejor manera a los mecanismos que confluyen en el proceso

de obtención de células, así como de la adhesión de *M. haemolytica* A2 a distintos tipos celulares.

Este trabajo es un eje fundamental para poder más adelante, efectuar no sólo una estandarización holística del proceso, sino para evaluar cómo apo-LfB influye en la adhesión de este serotipo, poco estudiado, a todas las células ovinas involucradas en la patogenia de la manheimiosis, con el fin de brindar una mejor calidad de vida a estos animales, y de ofrecer alternativas que fortalezcan al sector ganadero en su combate contra esta enfermedad.

CONCLUSIONES

- Apo-LfB disminuyó la adhesión de *M. haemolytica* A2 a monocitos ovinos de sangre periférica en una manera dosis dependiente.
- Apo-LfB disminuyó la adhesión de *M. haemolytica* A2 a macrófagos ovinos de sangre periférica en una manera dosis dependiente.
- Las dosis de 20 μ M, 30 μ M y 50 μ M de apo-LfB muestran la inhibición más marcada de la adhesión bacteriana, tanto a monocitos, así como macrófagos ovinos de sangre periférica.
- La viabilidad de *M. haemolytica* A2 no se ve afectada a los 15 minutos de haber iniciado con la cuenta viable. Sin embargo, después de una hora se empieza a evidenciar la muerte de los cultivos bacterianos.
- Las condiciones de almacenamiento y traslado de células bucoepiteliales ovinas, después de su toma, debe ser modificada con otro medio como RPMI o Tris-HCl más contenido antibiótico, para poder obtener pellet adecuado de estas células que permita desarrollar el ensayo de adhesión con la glicoproteína.
- Las condiciones de manejo y almacenamiento de apo-LfB son fundamentales a la hora de evitar la desnaturalización de la proteína, para poder evaluar de manera correcta el efecto que tiene sobre la adhesión de *M. haemolytica* A2 a diferentes tipos de células, así como para analizar otros factores de virulencia de este microorganismo.

PERSPECTIVAS

- Culminar con la estandarización de la metodología de obtención, transporte y traslado de células bucoepiteliales ovinas, mediante el cambio de medio en el que se colectan las células para poder obtener un pellet representativo de las mismas.
- Estudiar el efecto de apo-LfB sobre la adhesión de *M. haemolytica* A2 a macrófagos alveolares ovinos.
- Analizar el efecto de apo-LfB sobre la adhesión de *M. haemolytica* A2 a células bronquiales ovinas, así como a células del epitelio alveolar en estos animales.
- Determinar el efecto de holo-LfB sobre la adhesión de *M. haemolytica* A2 a distintos tipos celulares ovinos, para evaluar la diferencia entre el efecto de la glicoproteína saturada con hierro, y su forma libre de hierro.
- Identificar las adhesinas de *M. haemolytica* A2 para poder caracterizar de mejor manera el proceso de adhesión de la bacteria a los diferentes tipos celulares ovinos.
- Analizar los mecanismos celulares y moleculares que subyacen al proceso de adhesión de *M. haemolytica* A2 a diferentes tipos celulares ovinos.

LITERATURA CITADA

- Alugupalli, K., & Kalfas, S. (1995). Inhibitory effect of lactoferrin on the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Prevotella intermedia* to fibroblasts and epithelial cells. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 103(2):154-60.
- Auli, N., Hellenbrand, K., & Czuprynski, C. (2012). *Mannheimia haemolytica* and its leukotoxin cause macrophage extracellular trap formation by bovine macrophages. *Infection and Immunity*, 80(5):1923-33. <https://doi:10.1128/IAI.06120-11>.
- Avalos-Gómez, C., Reyes-López, M., Ramírez-Rico, G., Díaz-Aparicio, E., Zenteno, E., González-Ruiz, C., & De la Garza, M. (2020). Effect of apo-lactoferrin on leukotoxin and outer membrane vesicles of *Mannheimia haemolytica* A2. *Veterinary Research*, 51, 36. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00759-z>.
- Baker, E., & Baker, H. (2005). Molecular structure; Binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22):2531-9. <https://doi:10.1007/s00018-005-5368-9>.
- Berlutti, F., Ajello, M., Bosso, P., Morea, C., Petrucca, A., Antonini, G., & Valenti, P. (2004). Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Biometals*, 17(3):271-8. <https://doi:10.1023/b:biom.0000027704.53859.d3>.
- Boyce J., Lo, R., Wilkie, I., & Adler, B. (2004). *Pasteurella* and *Mannheimia*. En: Giles C., Prescott J., Songer J., Thoen C. (Ed). *Pathogenesis of Bacterial Infectious in Animals*. (3–294). Blackwell Publishing.
- Chang Y., Young, R., Post, D., & Struck, D. (1987). Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infection and Immunity*, 55:2348–2354.
- Clarke, J., & Morton, R. (2000). Development of an in vitro fluorometric assay to study adherence of *Pasteurella haemolytica* to bovine cells. *American Journal of Veterinary Research*, 61(2):129-32. doi: 10.2460/ajvr.2000.61.129.

