



CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

TESIS

“Mecanismo de internalización de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo”

PRESENTA

Berenice Minerva Plasencia Muñoz

PARA OBTENER GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORA

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Francisco Javier Avelar González
Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya

Aguascalientes, Ags, a 12 de noviembre de 2020



M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como Miembros del Comité Tutoral designados de la estudiante Berenice Minerva Plasencia Muñoz con ID 149941 quien realizó la tesis titulada: **"Mecanismo de internalización de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo"**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el VOTO APROBATORIO, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado, en cuanto los artículos enviados a publicación a revistas indexadas JCR sean aceptados.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 2 de noviembre de 2020.

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera
Tutora de Tesis

Dr. Francisco Javier Avelar González
Asesor de Tesis

Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya
Asesora de Tesis

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-PO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SI
Actualización
Emisión:



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

**DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN
DE GRADO**



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 17-AGOSTO--20

NOMBRE: BERENICE MINERVA PLASENCIA MUÑOZ **ID** 149941

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS **LGAC (del posgrado):** Toxicología y bioingeniería ambiental

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo práctico

TITULO: "Mecanismo de internalización de Actinobacillus pleuropneumoniae en células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo"

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

El trabajo contribuye al conocimiento de los mecanismos de acción que tienen patógenos respiratorios sobre el endotelio arterial, los cuales pueden emplearse para solucionar problemas similares en patógenos humanos como el coronavirus

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- NA Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- SI Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí SI
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDÉE MARTÍNEZ RUALCABA

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.



Actinobacillus pleuropneumoniae Interaction With Swine Endothelial Cells

Berenice Plasencia-Muñoz¹, Francisco J. Avelar-González², Mireya De la Garza³, Mario Jacques⁴, Adriana Moreno-Flores¹ and Alma L. Guerrero-Barrera^{1*}

¹ Laboratorio de Biología Celular y Tissular, Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, ² Laboratorio de Estudios Ambientales, Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, ³ Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México, Mexico, ⁴ Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses en Production Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

OPEN ACCESS

Edited by:

Maureen T. Long,
University of Florida, United States

Reviewed by:

Adina R. Bujold,
University of Alberta, Canada
Janet MacInnes,
University of Guelph, Canada

*Correspondence:

Alma L. Guerrero-Barrera
alguerre@correo.uaa.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Veterinary Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 03 June 2020

Accepted: 28 September 2020

Published: 29 October 2020

Citation:

Plasencia-Muñoz B, Avelar-González FJ, De la Garza M, Jacques M, Moreno-Flores A and Guerrero-Barrera AL (2020) Actinobacillus pleuropneumoniae Interaction With Swine Endothelial Cells. *Front. Vet. Sci.* 7:569370. doi: 10.3389/fvets.2020.569370

Actinobacillus pleuropneumoniae is a swine (host) specific respiratory pathogen and the etiological agent of swine pleuropneumonia which affects pigs of all ages, many being asymptomatic carriers. This pathogen has high morbidity and mortality rates which generates large economic losses for the pig industry. *Actinobacillus pleuropneumoniae* is a widely studied bacterium, however its pathogenesis is not yet fully understood. The prevalence of the 18 serotypes of *A. pleuropneumoniae* varies by geographic region, in North American area, more specifically in Mexico, serotypes 1, 3, 5b, and 7 show higher prevalence. *Actinobacillus pleuropneumoniae* is described as a strict extracellular pathogen with tropism for lower respiratory tract. However, this study depicts the ability of these serotypes to adhere to non-phagocytic cells, using an endothelial cell model, as well as their ability to internalize them, proposing it could be considered as an intracellular pathogen.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, cytoskeleton, bacterial cell adhesion, bacterial cell internalization, endothelial cell

INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) is a respiratory pathogen member of the family Pasteurellaceae and etiological agent of swine pleuropneumonia (1, 2). Depending on its nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) requirements, it is classified into two biotypes, biotype 1 groups NAD-dependent strains, biotype 2 groups NAD-independent strains. Currently 18 different serotypes are recognized. The biotypes and serotypes of *A. pleuropneumoniae* have genetic, structural, and virulence differences. Serotyping is mainly based on capsular antigens. The presence and prevalence of serotypes varies between countries. In North America serotypes 1 and 5 historically are the most commonly isolated. In recent findings most prevalent App serotypes in Canada were 5 and 7 with a notable reduction of serotype 1 incidence due to serological control of breeders. While in Mexico serotype 1 still has a high prevalence alongside serotypes 3, 5, and 7 (3–8).

Swine pleuropneumonia caused by App and is a major problem for swine production. It has a significant impact on animal welfare and economic production, due to high morbidity and mortality rates, the reduction of average daily weight gain and feed conversion rates, loss

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a mis padres y hermanas por siempre brindarme su apoyo y amor incondicional y siempre estar allí para mí.

A la Dra. Alma Guerrero que me dio la oportunidad de desarrollar este proyecto siempre contando con su guía y consejos para poder llevar el programa junto a mis asesores el Dr. Javier Avelar González y la Dra. Mireya de la Garza por sus enseñanzas y darme la facilidad de realizar parte del trabajo experimental en sus laboratorios.

A la Dra. Virginia Aragón por darme la oportunidad de realizar una estancia con ella, siempre apoyándome y brindando su ayuda y conocimientos cuando los necesité.

A mis compañeros de laboratorio que fueron de mucha ayuda al momento de realizar algunos experimentos y hacer todo este proceso más divertido.

A los amigos que me acompañaron durante este proceso.

Al financiamiento otorgado por CONACYT mediante los programas de beca de manutención de posgrados nacionales y beca de movilidad 757981/602733.

DEDICATORIA

A mis padres María Guadalupe Muñoz Moreno y Germán Gonzalo Plasencia Salcido.



ÍNDICE GENERAL

Contenido

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1. Generalidades de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> | 1 |
| 2. Pleuroneumonía Porcina | 3 |
| 3. Pleuroneumonía en Granjas Porcícolas de Aguascalientes | 4 |
| 4. Interacción huésped-patógeno..... | 5 |
| 5. Adhesión bacteriana..... | 7 |
| 6. Internalización bacteriana..... | 9 |
| 7. El endotelio y las células endoteliales..... | 12 |
| 7.1 Endotelio y el sistema respiratorio..... | 14 |
| HIPÓTESIS..... | 16 |
| JUSTIFICACIÓN | 17 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 19 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 19 |
| METODOLOGÍA | 20 |
| 1. Cultivo de células endoteliales de aorta de cerdo..... | 20 |
| 2. Cepas de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> | 20 |
| 3. Infección de Células Endoteliales con <i>A. pleuropneumoniae</i> | 21 |
| 3.1 Ensayo de Adhesión de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> | 21 |
| 3.2 Ensayo de Internalización de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> | 22 |
| 4. Obtención de Anticuerpo Anti App..... | 22 |
| 5. Inmunomarcaje y Microscopía Confocal | 23 |
| 5.1 Citoesqueleto de Actina | 24 |
| 5.2 Citoesqueleto de Tubulina..... | 25 |
| 5.3 Retículo Endoplásmico | 25 |
| 5.4 Aparato de Golgi..... | 25 |
| 5.5 Medición de Longitud de Núcleos..... | 26 |
| 6. Evaluación de Presencia de Vacuolas por Marcaje de Organelos Acídicos | 26 |
| 7. Análisis de Expresión de Serin Proteasa por <i>A. pleuropneumoniae</i> | 26 |
| 8. Análisis Estadístico..... | 27 |
| RESULTADOS..... | 28 |

| | |
|--|----|
| 1. Adhesión Bacteriana..... | 28 |
| 2. Internalización Bacteriana y Marcajes por Inmunofluorescencia | 29 |
| 3. Evaluación de Presencia de Vacuolas por Marcaje de Organelos Ácidos | 33 |
| 4. Análisis de Expresión de Serina Proteasa por <i>A. pleuropneumoniae</i> | 34 |
| DISCUSIÓN..... | 35 |
| CONCLUSIÓN..... | 44 |
| PROYECCIONES A FUTURO | 45 |
| REFERENCIAS..... | 46 |
| ANEXO I | 60 |
| Portada Artículo Publicado | 60 |
| ANEXO II | 61 |
| Artículo en Proceso de Revisión por Revista Académica | 61 |
| Confirmación recepción de artículo | 61 |
| Proceso revisión por pares..... | 61 |
| Manuscrito | 62 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Adhesión de *A. pleuropneumoniae* S4074, JL03, L20 y AP76 a las células endoteliales de aorta de cerdo observadas a 0.5, 1 y 2 h de incubación. Se muestra una mayor adhesión por parte de la cepa 4074 y menor para las cepas L20 y AP76; no obstante, la diferencia no es significativa. Las barras muestran el error estándar..... 28

Figura 2. Implicación del citoesqueleto de actina en la internalización de *A. pleuropneumoniae* en células endoteliales de aorta de cerdo después de 3 h de incubación. (A) Citoesqueleto de actina de células endoteliales porcinas teñidas de verde con Faloidina Alexa Fluor 488; (B-E) *A. pleuropneumoniae* internalizado en células endoteliales porcinas, marcado con anticuerpo policlonal primario y anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (rojo); (F) citoesqueleto de actina incubado con CD; (G-J) *A. pleuropneumoniae* internalizada y alojada en el área perinuclear de células endoteliales porcinas tratadas con CD..... 30

Figura 3. Implicación del citoesqueleto de tubulina en la internalización de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales de aorta de cerdo después de 3 h de incubación. (A) Citoesqueleto de tubulina de células endoteliales porcinas teñidas de verde con anticuerpo monoclonal primario y anticuerpo monoclonal secundario Alexa Fluor 488; (B-E) *A. pleuropneumoniae* internalizado en células endoteliales porcinas marcadas con anticuerpo policlonal primario y anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (rojo); (F) citoesqueleto de tubulina tratado con colchicina; (G-J) *A. pleuropneumoniae* mantiene la capacidad de internalizarse en las células endoteliales tratadas con colchicina. Núcleos contrastados con Hoechst 33258..... 31

Figura 4. Efecto de internalización de *A. pleuropneumoniae* en el retículo endoplásmico. (A) Distribución normal del retículo endoplásmico teñido con el kit de marcaje de retículo endoplásmico Alexa Fluor 488 SelectFX (verde); (B-E) *A. pleuropneumoniae* (roja) internalizada en células endoteliales. Se observa la co-localización de *A. pleuropneumoniae* y RE sin embargo, no se muestran cambios importantes en la distribución de ER. 32

Figura 5. Efecto de internalización de *A. pleuropneumoniae* en el aparato de Golgi. (A) Distribución normal del aparato de Golgi (rojo) en células endoteliales porcinas, (B-E) La distribución del aparato de Golgi se altera después de la entrada de *A. pleuropneumoniae*, migrando a una posición perinuclear. 32

Figura 6. Formación de organelos ácidos después del ensayo de internalización. (A) Células endoteliales sin bacteria, (B) Células endoteliales + *E. coli* Bl21 pUCmT :: Vat, (C) Células endoteliales + *A. pleuropneumoniae* 4074, (D) Células endoteliales + *A. pleuropneumoniae* JL03, (E) Células endoteliales + *A. pleuropneumoniae* L20, (F) Células endoteliales + *A. pleuropneumoniae* AP76. Las células endoteliales interactuaron con cada cepa bacteriana durante 3 h seguido de marcaje durante 30 min con LysoTracker Deep Red [75 nM]. Se observa un aumento notable de organelos ácidos cuando interactúan con *E. coli* y con *A. pleuropneumoniae* JL03 y L20, pero no

hay diferencias notables entre el control negativo y las células que interactúan con *A. pleuropneumoniae* 4074 y AP76. 33

Figura 7. Reconocimiento de proteínas totales de *A. pleuropneumoniae* con anticuerpo anti toxina vacuolizante Vat (100 kDa). (1) Marcador de peso molecular, (2) Proteínas totales de *E. coli* BI21 vector vacío (control negativo), (3) Proteínas totales de *E. coli* BI21 pUCmT:: Vat (control positivo), (4) Proteínas totales *A. pleuropneumoniae* 4074, (5) Proteínas totales *A. pleuropneumoniae* JL03, (6) Proteínas totales *A. pleuropneumoniae* L20 , (7) Proteínas totales *A. pleuropneumoniae* AP76. Todas las muestras de la *A. pleuropneumoniae* muestran una banda a 100 kDa, una entre 52 y 37 kDa y otra entre 37 y 25 kDa. El control positivo muestra las mismas bandas que *A. pleuropneumoniae*, mientras que el control negativo solo tiene una banda a 37 kDa. 34



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de internalización de *A. pleuropneumoniae* S4074, JL03, L20 y AP76 a células endoteliales de aorta de cerdo (MOI 10: 1) a 3 h. 29



RESUMEN

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) es un patógeno del sistema respiratorio porcino y agente etiológico de la pleuroneumonía porcina, la cual es caracterizada como una pleuroneumonía exudativa, fibrinosa, hemorrágica y necrosante y es considerada una de las principales causas de pérdida económica de la industria porcina debido a los altos índices de mortalidad, reducción de ganancia media diaria de peso, gastos médicos, pérdidas por sacrificio y gastos por intervención.

En México, *A. pleuropneumoniae* se encuentra altamente diseminada, siendo los serotipos 1, 3, 5 y 7 los más prevalentes y la enfermedad que produce afecta del 60 al 80% de las granjas porcícolas del estado de Aguascalientes.

Los factores de virulencia son los que le permiten a un patógeno colonizar, invadir, evadir y sobrevivir a la respuesta inmune del organismo huésped. Como parte de ello algunas bacterias poseen la capacidad de adherirse a la superficie de la célula hospedera e internalizar en la misma. Los factores de virulencia de *A. pleuropneumoniae* actualmente no son comprendidos en su totalidad; no obstante, se conoce que posee la capacidad de adhesión. En este trabajo se analiza la capacidad que poseen los serotipos 1, 3, 5b y 7 de App de internalizar en células endoteliales, sin necesitar del citoesqueleto de actina o el de tubulina para lograrlo.

Estos resultados sirven como base para conocer los mecanismos de infección de la bacteria y para comprender mejor sus factores de virulencia, que una vez sean descritos propiamente, servirán para elaborar un tratamiento específico para la enfermedad y llegar a su futura erradicación.

ABSTRACT

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) is a respiratory system pathogen and etiological agent of porcine pleuropneumonia which is characterized as an exudative, fibrinous, hemorrhagic and necrotizing pleuropneumonia and is considered one of the main causes of economic loss of the swine industry due to the high mortality rates, reduction of average daily weight gain, medical expenses, sacrificial losses and intervention expenses.

In Mexico, *A. pleuropneumoniae* is highly disseminated, with serotypes 1, 3, 5 and 7 being the most prevalent and the disease that it produces affects 60 to 80% of the pig farms in the state of Aguascalientes.

The virulence factors are those that allow a pathogen to colonize, invade, evade and survival to the host organism's immune response. Due to them some bacteria have the capacity to adhere to the surface of the host cell and internalize. The virulence factors of *A. pleuropneumoniae* are not currently fully understood; however, it is known that App can adhere to host's cell membrane. This work shows App's serotypes 1, 3, 5b and 7 ability to internalize in endothelial cells, without needing the actin or tubulin cytoskeleton to achieve it.

These results serve as a basis to know the mechanisms of infection of the bacteria and to better understand their virulence factors, which once properly described, will serve to develop a specific treatment for the disease and reach its future eradication.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Actinobacillus pleuropneumoniae es un patógeno respiratorio miembro de la familia Pasteurellaceae y agente etiológico de la pleuroneumonía porcina (Hathroubi *et al.*, 2016; Hsu *et al.*, 2016)

Es un cocobacilo Gram negativo, pleomórfico, anaerobio facultativo, que no forma esporas y es encapsulado. Bioquímicamente es ureasa positivo, capaz de fermentar manitol, xilosa, ribosa y fermentación variable de lactosa. En función a sus requerimientos de Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) se clasifica en dos biotipos, el biotipo 1 agrupa las cepas dependientes de NAD, el biotipo 2 agrupa las cepas NAD independientes. En la actualidad 16 distintos serotipos son reconocidos, la especificidad del serotipo es predominantemente debido a las diferencias estructurales de los polisacáridos capsulares (Auger *et al.*, 2009; Enriquez-Verdugo *et al.*, 2004).

Los biotipos y serotipos de *A. pleuropneumoniae* poseen diferencias tanto genéticas, estructurales, principalmente polisacáridos capsulares y lipopolisacáridos celulares y características estructurales menores como la O-acetilación, la glucosa o los cambios de glucosilo anomérico (Perry *et al.*, 1990), y de virulencia; la serotipificación se basa principalmente en los antígenos capsulares. Frey (2008) señala que el grado de virulencia de *A. pleuropneumoniae* es debido a la presencia de una o dos toxinas RTX formadoras de poros: ApXI, ApXII y ApXIII. Que tienen propiedades hemolíticas y citotóxicas y son secretadas por los diferentes serotipos en diversas combinaciones. ApXI se expresa por los serotipos 1, 5, 9, 10, 11 y 14; ApXII es producido por todos los serotipos excepto el 10 y el 14; y ApXIII está presente en los serotipos 2, 4, 6, 8 y 15 (Dreyfus *et al.*, 2014). Las toxinas ApXIV se encuentran en un gran número de bacterias, sin embargo, la toxina ApXIV ha mostrado ser específica para *A. pleuropneumoniae* pues no se ha encontrado en ninguna otra especie de *Actinobacillus*, por lo que se utiliza mucho en el diagnóstico para la

identificación de especies (Sassu et al., 2017a; Dreyfus et al., 2014; Frey, 2008; Jessing et al., 2003; Frey, 1995).

La presencia y prevalencia de serotipos varía entre los países. En Norte América los serotipos 1 y 5 son los más comúnmente aislados, mientras que los serotipos 2 y 9 son aislados en varios países europeos. En Dinamarca los serotipos 2 (63%), 5 (5%) y 6 (26%) representan aproximadamente el 94% de las cepas aisladas de cerdo con la enfermedad clínica. En México los serotipos más prevalentes son el 1, 3, 5 y 7. Estudios de virulencia indican diferencias considerables en la virulencia entre serotipos dependientes de la presencia combinatoria de las cuatro distintas toxinas Apx (Álvarez-Fleites et al., 2004; Jessing, Angen, & Inzana, 2003; Williams et al., 2000).

El aislamiento inicial de *A. pleuropneumoniae* se realiza en atmósfera de CO₂ del 5-7%. Esta bacteria es positiva a la reacción de CAMP (Prueba de Christie Atkins-Munch-Petersen), que consiste en una reacción de complementación entre una cohemolisina de *A. pleuropneumoniae* con una esfingomielisina de *Staphylococcus aureus*. En medio artificial ocurre la transformación morfológica de colonia rugosa a lisa. Las colonias en placas de agar sangre exhiben hemólisis y han sido identificadas fimbrias por tinción negativa. Las fimbrias son mediadores comunes de adhesión a las células epiteliales de la mucosa del huésped y la expresión de fimbrias en *A. pleuropneumoniae* se pierde rápidamente tras subcultivo. Las fimbrias son, de hecho, conocidas por jugar un papel importante en la patogénesis de las bacterias Gram negativas y están involucradas en la adherencia y la colonización, motilidad, la formación de biopelículas, la exportación de proteínas y la captación de ADN (Sadilkova, Nepereny, Vrzal, Sebo, & Osicka, 2012; Enriquez-Verdugo et al., 2004; Fenwick & Henry, 1994).

2. Pleuroneumonía Porcina

La pleuroneumonía porcina causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* es una importante enfermedad para la producción porcina. Tiene un impacto significativo en el bienestar animal y en la producción económica. Esta enfermedad es caracterizada como una pleuroneumonía exudativa, fibrinosa, hemorrágica y necrosante. Las consecuencias de esta infección pueden ir desde una neumonía fibrinosa aguda y pleuritis con alta mortalidad hasta la infección subclínica (Hsu *et al.*, 2016; Fittipaldi *et al.*, 2005).

Las consecuencias económicas de la pleuroneumonía porcina pueden agravarse debido principalmente a la muerte, a la reducción de ganancia media diaria de peso e índices de conversión alimenticia, pérdidas por sacrificio y los costos de intervención. Cerdos de todas las edades pueden ser afectados, pero en los de 3 a 4 meses de edad se encuentra con mayor frecuencia esta infección. De acuerdo con el curso clínico de la pleuroneumonía porcina, ésta puede ser hiper-aguda y aguda, que se caracteriza por disnea, tos, apatía, anorexia y/o muerte súbita; o subaguda y crónica, caracterizada por tos intermitente y la disminución de los parámetros de crecimiento (Paradis *et al.*, 2004).

Los signos de la pleuroneumonía porcina son depresión, pérdida de apetito, fiebre, dificultad para respirar y tos. Después del deceso del animal es común observar descargas de sangre de la cavidad nasal debido al extenso daño en el tejido pulmonar (Hathroubi *et al.*, 2016)

A. pleuropneumoniae puede ser transmitida entre piaras a través de diversos vectores, incluidos los animales infectados, aerosoles contaminados y fomites (Fittipaldi *et al.*, 2005).

Las terapias basadas en antibióticos y vacunación ayudan a reducir la severidad de los signos y disminuir los índices de mortalidad; sin embargo, no son efectivas en eliminar a las bacterias; inclusive los cerdos que sobreviven a la fase aguda pueden llegar a la infección subclínica y ser portadores persistentes, albergando *A. pleuropneumoniae* en las

amígdalas y sufrir de lesiones de pulmón crónicas. Además, *A. pleuropneumoniae* tiene la capacidad de formar biopelículas (biofilms) que protegen a las células bacterianas al disminuir su susceptibilidad a bactericidas y al sistema inmune del huésped; además de que se han identificado en ella genes y plásmidos de resistencia (Sassu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2016).

Aunque el tratamiento preventivo con antibióticos y la vacunación pueden ser útiles en el control de la enfermedad, se ha sugerido que la erradicación del microorganismo podría ser el mejor curso de acción para eliminar la pleuroneumonía porcina. La despoblación total y repoblación con animales libres de *A. pleuropneumoniae* se considera el procedimiento más eficaz para la erradicación (Fittipaldi *et al.*, 2005).