- Davies, R., & Donachie, W. (1996). Intra-specific diversity and host specificity within *Pasteurella haemolytica* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins. *Microbiology (Reading)*, *142*(7):1895-907.
- De Araújo, A., & Giugliano, L. (2001). Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *BMC Microbiology*, *1*:25. [https://doi: 10.1186/1471-2180-1-25](https://doi.org/10.1186/1471-2180-1-25).
- Gao, C., Dong, H., Tai, L., & Gao X. (2018). Lactoferrin-Containing Immunocomplexes Drive the Conversion of Human Macrophages from M2- into M1-like Phenotype. *Frontiers in Immunology*, *23*;9:37. [https://doi: 10.3389/fimmu.2018.00037](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00037).
- González-Sánchez, M., Bartolome, F., Antequera, D., Puertas-Martín, V., González, P., Gómez-Grande, A., Llamas-Velasco, S., Herrero-San Martín A., Pérez-Martínez, D., Villarejo-Galende, A., Atienza, M., Palomar-Bonet, M., Cantero, J., Perry G., Orive, G., Ibañez, B., Bueno, H., Fuster, V., & Carro, E. (2020). Decreased salivary lactoferrin levels are specific to Alzheimer's disease. *eBioMedicine*, *57*, 102834. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102834>.
- Gruden, Š., & Poklar, N. (2021). Diverse Mechanisms of Antimicrobial Activities of Lactoferrins, Lactoferricins, and Other Lactoferrin-Derived Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(20):11264. [https://doi: 10.3390/ijms222011264](https://doi.org/10.3390/ijms222011264).
- Hammad, M., Sallal, A., & Darmani, H. (2007). Inhibition of *Streptococcus mutans* adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Dental Hygiene*, *5*(4):232-5. [https://doi: doi: 10.1111/j.1601-5037.2007.00266.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2007.00266.x).
- Hamer-Barrera, R., Godínez, D., Enríquez, V., Vaca-Pacheco, S., Martínez-Zúñiga, R., Talamás-Rohana, P., Suárez-Güemez, F., & De la Garza, M. (2004). Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, *68*(1):33-41.

- Hussain, R., Mahmood, F., Ali, H., & Siddique, A. (2017). Bacterial, PCR and clinico-pathological diagnosis of naturally occurring pneumonic pasteurellosis (mannheimiosis) during subtropical climate in sheep. *Microbial Pathogenesis*, *112*:176-181. doi: 10.1016/j.micpath.2017.09.061.
- Jaramillo, C., Trigo, F., & Suárez, F. (2009). Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *Veterinaria México*, *40*(3), 293-314.
- Jeyaseelan, S., Sreevatsan, S., & Maheswaran, S. (2002). Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Animal Health Research Reviews* *3*(2); 69–82. [https://doi: 10.1079/ahrr200242](https://doi.org/10.1079/ahrr200242).
- Juscamayta, E., Maturrano, H., & Rosadio, A. (2017). Análisis Genómico de *Mannheimia haemolytica* Serotipo A2 para la Identificación de Potenciales Candidatos Vacunales contra la Neumonía en Alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *28*(2), 397-410. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13075>
- Kisiela D., & Czuprynski C. (2009). Identification of *Mannheimia haemolytica* adhesins involved in binding to bovine bronchial epithelial cells. *Infection and Immunity*. *77*(1):446-55. [https://doi: 10.1128/IAI.00312-08](https://doi.org/10.1128/IAI.00312-08).
- Legrand, D., Pierce, A., Ellass, E., Carpentier, M., Mariller, C., & Mazurier, J. (2008). Lactoferrin Structure and Functions. En: Crusio, W., Dong, H., Radeke, H., Rezaei, N., Steinlein, O., & Xiao J. (Ed). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. (163-194). Springer.
- Leitch, E., & Willcox A. (1999). Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. *Journal of Medical Microbiology*, *8*, 867-871. <https://doi.org/10.1099/00222615-48-9-867>.

- Lo, R. (2001). Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Veterinary Microbiology*, 22;83(1):23-35. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00374-1.
- Ochoa, T., Brown, E., Guion, C., Chen, J., McMahon, R., & Cleary, T. (2006). Effect of lactoferrin on enteroaggregative E. coli (EAEC). *Biochemistry and Cell Biology*, 84(3):369-76. doi: 10.1139/o06-053.
- Ramírez-Rico, G., Martínez-Castillo, M., Avalos-Gómez, C., & De la Garza, M. (2021). Bovine apo-lactoferrin affects the secretion of proteases in *Mannheimia haemolytica* A2. *Access Microbiology*, 25;3(10):000269. [https://doi: 10.1099/acmi.0.000269](https://doi.org/10.1099/acmi.0.000269). PMID: 34816089.
- Ruiz-Mazón, L. (2021). Efecto de lactoferrina bovina sobre los mecanismos de patogenicidad de *Mannheimia haemolytica* A2: adhesión y formación de biofilm. Estudio in silico. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en la especialidad de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Repositorio CINVESTAV.
- Sreevatsan, S., Ames, T., Werdin, R., Yoo, H., & Maheswaran, S. (1996). Evaluation of three experimental subunit vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle. *Vaccine*, 14: 147–155. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)00138-Q](https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)00138-Q)
- Superti, F. (2020). Lactoferrin from Bovine Milk: A Protective Companion for Life. *Nutrients*, 12, 2562. [https://doi:10.3390/nu12092562](https://doi.org/10.3390/nu12092562).
- Taweechaisupapong, S., Choopan, T., Singhara, S., Chatrchaiwiwatana, S., Wongkham, S. (2005). In vitro inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 4;96(1-2):221-6. [https://doi: 10.1016/j.jep.2004.09.010](https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.010).
- Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., & Kawase, K. (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine

lactoferrin. *Journal of Dairy Science*, 74, 4137–4142. [https://doi:10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78608-6](https://doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78608-6).

- Wang, B., Timilsena, Y., Blanch, E., & Adhikari, B. (2016). Drying and denaturation characteristics of three forms of bovine lactoferrin. *Drying Technology*, 35(5), 606–615. doi:10.1080/07373937.2016.1196699
- Zecchinon, L., Fett, T., & Desmecht, D. (2005) How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Veterinary Research*, 36:133–156. <https://doi:10.1051/vetres:2004065>.