A. pleuropneumoniae es capaz de establecer coinfecciones con otros patógenos del sistema respiratorio porcino. Las coinfecciones son más frecuentes en las granjas porcícolas de lo que se reporta y es conocido que la infección primaria de un patógeno puede aumentar el potencial infeccioso del segundo patógeno. La patogénesis de la pleuroneumonía porcina es compleja e involucra diferentes factores de virulencia de la bacteria (Ferreira *et al.*, 2015; Chiers *et al.*, 2010)

3. Pleuroneumonía en Granjas Porcícolas de Aguascalientes

En estudios realizados previamente donde se tomaron muestras de la cavidad nasal de un total de 212 cerdos de catorce distintas granjas en el estado de Aguascalientes, México, se detectó que cerca del 20% de las muestras mostraron presencia de *A. pleuropneumoniae* y que del 60 al 80% de las granjas estudiadas se encontraban afectadas por este patógeno. Esto comprobó que los patógenos del complejo respiratorio porcino están ampliamente diseminados en granjas de cerdos en Aguascalientes. Además, una gran parte de las muestras analizadas resultaron positivas a la presencia de más de un patógeno, siendo una de las combinaciones más comunes la de *A. pleuropneumoniae* con *Haemophilus*

parasuis, lo que agrava la situación. Además, se demostró la presencia de *A. pleuropneumoniae* viable formando biopelículas en muestras de agua de consumo de los cerdos; estas muestras fueron tomadas al azar de las granjas anteriormente mencionadas. La supervivencia de *A. pleuropneumoniae* mediante la formación de biopelículas en aguas de consumo de los animales, sugiere la posibilidad de otros medios de infección en adición a los ya descritos, aerosoles y contacto directo, así como la probabilidad de que el agua sirva como reservorio del patógeno. La detección de *A. pleuropneumoniae* con otros patógenos del complejo respiratorio porcino, así como su detección como biopelícula en agua, indica la capacidad de este patógeno para producir biopelículas multiespecie en condiciones ambientales, lo cual ha sido confirmado por este mismo grupo (Loera-Muro *et al.*, 2014; Loera-Muro *et al.*, 2013).

4. Interacción huésped-patógeno

Las interacciones huésped-patógeno son de gran importancia en la comprensión de la patogénesis de microorganismos infecciosos (Auger *et al.*, 2009).

Varios estudios han demostrado que patógenos bacterianos se unen preferencialmente a la mucosa, a proteínas, y a células epiteliales del tracto respiratorio inferior. Las células epiteliales desempeñan un papel importante como la interfase entre las superficies mucosas del huésped y el entorno circundante y son el sitio inicial de colonización para la mayoría de los patógenos bacterianos. El uso de líneas celulares y de cultivos primarios de células del huésped permite generar gran cantidad de información sobre el mecanismo de infección de *A. pleuropneumoniae*, así como la de otros patógenos del tracto respiratorio bacteriano o viral del cerdo (Chiers *et al.*, 2010; Auger *et al.*, 2009; Avadhanula *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2005; Kuehn & Kesty, 2005; Hamer-Barrera *et al.*, 2003).

En consecuencia, han sido desarrollados modelos *in vitro* utilizando líneas celulares y se han investigado las interacciones entre el huésped y el patógeno, incluyendo la

adherencia, la invasión y el perfil transcriptómico bacteriano, así como la muerte celular, la expresión del factor nuclear y la producción de citocinas por las células epiteliales (Auger *et al.*, 2009).

En muchos casos, los factores de virulencia de los patógenos Gram negativos son productos secretados que potencian la sobrevivencia de la bacteria y/o dañan al huésped. Estos patógenos han desarrollado estrategias para habilitar factores de virulencia activos para ganar acceso al ambiente extracelular, típicamente de tejidos o torrente sanguíneo del organismo huésped. La secreción de productos extracelulares es el mecanismo principal por el cual los patógenos Gram negativos se comunican e intoxican a las células del huésped (Kuehn & Kesty, 2005).

Para lograr realizar la interacción primero es necesario saber el número de células con las que se cuenta, tanto bacterianas como eucariotas para poder tener la relación exacta de cuántas células bacterianas se inoculan por cada célula eucariota. Para realizar la cuantificación se utilizan distintos métodos como conteo utilizando cámara de Neubauer tanto para células eucariotas como procariotas, y por método de conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y por densidad óptica para las últimas (Li *et al.*, 2015; Jarma, Corradino, & Regassa, 2004; Diarra *et al.*, 1996).

La virulencia de la App está determinada principalmente por la producción de toxinas RTX formadoras de poros: ApxI, ApxII y Apx III, que tienen propiedades hemolíticas y citotóxicas y son secretadas por los diferentes serotipos en diversas combinaciones. ApxI se expresa por los serotipos 1, 5, 9, 10, 11 y 14. ApxII es producido por todos los serotipos excepto el 10 y el 14; y ApxIII está presente en los serotipos 2, 4, 6, 8 y 15 (Dreyfus *et al.*, 2014). ApxIV se encuentra en todos los serotipos, es específico de la App, por lo que se utiliza en el diagnóstico para la identificación de especie (Sassu *et al.*, 2017a; Dreyfus, 2014).

Se han descrito muchos otros factores de virulencia de App, como los sideróforos, proteínas de unión a transferrina para la adquisición de hierro y la unión de hemoglobina

porcina por lipopolisacáridos y proteínas de la membrana externa implicadas en la captación de maltosa e inducción de lesiones, generadas por toxinas Apx, que provocan lisis celular. Otros factores de virulencia son la presencia de fimbrias, lipopolisacáridos y adhesinas involucradas en la adhesión, por nombrar algunos (Chiers *et al.*, 2010). Además, *A. pleuropneumoniae* puede formar biopelículas que disminuyen su susceptibilidad a los bactericidas y al sistema inmunológico del huésped. Asimismo, se han identificado otros genes de resistencia y plásmidos (Loera-Muro *et al.*, 2013; Loera-Muro *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016).

Aunque la patobiología de la infección por App se ha estudiado extensamente (Brogaard *et al.*, 2015; Sassu *et al.* 2017a), aún quedan por conocer algunos aspectos de su patogenia, principalmente su relación con las células huésped.

La capacidad de *A. pleuropneumoniae* de adherirse, colonizar e invadir a su huésped, y los factores del huésped como la respuesta inmune innata y adaptativa son cruciales para que se logre el desarrollo de la enfermedad (Xie *et al.*, 2017)

5. Adhesión bacteriana

Las células tisulares producen una variedad de macromoléculas que forman una red estructural compleja entre el espacio extracelular llamada matriz extracelular (MEC). Los complejos de adhesión multiproteína unen a las células con la matriz extracelular y una proteína con la otra. Los complejos de adhesión usualmente contienen receptores transmembranales, proteínas de transducción de señales, proteínas de unión y proteínas del citoesqueleto (Cossart, Boquet, Normark & Rappuoli, 2005).

La matriz extracelular no sólo sirve como soporte estructural de las células residentes, sino que también influye en la infiltración de bacterias patogénicas para colonizar (Cossart *et al.*, 2005).

La iniciación de la infección requiere de la adherencia de las bacterias a células no fagocíticas o a la MEC. Posibles consecuencias de la unión microbiana a la célula huésped son alteraciones estructurales y/o funcionales de las proteínas del huésped y la activación de mecanismos estructurales que influyen en la invasión patogénica de tejidos y células. Las adhesinas poseen características de unión típicas que contribuyen a la especificidad y tropismo del hospedador patógeno (Cossart *et al.*, 2005; Hammer-Barrera *et al.*, 2003).

Las células del huésped cuentan con componentes de adhesión en su superficie y fluidos tisulares que son reconocidos por las bacterias patógenas mediante la expresión de moléculas de adhesión asociadas a la superficie, generalmente adhesinas, que reconocen la superficie de la célula eucariota, proteínas de MEC o estructuras carbonatadas. Algunos componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas de la MEC se adhieren a sustratos con una distribución restringida de tejidos; no obstante, se debe tomar en consideración que dependiendo del patógeno y el tipo de célula que pretende colonizar es la adhesina que utiliza (Pereira *et al.*, 2017; Cossart *et al.*, 2005; Hammer-Barrera *et al.*, 2003).

Aunque diferentes patógenos pueden adherirse a casi cualquier sitio en el cuerpo, cada patógeno usualmente coloniza uno o algunos sitios particulares del huésped. Abundantes patógenos se adhieren de manera selectiva a receptores de adhesión celulares, lo que desencadena rutas de señalización en la célula hospedera; esta adherencia también puede representar el primer paso para una mayor penetración dentro del cuerpo e iniciar la invasión mediante la activación de vías de señalización celulares. Se ha demostrado que proteínas codificadas por genes asociados a la virulencia (VAGs, por sus siglas en inglés), las cuales son adhesinas no clásicas, también pueden llevar a cabo la adhesión bacteriana; sin embargo, la influencia sobre la adhesión, la especificidad del tejido y del huésped ejercida por una serie de VAGs permanece no clara. (Frömmel *et al.*, 2013; Cossart *et al.*, 2005).

La colonización de un huésped es influenciada por la habilidad de la bacteria para habitar un nicho y depende principalmente de la capacidad de la bacteria a adherirse a la mucosa, así como a la competencia exitosa con la microbiota establecida (Frömmel *et al.*, 2013).

La infección del huésped es facilitada por factores de virulencia presentes en loci específicos codificados por VAGS, que expresan una amplia variedad de factores como adhesinas, invasinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro y proteínas, involucrados en la colonización, adhesión, invasión y sobrevivencia a los sistemas de defensa del huésped. *Actinobacillus pleuropneumoniae* entra a los pulmones y coloniza el tejido uniéndose a proteínas de mucosas y células del tracto respiratorio inferior, incluyendo células bronquiales terminales y células epiteliales alveolares, gracias a varias estructuras de superficie que han sido identificadas como implicadas en la adhesión, incluyendo las fimbrias y lipopolisacáridos (LPS). Interacciones con componentes del huésped pueden enmascarar la superficie microbiana e interferir con la presentación de antígeno, dando como resultado una estrategia de evasión del sistema inmune, así como una vez internalizada la bacteria puede escapar al efecto de ciertos antibióticos (Cuccui *et al.*, 2017; Frömmel *et al.*, 2013; Cossart *et al.*, 2005).

A pesar de que no todas las interacciones huésped-patógeno resultan en entrada celular, adherencia a membranas mucosas epiteliales, particularmente del sistema respiratorio, gastrointestinal y urogenital, o entrada mediante ojos, oídos o heridas, la adherencia es un prerrequisito para el proceso de infección y es considerada un factor de virulencia importante (Cossart *et al.*, 2005).

6. Internalización bacteriana

Los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos son ejemplos de células fagocíticas, las cuales son células adaptadas para internalizar y aniquilar a los patógenos mediante un proceso llamado fagocitosis. A su vez existen células no fagocíticas que no están profesionalmente adaptadas para aniquilar microbios; por lo que los patógenos capaces

de entrar a este tipo de células, deben inducir su propia entrada a las células mediante un proceso llamado internalización (Ofek, Hasty & Doyle, 2003).

Para establecer la infección, las bacterias patógenas deben evadir la respuesta inmune y los mecanismos de defensa del huésped. Esto se logra gracias a la interacción que se establece con células no fagocíticas, como las células endoteliales y epiteliales, logrando adherirse, internalizarse y en algunos casos sobrevivir y replicarse (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2006).

El proceso de internalización es complicado y para su entendimiento es necesario contar con un vasto conocimiento, tanto de la biología de la célula animal, como de la bacteria (Ofek *et al.*, 2003).

Existen tres categorías de crecimiento bacteriano en presencia de células no fagocíticas: intracelulares obligatorias, intracelulares facultativas y extracelulares. Sin importar la categoría a la que pertenece la bacteria, es asumido que la entrada en células no fagocíticas es consecuencia de una adhesión inicial; sin embargo, en algunos casos el proceso de adhesión puede ser separado de la internalización, mientras que en otros no hay una distinción clara (Ofek *et al.*, 2003).

El citoesqueleto juega un papel importante en la entrada de los patógenos bacterianos, pues es explotado por el patógeno para obtener fuerzas motrices para la internalización. Un gran número de bacterias y patógenos virales utilizan las proteínas de la célula eucariota huésped para unirse al citoesqueleto de actina e impulsarse a través del citoplasma del huésped. Este proceso ayuda al patógeno a dispersarse de una célula a otra. Los detalles de cómo los componentes del huésped son secuestrados para formar estas redes de citoesqueleto asociadas con patógenos son importantes para comprender los mecanismos moleculares subyacentes a las interacciones huésped-patógeno (Yu-Kemp & Briehner, 2015; Ofek *et al.*, 2003).

Al entrar en contacto con las células del huésped, éstas toman una función parecida a la de las células fagocíticas formando estructuras similares a pseudópodos que permiten el

“fagocitar” a la célula bacteriana. Una vez dentro de la célula, la bacteria patógena es capaz de evadir la respuesta inmune, replicarse y provocar la muerte celular de la célula hospedera, de la cual las bacterias patógenas logran escapar y colonizar a las células aledañas (Asano *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016; Yu-Kemp & Briehner, 2015).

Microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersenia spp*, los géneros *Shigella*, *Salmonella*, *Neisseria* y *Streptococcus pyogenes*, por mencionar algunos, han mostrado mecanismos similares de adhesión e internalización en células no fagocíticas del huésped (Zhu *et al.*, 2016; Cossart *et al.*, 2005).

L. monocytogenes ha servido como modelo patogénico para elucidar muchos aspectos entre bacterias intracelulares y la respuesta inmune del huésped. Esta bacteria ha desarrollado un método con el que logra obligar a la célula del huésped a cooperar en su autodestrucción (Asano *et al.*, 2016; Sechi, Wehland & Small, 1997).

La bacteria Gram-negativa *Haemophilus influenzae*, miembro de la familia *Pasteurellaceae*, coloniza el tracto respiratorio superior humano y causa infección del oído medio, sinusitis, conjuntivitis, bronquitis crónica, bronquiectasias, fibrosis quística y neumonía. Esta bacteria se adhiere a la mucosa del epitelio respiratorio y provoca reordenamientos del citoesqueleto de la célula huésped, formando lamelipodios que rodean a las bacterias adherentes formando una vacuola unida a la membrana. Su invasión es inhibida por la citocalasina D (disruptor de la polimerización de actina). Sin embargo, la micropinocitosis puede ser la vía de invasión predominante para este patógeno, en cuyo caso, el citoesqueleto de actina no tiene este importante papel (St Geme, 2002).

Actinobacillus suis es un patógeno porcino oportunista, que puede colonizar las tonsilas de forma asintomática. *A. suis* tiene similitudes con App, comparte varios factores de virulencia y causa enfermedades similares como fibrinopleuroneumonía hemorrágica, enteritis, mastitis, artritis, meningitis y septicemia. Aunque su patogenia es poco conocida, se sabe que la proteína OmpA, también presente en App, juega un papel clave en la

adhesión a las amígdalas y es crucial para lograr la colonización inicial e invasión del sistema nervioso central (Ojha *et al.*, 2010). *A. pleuropneumoniae* se ha descrito como un patógeno extracelular capaz de adherirse a la superficie de la célula huésped como células traqueales o alveolares, pero incapaz de invadirlas (Auger *et al.*, 2009; Bercier *et al.*, 2019).

7. El endotelio y las células endoteliales

El endotelio, una monocapa de células epiteliales planas, constituye el revestimiento celular interno de los vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) y el sistema linfático, y por lo tanto está en contacto directo con la sangre/linfa y las células circulantes. El término "endotelio" fue acuñado por primera vez en 1865 por el anatomista suizo, Wilhelm. Posteriormente, hasta principios de los años setenta, se consideró que esta monocapa era una mera barrera de difusión que impedía el acceso de las células sanguíneas a la matriz vascular, pero ahora se reconoce que es un actor predominante en el control de la fluidez sanguínea, la agregación plaquetaria y el tono vascular: además de jugar un papel principal en la regulación inmunológica, la inflamación, la angiogénesis, y ser un órgano endocrino metabolizante (Félétou, 2011).

Las células endoteliales están ancladas a una lámina basal de 80 nm de espesor, las dos que constituyen la íntima. La lámina basal es un componente importante del vaso sanguíneo, ya que es el andamio de cada arteria, vena o capilar. El interior de este andamio está revestido con células endoteliales, mientras que el exterior está cubierto con células de músculo liso o pericitos. Las células endoteliales pueden sintetizar prácticamente todas las proteínas que constituyen la lámina basal y producir las enzimas relevantes implicadas en su remodelación, como las metaloproteinasas de matriz que degradan esta MEC, una acción importante para la plasticidad de los vasos sanguíneos y para la angiogénesis (Félétou, 2011).

Las células endoteliales (CE) alinean la superficie interna de todos nuestros vasos sanguíneos. Son una parte integral de la unidad vascular que incluye células murales tales como pericitos, podocitos y células de músculo liso, junto con macrófagos perivasculares o fibroblastos en la adventicia. Las CE son muy plásticas, y sus fenotipos son específicos de órganos. Situada en una posición estratégica, la única capa de CE constituye una barrera variable entre la sangre y el tejido y controla los movimientos del fluido, los solutos y las células entre la sangre y el tejido, así como la hemostasia, el tono vascular y el metabolismo y función tisular. Además, la capa endotelial regula el tono vascular y dirige los procesos inflamatorios locales humorales y celulares. Su posición estratégica la hace un jugador importante para el mantenimiento de la salud y para el desarrollo de una serie de enfermedades. Las células endoteliales desempeñan un papel fundamental en la fisiopatología de la enfermedad a través de la iniciación, potenciación y mantenimiento de varios mecanismos inflamatorios (Hansen, Hansen & Sams, 2017).

La forma de las células endoteliales varía a través del árbol vascular, pero generalmente son delgadas y ligeramente alargadas, su dimensión es aproximadamente de 50-70 μm de largo, 10-30 μm de ancho y 0.1-10 μm de grosor. En la pared de los vasos sanguíneos, las células endoteliales están orientadas a lo largo del eje del vaso, minimizando las fuerzas de esfuerzo cortante ejercidas por la sangre que fluye. Aunque el endotelio está constituido por una sola capa de células, aproximadamente 10 a 60 $\times 10^{12}$ células endoteliales del cuerpo humano ocupan una superficie (interfaz sangre/endotelio) que mide aproximadamente 300 a 1000 m^2 . Estos datos morfológicos indican que las células endoteliales son un sitio privilegiado para el intercambio y la transferencia. Sin embargo, las células endoteliales vasculares no son todas iguales e importantes variaciones morfológicas, fisiológicas y fenotípicas se producen entre ellas en las diferentes partes del árbol arterial, así como entre las arterias y las venas (Félétou, 2011).

7.1 Endotelio y el sistema respiratorio

El sistema respiratorio, incluidos los alvéolos, está en estrecha relación con el endotelio. El endotelio es una monocapa continua de células escamosas con fuertes uniones celulares que recubren la parte interna de los capilares vasculares. Este tejido está presente en todo el sistema circulatorio y cumple varias funciones únicas y distintas que son fundamentales para la biología vascular. El endotelio sirve como barrera para intercambiar materiales entre el torrente sanguíneo y los tejidos, por lo tanto, las alteraciones en las células endoteliales tienen un papel central en la patogénesis de una amplia gama de enfermedades (Michiels, 2003; Rajendran *et al.*, 2013).

El tejido pulmonar está altamente vascularizado debido al intercambio gaseoso entre los alvéolos pulmonares y los capilares sanguíneos durante la respiración; lo que significa que hay muchas células endoteliales en él.

La función principal del pulmón, el intercambio de gases, tiene lugar en la región alveolar. El aire llega a la luz alveolar y llega al torrente sanguíneo al penetrar una barrera que consiste en epitelio alveolar, endotelio capilar y la capa de tejido conectivo en el medio (Knudsen & Ochs, 2018).

El endotelio pulmonar está formado por una sola capa de células endoteliales y juega un papel clave en la permeabilidad de la barrera, el intercambio de nutrientes y moléculas, el tono vascular y la homeostasis pulmonar (Rajendran *et al.*, 2013; Millar *et al.*, 2016; Huertas *et al.*, 2018). La alteración de la función endotelial normal, causada por estímulos directos o indirectos, está involucrada en la patogénesis y progresión de varias enfermedades pulmonares crónicas y agudas (Huertas *et al.*, 2018, Letsiou & Bauer, 2018).

En la mayoría de las infecciones bacterianas, el foco de infección inicial es el epitelio de la mucosa del tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital. Sin embargo, los patógenos bacterianos que causan infecciones sistémicas se diseminan a través de los vasos vasculares o linfáticos a diferentes órganos diana. Para lograr esto, deben adherirse al

tejido endotelial, provocando la reorganización de la membrana endotelial a través de varios estímulos, modificando la permeabilidad del endotelio o usando vasculatura endotelial o caveolinas para llegar al torrente sanguíneo (Lemichez *et al.*, 2009, Salo *et al.*, 2016, Pedersen *et al.*, 2018).

App se considera un patógeno exclusivo del sistema respiratorio porcino, sin embargo, se ha encontrado en otros órganos como orejas, sangre y amígdalas en cerdos portadores. También existen casos de artritis, osteomielitis, hepatitis, meningitis y nefritis en los que el único patógeno detectable es *A. pleuropneumoniae*, lo que implica una capacidad de propagación por todo el cuerpo, probablemente utilizando el torrente sanguíneo para transportarse, que es un fenómeno común observado en infecciones por patógenos bacterianos (Lubkin y Torres, 2017; Hoeltig *et al.*, 2018). El propósito del presente estudio fue confirmar la capacidad de adhesión de los serotipos 1, 3, 5b y 7 de App (cepas 4074, JL03, L20 y AP76) y determinar la capacidad de invasión de *A. pleuropneumoniae* en un modelo de cultivo celular no fagocítico, células endoteliales, como un nuevo mecanismo de infección.

HIPÓTESIS

Los serotipos 3, 5b y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, que son los más prevalentes en México, son capaces de adherirse e internalizarse en las células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo.



JUSTIFICACIÓN

Actinobacillus pleuropneumoniae es un importante patógeno del tracto respiratorio porcino y el agente etiológico de la pleuroneumonía porcina, la cual tiene un impacto significativo en el bienestar animal y en la producción económica.

Los serotipos 1, 3, 5b y 7 de *A. pleuropneumoniae* se encuentran entre los más prevalentes en México, y han sido detectados en la mayoría de las ocasiones realizando coinfecciones con otros patógenos.

El tratamiento preventivo con antibióticos y las vacunaciones han resultado de gran utilidad en el control de la enfermedad; sin embargo, es necesario poseer una mayor cantidad de conocimientos sobre los factores de virulencia de la bacteria y la patogénesis de la enfermedad.

Aun cuando *A. pleuropneumoniae* ha sido ampliamente estudiado, los mecanismos que utiliza para realizar la infección dentro del huésped y la interacción con las células del mismo no se encuentran bien documentados.

Las interacciones huésped-patógeno son de gran importancia en la comprensión de la patogénesis de microorganismos infecciosos. Se han realizado ensayos con microorganismos como *L. monocytogenes* y *E. coli*, entre otros, donde se muestra su capacidad de internalizarse en células no fagocíticas y así evadir la respuesta inmunológica del huésped, por lo que es propio deducir que *A. pleuropneumoniae* presenta mecanismos similares a la de los patógenos bacterianos antes descritos.

Al realizar la interacción del patógeno de interés con células endoteliales de aorta de cerdo en un ambiente in vitro es posible observar, al hacer uso de distintas técnicas de microscopía como son la óptica, confocal y electrónica, los mecanismos de adherencia e internalización del mismo, y así tener un mejor entendimiento de sus mecanismos de acción.

Utilizando los conocimientos generados en la elaboración de este trabajo aunados a los posibles resultados que se pueden obtener en futuros ensayos que logren desvelar los mecanismos de virulencia de *A. pleuropneumoniae* será probable el determinar las interacciones y procesos que se llevan a cabo a nivel molecular, tanto en la célula del huésped como en el patógeno al momento de la infección. Una vez adquiridos estos conocimientos podrá ser factible elaborar un método eficaz que logre la erradicación de la enfermedad



OBJETIVO GENERAL

Identificar los mecanismos de internalización de los serotipos 1, 3, 5b y 7, cepas JL03, L20 Y AP76, respectivamente, de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en células de aorta de cerdo en cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los mecanismos de internalización de *Actinobacillus pleuropneumoniae* con células endoteliales de aorta mediante microscopía óptica, confocal y electrónica de transmisión.
- Establecer si existe adherencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* al citoesqueleto de actina de las células endoteliales.
- Establecer si *Actinobacillus pleuropneumoniae* se adhiere al citoesqueleto de tubulina de las células endoteliales.

METODOLOGÍA

1. Cultivo de células endoteliales de aorta de cerdo

Cultivo de células endoteliales de aorta de cerdo de una línea celular primaria previamente establecida (Burciaga-Nava *et al.*, 2009) es mantenido utilizando medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco) suplementado con SFB, penicilina [100 µg/ml] y anfotericina [2.5 µg/ml] a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂ y 95% de aire.

Para el conteo celular y determinación de viabilidad será utilizada la técnica de exclusión con azul de tripano (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.).

2. Cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Las cepas JL03, L20 y AP76 (serotipos 3, 5b y 7, respectivamente) de *A. pleuropneumoniae* se mantuvieron en medio Agar-BHI (BIOXON) suplementado con NAD (15 µg/ml) y se realizaron resiembras de cada cepa cada 7 días.

De la misma manera el serotipo 1 (cepa 4074) de App se utiliza como control, ya que su interacción con células endoteliales ya se ha estudiado anteriormente por este equipo de investigación (material no reportado), siendo mantenido en las mismas condiciones anteriormente descritas.

La viabilidad celular se realiza mediante conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y por densidad óptica (Lévesque *et al.*, 2014).

Cultivos bacterianos de toda la noche fueron recolectados por centrifugación (10000g x 5 min) y resuspendidos en medio DMEM hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm proporcionando la concentración final requerida para los ensayos (Auger *et al.*, 2009;

Letourneau *et al.*, 2011) basado en modelos de curva de crecimiento previos realizados para cada cepa (datos no incluidos).

3. Infección de Células Endoteliales con *A. pleuropneumoniae*

Se realiza un co-cultivo de células endoteliales de aorta de cerdo a por lo menos 70% de confluencia con *A. pleuropneumoniae*, dejándolas interactuar por determinado tiempo y realizando monitoreos durante el mismo.

3.1 Ensayo de Adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Utilizando cajas multipozo para cultivo celular, se establecen co-cultivos de células endoteliales con cada uno de los serotipos de *A. pleuropneumoniae* elegidos para realizar este trabajo llevados multiplicidad de infección (MOI) de 10:1 siguiendo las técnicas descritas por Lévesque y colaboradores (2014) y Letourneau y colaboradores (2011). Los cultivos son mantenidos en medio DMEM sin antibióticos suplementado con SFB al 10% a 37 °C en un ambiente con 5% de CO₂ y 95% de aire durante 0.5, 1 y 2 horas.

Transcurrido el tiempo, el cultivo es lavado con DPBS estéril. Las células son despegadas mediante digestión enzimática utilizando Tryple™ (Gibco) durante 3 minutos a 37°C. Posteriormente se realizan diluciones seriadas (1:1000, 1:10000 y 1:100000) las cuales son sembradas en placas de medio BHI (BIOXON) suplementado con NAD e incubadas a 37°C por 24 horas, realizando el conteo de UFC para determinar el número de bacterias adheridas por célula endotelial al dividir el total de UFC entre el total de células endoteliales.

El procedimiento es realizado por triplicado.

3.2 Ensayo de Internalización de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Co-cultivos de las células endoteliales de aorta de cerdo con *A. pleuropneumoniae* son establecidos en las mismas condiciones descritas en el ensayo de adhesión, realizando la interacción durante 3 horas dejando que se realice la internalización del patógeno. Transcurridas las 3 horas el cultivo es lavado 3 veces con DPBS estéril; añadiendo subsecuentemente medio DMEM con SFB al 10% adicionado con gentamicina [100 µg/ml] e incubando por 1 hora en condiciones de cultivo lo que propiciará la eliminación las bacterias extracelulares (ensayo de exclusión por gentamicina). Transcurrido el tiempo se realizan lavados al cultivo con DPBS estéril y posteriormente las células son lisadas utilizando agua desionizada estéril a 4°C. Los lisados son recolectados efectuando diluciones seriadas (1:1000, 1:10000 y 1:100000) las cuales son sembradas en placas con medio BHI (BIOXON) suplementado con NAD durante 24 horas a 37 °C para realizar el conteo de UFC y determinar el número de bacterias internalizadas por cada célula endotelial. El procedimiento es realizado por triplicado (Letourneau *et al.*, 2011; Burciaga-Nava, 2008; Torres-García *et al.*, SP).

El porcentaje de internalización es calculado dividiendo los organismos inoculados (UFC / ml) por los organismos recuperados (UFC / ml) y multiplicando por 100. Los resultados se presentan como media ± DE (Burns *et al.*, 1996).

4. Obtención de Anticuerpo Anti App

Se emplearon cultivos de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 y 5b, crecidos en 50 ml de medio BHI (BIOXON) adicionado con 15 µg/ml de NAD. El cultivo es centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos y la pastilla es lavada 3 veces utilizando DPBS estéril; posteriormente se obtienen los polvos acetónicos de los mismos, utilizando la técnica de Pardee y Spudich con las modificaciones reportadas por Guerrero-Barrera y colaboradores

(1999). El extracto proteico obtenido es resuspendido en DPBS estéril y su concentración es medida utilizando la técnica de Bradford utilizando para la curva patrón albúmina serica bovina (BSA) 10 mM.

Conejo hembra de 2 kg, proporcionada por el bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, es inmunizada de manera intraperitoneal con 300 µg del extracto proteico total de App una vez a la semana durante 4 semanas. La semana posterior a la última inmunización se recolecta sangre del espécimen y se obtiene el suero inmune al centrifugar la muestra sanguínea a 3000 rpm por 15 minutos a TA.

El extracto proteico total de *E. coli* se corre en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y es transferido a una membrana de PVDF (durante 1 ½ horas con voltaje de 35 Å). La membrana con el extracto de *E. coli* es puesta en agitación en contacto con el suero inmune durante toda la noche a 4°C para separar el anticuerpo anti App de todos los componentes inespecíficos contenidos en el suero. Transcurrido el tiempo de incubación el suero inmune es recuperado y almacenado de 4 a -20°C hasta su utilización.

Se realiza la técnica de Western Blot para comprobar la presencia del anticuerpo anti App en el suero inmune purificado al transferir el extracto proteico total de App a una membrana de PVDF, dejándola en contacto con el suero purificado toda la noche a 4°C en agitación, para su posterior marcaje utilizando el anticuerpo secundario anti IgG de conejo HRP (Molecular Probes) por 1 hora a TA y su posterior revelado con diaminobencidina (DAB).

5. Inmunomarcaje y Microscopía Confocal

Siguiendo la técnica descrita para los ensayos de internalización, se siembran células endoteliales en cajas de sistema Lab-Tek de permanox de 8 pocillos, donde se realiza la interacción con los distintos serotipos de App durante 3 horas con una MOI de 2:1.

Muestras obtenidas de los ensayos de internalización son fijadas y marcadas por técnicas de inmunofluorescencia para analizar la implicación de diversos organelos celulares en la internalización de *A. pleuropneumoniae* en el huésped y posteriormente observadas mediante microscopía confocal utilizando el microscopio confocal Zeiss CLSM 700.

5.1 Citoesqueleto de Actina

Se realiza la interacción de células endoteliales con las distintas cepas de *A. pleuropneumoniae* durante 3 horas como se describe en el ensayo de internalización. Transcurrida la interacción, las muestras son fijadas utilizando formaldehído al 3.7% por 20-30 min a temperatura ambiente (TA). Se realizan dos lavados con DPBS y se procede a realizar la permeabilización de la membrana celular utilizando Tritón X-100 al 0.1% durante 5 minutos, realizando lavados con DPBS para retirar residuos del detergente.

El bloqueo de sitios inespecíficos es llevado a cabo por 30 min a 37°C utilizando una solución de PBS 1X-BSA 1%, para posteriormente proceder al marcaje del citoesqueleto de actina utilizando faloidina-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) en una proporción 1:100 durante 30 minutos utilizando cámara húmeda y en oscuridad.

Una vez realizado el marcaje del citoesqueleto de actina se procede a realizar el marcaje de *A. pleuropneumoniae* bloqueando nuevamente los sitios inespecíficos utilizando PBS 1X-BSA 1% por 30 min a 37°C seguido del inmunomarcaje indirecto utilizando el anticuerpo primario anti-App producido en conejo por 3 hora a 37°C y consecuentemente incubando por 1 hora a 37°C con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo–Alexa Fluor 594 (Molecular Probes).

Los núcleos son marcados utilizando Hoechst 33258 por 15 min a TA. Las muestras son montadas utilizando ProLong Gold (Molecular Probes) y observadas con microscopio confocal Zeiss CLSM 700.

5.2 Citoesqueleto de Tubulina

La interacción de células endoteliales con las distintas cepas de *A. pleuropneumoniae* es llevada a cabo durante 3 horas en las condiciones descritas, así como las muestras son fijadas, permeabilizadas y se realiza el bloqueo de sitios inespecíficos de la manera anteriormente mencionada. Una vez realizado el bloqueo se marca el citoesqueleto de tubulina utilizando un anticuerpo primario anti α -tubulina producido en ratón (Sigma Aldrich) en una proporción 1:250 durante 3 horas a 37°C, añadiendo posteriormente el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 488 (Sigma Aldrich) con una concentración de 2 μ g/ml durante 1 hora a 37°C.

El marcaje de App y los núcleos es realizado de la misma forma ya descrita en el marcaje del citoesqueleto de actina, así como el montaje de las muestras utilizando ProLong Gold (Molecular Probes).

5.3 Retículo Endoplásmico

Una vez hecha la interacción de *A. pleuropneumoniae* con las células endoteliales de aorta de cerdo por 3 horas, se procede a realizar el marcaje del retículo endoplásmico utilizando el kit SelectFX® Alexa Fluor® 488 Endoplasmic Reticulum Labeling Kit (Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante y marcando App y los núcleos celulares utilizando el procedimiento descrito en el marcaje del citoesqueleto de actina.

5.4 Aparato de Golgi

El aparato de Golgi se tiñó con CellLight Golgi-RFP BacMam 2.0 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El reactivo se añade al

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cultivo celular en una concentración de 1 μ M y se deja incubar por lo menos 16 horas en oscuridad, se realiza la interacción con la bacteria y se procede a hacer la tinción de esta última como del núcleo utilizando Hoechst y su montaje utilizando ProLong Gold.

5.5 Medición de Longitud de Núcleos

La longitud de 40 núcleos seleccionados al azar de muestras de las diferentes interacciones realizadas es medida utilizando el software ZEN blue (Carl Zeiss, Alemania) para comparar la diferencia entre el control y las células con la App internalizada. Los resultados se presentan como media \pm DE.

6. Evaluación de Presencia de Vacuolas por Marcaje de Organelos Acídicos

Utilizando cámaras Lab Tek se realiza el ensayo de internalización como se mencionó anteriormente, con *E. coli* BI21 (pUCmT :: Vat) (Díaz *et al.*, 2020) como control positivo. Después de la interacción, los cultivos se lavan e incuban durante 30 min con medio DMEM fresco con reactivo LysoTracker Deep Red [75 nM] (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE. UU.), después de lo cual las células se lavan dos veces con DPBS. Luego, las muestras son fijadas y montadas como se especificó previamente.

7. Análisis de Expresión de Serin Proteasa por *A. pleuropneumoniae*

Las proteínas totales de las cepas App 4074, JL03, L20 y AP76, *E. coli* BI21 (pUCmT :: Vat) y el vector vacío *E. coli* BI21 (control positivo y negativo respectivamente) (Díaz *et al.*, 2020) se obtienen hirviendo durante 3 minutos con amortiguador de muestra y TLCK. La concentración de proteínas se mide mediante la técnica de Bradford (Hammond y Kruger, 1988). Las muestras se someten a electroforesis en un gel SDS-PAGE al 10% y son

transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea con leche desnatada al 5% (Gibco, BRL, Grand Island, NY), luego es lavada tres veces con PBS-Tween al 0,1% e incubada a 4°C con anticuerpo policlonal primario anti Vat SPATE [1: 1000] a 4°C, este anticuerpo se usa para probar la presencia de serin proteasa. Posteriormente la membrana es lavada tres veces con PBS-Tween 0.1% (Pokharel *et al.*, 2020), e incubada con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG-HRP [2: 10000] (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana es revelada con DAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.).

8. Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron mediante ANOVA y pruebas ANOVA de dos vías para determinar la significancia estadística a un valor P de 0,05 utilizando GraphPad Prism versión 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

RESULTADOS

1. Adhesión Bacteriana

La pureza de las cepas de App ATCC 4074, JL03, L20 y AP76 es determinada mediante PCR y caracterizándolas mediante microscopía electrónica de barrido, así como por tinción Gram (resultados no mostrados).

Fue determinada la capacidad de adhesión de las cepas 4074, JL03, L20 y AP76 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a las células endoteliales. App 4074 muestra tasas de adhesión más altas en comparación con el resto de las cepas estudiadas, sin embargo, la cantidad de UFC adheridas disminuye al aumentar el período de incubación, a diferencia de L20 y AP76 que aumentan su adhesión en relación con el tiempo de incubación; mientras que la cepa JL03 muestra un patrón irregular al disminuir la cantidad de adhesión en la hora 1 en comparación con la hora 0.5 y aumenta nuevamente después de 2 horas (figura 1). La diferencia de los niveles de adhesión entre cepas no es significativa.

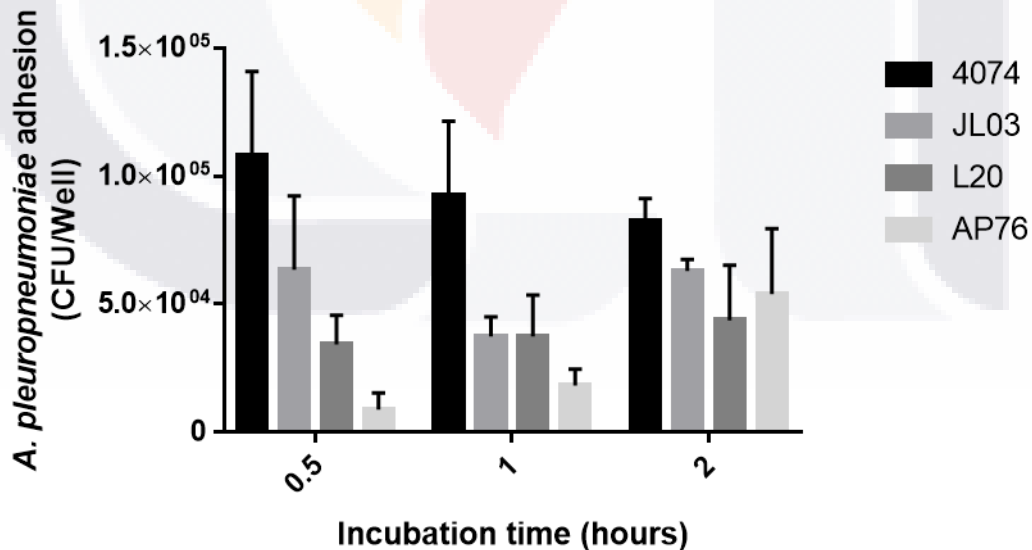


Figura 1. Adhesión de *A. pleuropneumoniae* S4074, JL03, L20 y AP76 a las células endoteliales de aorta de cerdo observadas a 0.5, 1 y 2 h de incubación. Se muestra una mayor adhesión por parte de la cepa 4074 y menor para las cepas L20 y AP76; no obstante, la diferencia no es significativa. Las barras muestran el error estándar.

2. Internalización Bacteriana y Marcajes por Inmunofluorescencia

Es investigada la capacidad de invasión de *A. pleuropneumoniae*. Los resultados obtenidos a través del recuento de UFC confirman la capacidad de ingresar a la célula huésped de las cuatro cepas de App estudiadas, aunque la capacidad de internalización de estas cepas fue relativamente baja. *A. pleuropneumoniae* JL03 tiene un mayor porcentaje de invasión (4.6%), seguido de L20 (1.75%), AP76 (1.6%) y 4074 con una invasión de 1.3% (tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de internalización de *A. pleuropneumoniae* S4074, JL03, L20 y AP76 a células endoteliales de aorta de cerdo (MOI 10: 1) a 3 h.

| Serotype | CFU/Well | Internalization Percentage |
|-----------|-----------------------|----------------------------|
| 1 | 5.50 x10 ³ | 1.3 ± 1.15 |
| 3 | 1.87x10 ⁴ | 4.6 ± 1.13 |
| 5b | 7.03x10 ³ | 1.75 ± 0.69 |
| 7 | 6.4x10 ³ | 1.6 ± 0.64 |

El citoesqueleto de la célula huésped desempeña un papel importante en la invasión bacteriana reorganizándose para permitir la entrada de las bacterias, por lo tanto, una vez que es observada la capacidad de App para ingresar al huésped por recuentos de UFC, se analiza la participación del citoesqueleto de actina y tubulina en el mecanismo de internalización. La figura 2 muestra la distribución normal de los microfilamentos de actina dentro de la célula endotelial, después de la incubación de las células endoteliales infectadas con las 4 cepas de App, no hay cambios notables en el reordenamiento de la actina, pero la bacteria se observa dentro de la célula endotelial principalmente alojada en el área perinuclear, lo que demuestra su ubicación intracelular; también se encuentra haciendo co-localización con el citoesqueleto de actina en algunas áreas, lo que implica una posible interacción entre ellos. Para probar que el citoesqueleto de actina tiene un papel importante en el mecanismo de internalización de App, los cultivos de células endoteliales se pretrataron con CD, un conocido inhibidor de la polimerización de la

actina; sin embargo, las diferentes cepas de App todavía se encontraron dentro del huésped, independientemente de la presencia de citoesqueleto de actina.

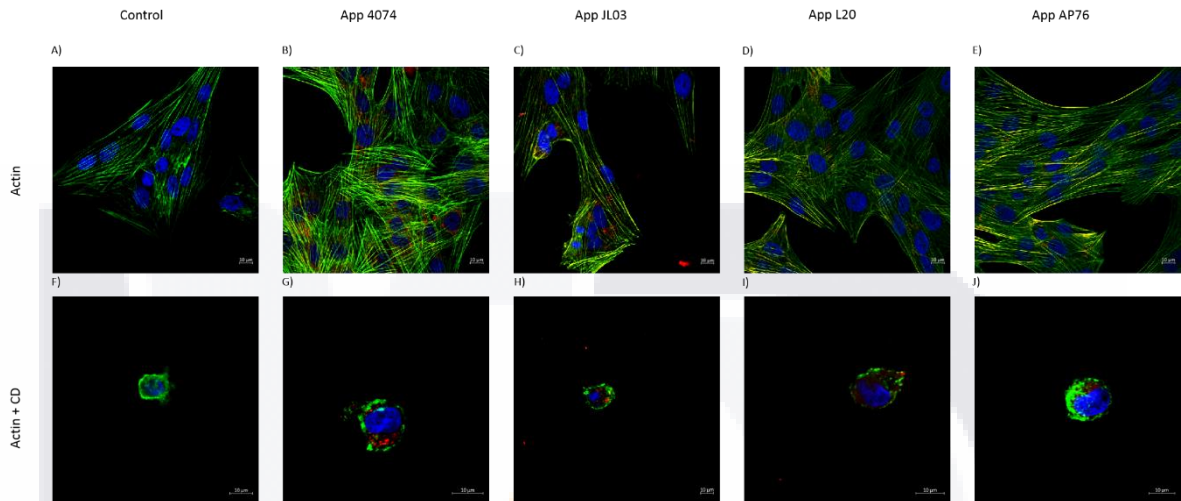


Figura 2. Implicación del citoesqueleto de actina en la internalización de *A. pleuropneumoniae* en células endoteliales de aorta de cerdo después de 3 h de incubación. (A) Citoesqueleto de actina de células endoteliales porcinas teñidas de verde con Faloidina Alexa Fluor 488; (B-E) *A. pleuropneumoniae* internalizado en células endoteliales porcinas, marcado con anticuerpo policlonal primario y anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (rojo); (F) citoesqueleto de actina incubado con CD; (G-J) *A. pleuropneumoniae* internalizada y alojada en el área perinuclear de células endoteliales porcinas tratadas con CD.

La participación del citoesqueleto de tubulina en la internalización del patógeno bacteriano estudiado se muestra en la figura 3. Las muestras de cultivos infectados muestran nuevamente las 4 cepas de App dentro de las células endoteliales formando grumos en el perinúcleo. Estos también se pueden observar relacionados con zonas intracitoplasmáticas redondas similares a las vesículas, así como en la circunferencia de estas estructuras que muestran co-localización con microtúbulos. En cultivos pretratados con colchicina (disruptor de tubulina), App se sigue observando en el espacio perinuclear.

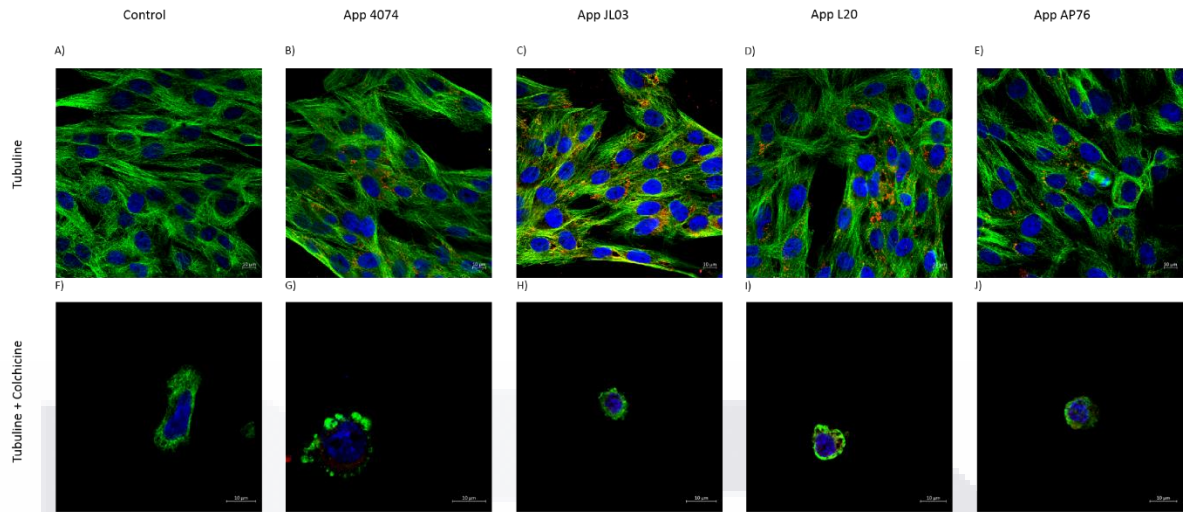


Figura 3. Implicación del citoesqueleto de tubulina en la internalización de *A. pleuropneumoniae* a células endoteliales de aorta de cerdo después de 3 h de incubación. (A) Citoesqueleto de tubulina de células endoteliales porcinas teñidas de verde con anticuerpo monoclonal primario y anticuerpo monoclonal secundario Alexa Fluor 488; (B-E) *A. pleuropneumoniae* internalizado en células endoteliales porcinas marcadas con anticuerpo policlonal primario y anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (rojo); (F) citoesqueleto de tubulina tratado con colchicina; (G-J) *A. pleuropneumoniae* mantiene la capacidad de internalizarse en las células endoteliales tratadas con colchicina. Núcleos contrastados con Hoechst 33258.

Muchos organelos intracelulares implicados en el transporte de sustancias pueden ser utilizados por un patógeno para ingresar a la célula huésped, por lo tanto, una vez estipulado que el citoesqueleto no es su ruta de invasión primaria, la relación de *A. pleuropneumoniae* internalizada con organelos de la célula endotelial involucrados en el transporte de sustancias fueron investigadas. Se analiza la relación entre App internalizada y el retículo endoplásmico (RE). Las bacterias continúan mostrando una preferencia por el espacio circuncidado al núcleo que forma grupos, que también se pueden ver en zonas redondas similares a las vesículas. La co-localización de App con el RE se observa en algunas regiones, sin embargo, no se observan cambios en su distribución en el citoplasma (figura 4).

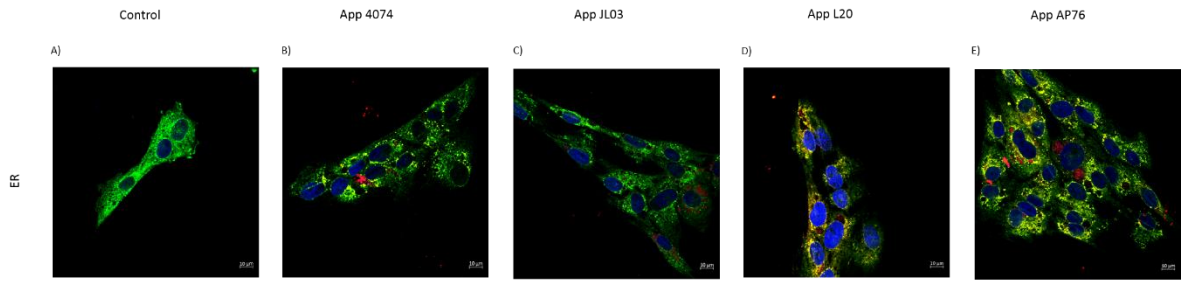


Figura 4. Efecto de internalización de *A. pleuropneumoniae* en el retículo endoplásmico. (A) Distribución normal del retículo endoplásmico teñido con el kit de marcaje de retículo endoplásmico Alexa Fluor 488 SelectFX (verde); (B-E) *A. pleuropneumoniae* (roja) internalizada en células endoteliales. Se observa la co-localización de *A. pleuropneumoniae* y RE sin embargo, no se muestran cambios importantes en la distribución de ER.

Por el contrario, la distribución del aparato de Golgi se ve afectada una vez que App ha ingresado a la célula endotelial tomando una distribución perinuclear (figura 5).

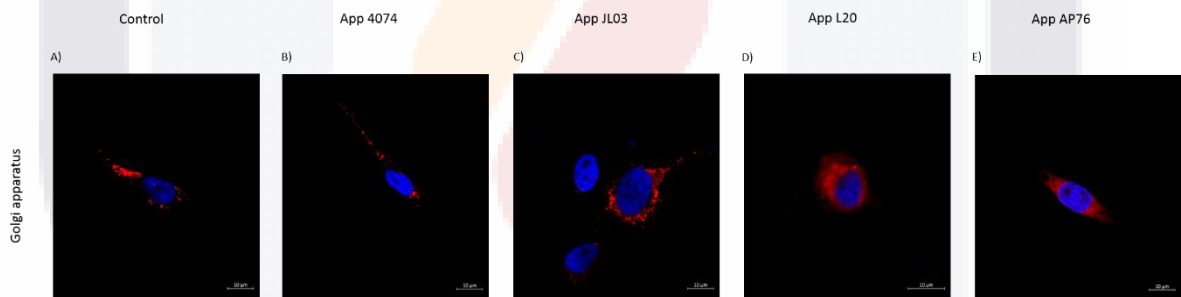


Figura 5. Efecto de internalización de *A. pleuropneumoniae* en el aparato de Golgi. (A) Distribución normal del aparato de Golgi (rojo) en células endoteliales porcinas, (B-E) La distribución del aparato de Golgi se altera después de la entrada de *A. pleuropneumoniae*, migrando a una posición perinuclear.

La capacidad de invasión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se ve claramente; sin embargo, el mecanismo de invasión específico aún es incierto. Curiosamente, se observa un alargamiento de los núcleos de las células infectadas en todas las muestras de los ensayos. La longitud promedio de los núcleos en las muestras de control fue $14277.063 \text{ nm} \pm 21.85 \text{ nm}$, mientras que para las células endoteliales que interactuaron con la App 4074 fue $18344.528 \pm 11.66 \text{ nm}$, $17389.621 \pm 16.61 \text{ nm}$ para JL03, $18324.956 \pm 13.84 \text{ nm}$

cuando L20 fue internalizado, y $18109.861 \text{ nm} \pm 17.41$ en presencia de AP76. Las diferencias en la longitud de los núcleos de control en comparación con las muestras problema son estadísticamente significativas.

3. Evaluación de Presencia de Vacuolas por Marcaje de Organelos Ácidos

Como se muestra en la figura 6 los resultados del marcado con LysoTracker demostraron que cuando las células endoteliales son infectadas con App, se produce una mayor cantidad de vesículas ácidas (lisosomas) en comparación con el control. Esto se observa para App JL03 y App L20, este resultado fue similar al efecto que produjo *E. coli* B121 (pUCmT :: Vat). Por el contrario, no se observó ningún efecto para App 4074 ni para AP76 manteniendo una producción de vesículas ácidas igual que la producción basal.

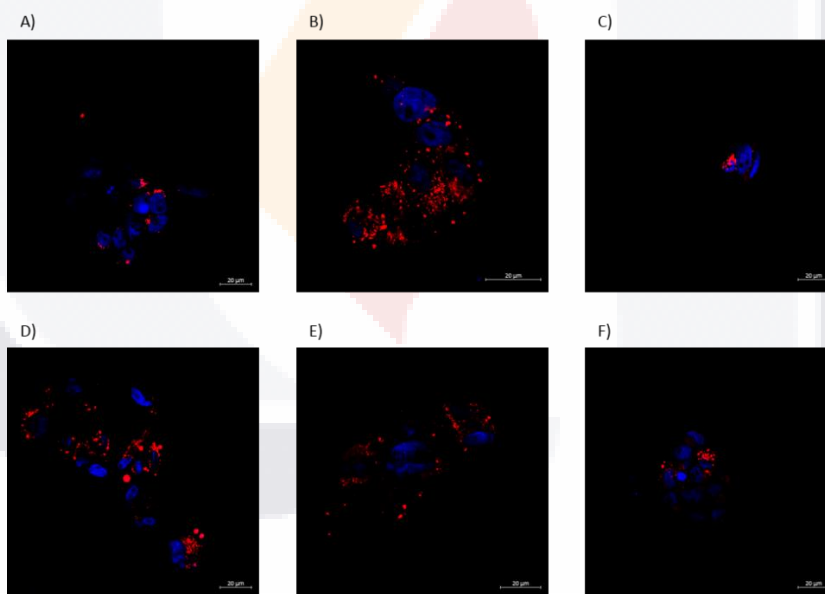


Figura 6. Formación de organelos ácidos después del ensayo de internalización. (A) Células endoteliales sin bacteria, (B) Células endoteliales + *E. coli* B121 pUCmT :: Vat, (C) Células endoteliales + *A. pleuropneumoniae* 4074, (D) Células endoteliales + *A. pleuropneumoniae* JL03, (E) Células endoteliales + *A. pleuropneumoniae* L20, (F) Células endoteliales + *A. pleuropneumoniae* AP76. Las células endoteliales interactuaron con cada cepa bacteriana durante 3 h seguido de marcaje durante 30 min con LysoTracker Deep Red [75 nM]. Se observa un aumento notable de organelos ácidos cuando interactúan con *E. coli* y con *A. pleuropneumoniae* JL03 y L20, pero no hay diferencias notables entre el control negativo y las células que interactúan con *A. pleuropneumoniae* 4074 y AP76.

4. Análisis de Expresión de Serina Proteasa por *A. pleuropneumoniae*

Fue probada la presencia de una proteína con capacidades vacuolizantes en *A. pleuropneumoniae* al presentar un anticuerpo anti la toxina vacuolizante Vat de *E. coli* contra un extracto de proteínas totales de App.

Los resultados de Western blot (figura 7) muestran el reconocimiento de una proteína con el anticuerpo anti la toxina vacuolizante Vat de *E. coli* (100 kDa), en *A. pleuropneumoniae*. Todas las cepas de App presentaron una banda de 100 kDa y otras dos bandas de ~ 50 y 33 kDa. El control negativo (vector vacío de *E. coli* BI21) solo muestra una banda a 37 kDa de QA20 mientras que el control positivo de *E. coli* BI21 (pUCmT :: Vat)

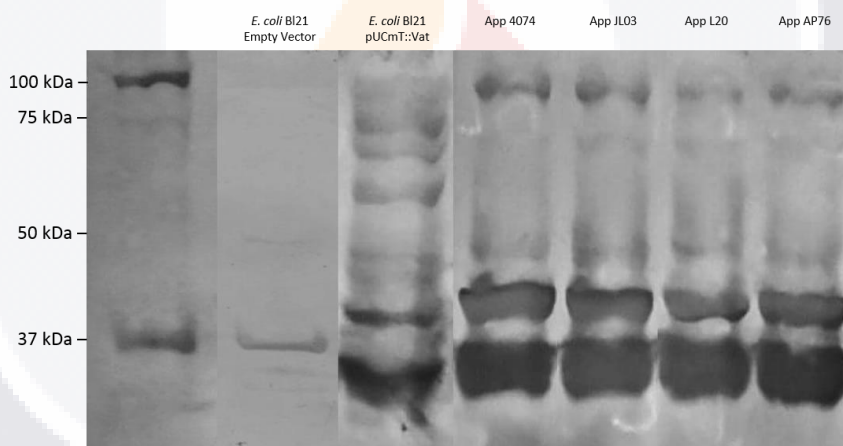


Figura 7. Reconocimiento de proteínas totales de *A. pleuropneumoniae* con anticuerpo anti toxina vacuolizante Vat (100 kDa). (1) Marcador de peso molecular, (2) Proteínas totales de *E. coli* BI21 vector vacío (control negativo), (3) Proteínas totales de *E. coli* BI21 pUCmT :: Vat (control positivo), (4) Proteínas totales *A. pleuropneumoniae* 4074, (5) Proteínas totales *A. pleuropneumoniae* JL03, (6) Proteínas totales *A. pleuropneumoniae* L20 , (7) Proteínas totales *A. pleuropneumoniae* AP76. Todas las muestras de la *A. pleuropneumoniae* muestran una banda a 100 kDa, una entre 52 y 37 kDa y otra entre 37 y 25 kDa. El control positivo muestra las mismas bandas que *A. pleuropneumoniae*, mientras que el control negativo solo tiene una banda a 37 kDa.

DISCUSIÓN

En la industria porcina, los patógenos y las enfermedades involucradas en el llamado complejo de enfermedades respiratorias porcinas generan grandes pérdidas económicas debido a los altos niveles de morbilidad y mortalidad; sin embargo, es difícil determinar qué patógeno afecta al cerdo debido a la alta similitud en los signos clínicos primarios de las diversas enfermedades del tracto respiratorio que conducen a la ausencia de un tratamiento exclusivo para cada afección, lo que resulta en muchos casos en una administración aleatoria de antibióticos, donde es posible que no mejore la salud del animal. La plena comprensión de la patogénesis bacteriana es notablemente importante para desarrollar tratamientos altamente específicos y efectivos para prevenir el desarrollo de una enfermedad.

A. pleuroneumoniae es uno de los principales patógenos del tracto respiratorio porcino y se ha estudiado ampliamente; sin embargo, se desconocen los mecanismos clave de su patogenia. Esta bacteria es serotipada por moléculas capsulares y la virulencia está dada por las toxinas RTX que produce cada serotipo, siendo los serotipos 1 y 5 los más virulentos y los serotipos 3 y 7, aunque menos virulentos son altamente contagiosos (Hathroubi *et al.*, 2016; Hsu *et al.*, 2016; Sassu *et al.*, 2017b). La plena comprensión de la patogénesis de la pleuroneumonía porcina daría las herramientas para erradicarla.

Los patógenos tienen varios mecanismos para ingresar al huésped, evadir la respuesta inmune de éste y causar la enfermedad, estos se llama factores de virulencia. Para conocer los factores de virulencia y la patogénesis de una bacteria o cualquier otro patógeno es necesario realizar ensayos de interacción huésped-patógeno. Uno de los factores de virulencia presentes en numerosas bacterias es la capacidad de adherirse e internalizar en la célula huésped. Al adherirse, se las arreglan para tomar nutrientes del huésped y dañar desde esa posición; sin embargo, algunas bacterias pueden ingresar a la célula huésped y, por lo tanto,

una vez dentro están protegidas de la respuesta inmune o cualquier antibiótico presente en el torrente sanguíneo. El mecanismo de internalización de algunos patógenos, como el caso de *Shigella flexneri*, está descrito completamente (Philpott *et al.*, 2000); sin embargo, en muchas bacterias se desconoce el mecanismo preciso que usan. En muchos casos, el citoesqueleto desempeña un papel importante en la invasión bacteriana, ya que el citoesqueleto de actina tiene que reorganizarse para formar estructuras similares a pseudopodos para formar la vesícula que permite que el patógeno ingrese al citoplasma del huésped y la tubulina, que está implicada en la distribución citoplasmática, la estructura celular e intercambio las moléculas (Hamer-Barrera *et al.*, 2003; Quinn, 2005; Chiers *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2017).

La invasión de células no fagocíticas a través del reordenamiento del citoesqueleto de actina es un mecanismo de evasión inmune común utilizado por la mayoría de las bacterias intracelulares. Además, algunos patógenos modulan los microtúbulos del huésped y la ruta endocítica como mecanismo de invasión (Sana *et al.*, 2015). Se necesitan más estudios para determinar si *App* utiliza este tipo de mecanismo de invasión para internalizarse en las células endoteliales. Para establecer la infección, las bacterias patógenas deben evadir la respuesta inmune y los mecanismos de defensa del huésped. Esto se logra gracias a la interacción establecida con las células no fagocíticas como las células endoteliales y epiteliales, logrando internalizarse y, en algunos casos, sobrevivir y replicarse. Para ser fagocitadas por estos tipos de células, las bacterias usan diferentes mecanismos que les permiten adherirse e internalizarse, causando en la mayoría de los casos un reordenamiento en el citoesqueleto de actina y la formación de pseudopodos que promueven la absorción de bacterias adherentes. A su vez, algunos patógenos modulan la función de los microtúbulos para ingresar a la célula huésped; sin embargo, el mecanismo aún no se comprende completamente.

Debido a la gran cantidad de especies de bacterias patógenas que utilizan el citoesqueleto como una forma de internalizarse mediante una amplia variedad de mecanismos, ello indica que este organelo tiene un papel fundamental en el proceso de infección (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006; Sana *et al.*, 2015). Por lo tanto, cuando se estudia el mecanismo de internalización de un patógeno, el papel del citoesqueleto de actina y tubulina en el proceso es analizado. *A. pleuropneumoniae* es miembro de la familia Pasteurellaceae, que también incluye la bacteria Gram-negativa *H. influenzae*, que coloniza el tracto respiratorio superior humano y causa infección del oído medio, sinusitis, conjuntivitis, bronquitis crónica, bronquiectasias, fibrosis quística y neumonía. *H. influenzae* se adhiere al moco epitelial respiratorio y provoca el reordenamiento del citoesqueleto de la célula huésped formando lamelipodios que rodean a las bacterias adherentes formando una vacuola unida a la membrana; la invasión es inhibida por la citocalasina D (disruptor de la polimerización de actina). Sin embargo, la micropinocitosis puede ser la vía de invasión predominante para este patógeno (St Geme, 2002). *A. pleuropneumoniae* se considera un patógeno exclusivamente extracelular que puede adherirse a la célula huésped (Auger *et al.*, 2009; Bercier *et al.*, 2019). Su interacción con células epiteliales y macrófagos alveolares (PAM) ha sido ampliamente estudiada, pero la información sobre su relación con el endotelio es escasa.

Como mencionaron Lubkin y Torres (2017), las bacterias patógenas usan el torrente sanguíneo como medio de transporte a través del cuerpo, de modo que en algún momento entran en contacto con el endotelio, siendo a veces el objetivo de agentes infecciosos como virus y bacterias (Valbuena & Walker 2006). El endotelio pulmonar está compuesto por una monocapa de células endoteliales escamosas que modulan procesos importantes de la homeostasis pulmonar, como el intercambio de gases, el tono vascular y la coagulación. También, gracias a las uniones intercelulares hechas por el citoesqueleto de actina y los microtúbulos, las células endoteliales tienen una función de barrera. Es de gran importancia en la infección por patógenos que utilizan diversos mecanismos para romper la

integridad de la barrera al debilitar el citoesqueleto y romper las articulaciones entre las células endoteliales, lo que provoca la formación de espacios entre ellas que aumentan la permeabilidad pulmonar (Millar *et al.*, 2016; Lubkin & Torres, 2017). El tejido endotelial pulmonar desempeña un papel importante en el mantenimiento de la función adecuada del pulmón. Responde a varios estímulos físicos, químicos y mecánicos ambientales extracelulares, desencadenando una serie de señales que permiten mantener la homeostasis de los órganos y tejidos del cuerpo (Huertas *et al.*, 2018). Si las células endoteliales están expuestas a factores ambientales adversos, como la inhalación de gases y humos tóxicos (al fumar), altitudes altas, el establecimiento de una respuesta inmune exacerbada por la presencia de cualquier patógeno o el ataque directo de este patógeno y presentando una predisposición genética (Weidensdorfer *et al.*, 2015), el tejido endotelial sufre daños que alteran su función, lo que lleva al desarrollo de varios trastornos pulmonares agudos y crónicos como el enfisema, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la hipertensión pulmonar y la neumonía, por nombrar algunos (González y Verin, 2018 ; Huertas *et al.*, 2018). Debido a la notable alteración de la función de las células endoteliales, causada por el efecto de patógenos bacterianos, desencadenando patologías pulmonares graves, estudiar la implicación de *A. pleuropneumoniae* con el endotelio es crucial para ayudar a dilucidar la patogénesis de este patógeno respiratorio del cerdo.

Como se muestra en los resultados, App puede adherirse a las células endoteliales siendo la cepa 4074 del serotipo 1 la que tiene mayor adherencia. En un ensayo con células epiteliales descrito por Auger *et al.* (2009) se observó un comportamiento similar al nuestro, donde la cepa 4074 tiene mayores niveles de adhesión a las células epiteliales que la cepa L20. Las cepas JL03 y AP76 muestran un comportamiento lineal en el que la adhesión aumenta con el tiempo; sin embargo, con las cepas 4074 y L20, los niveles de adhesión varían. Es probable que este fenómeno particular se deba a una adhesión débil al endotelio o que la bacteria ingrese y salga constantemente de la célula endotelial; como mencionan Ribet y Cossart (2015), "la adhesión de bacterias a las superficies del

huésped es un aspecto crucial de la colonización del huésped" y tal comportamiento podría permitirles colonizar rápidamente el organismo. Se eligió tejido endotelial para este trabajo ya que en un trabajo anterior realizado por nuestro grupo se observó, a través de cortes histológicos, que el endotelio era uno de los tejidos que mostraban mayor daño en muestras de pulmón post-mortem de cerdos con pleuroneumonía porcina (datos no publicados). App puede hacer uso de este tejido para inducir la producción de ROS como parte de la respuesta inmune del huésped iniciada por la señalización del tejido endotelial, dañando así las células del huésped por la presencia de ROS, contra la cual la bacteria está protegida con la enzima superóxido dismutasa. Además, debido a su relación intrínseca como barrera de intercambio de material una vez que la bacteria ha podido ingresar a la célula endotelial, tiene un pase libre para colonizar todo el organismo (Langford *et al.*, 1996; Sheehan *et al.*, 2000; Bossé *et al.*, 2002; Michiels, 2003; Rajendran *et al.*, 2013).

Como se sabe, App puede permanecer en otros tejidos y órganos de cerdos asintomáticos, como las amígdalas, mostrando un comportamiento similar a otros patógenos intracelulares que se esconden dentro de la célula huésped para evadir la respuesta inmune o la presencia de antibióticos y persiste en el interior hasta que el ambiente exterior se vuelve menos hostil causando la sintomatología de la enfermedad nuevamente (Kalita *et al.*, 2015). Esto ya muestra un comportamiento de App propio de un patógeno intracelular, también en un estudio publicado por Bercier *et al.* (2019) demostraron que App puede translocarse en la monocapa de células traqueales al ver cómo App logra atravesar la membrana de un sistema de transwell para llegar a la monocapa celular al verificar su capacidad de penetrar una barrera celular y así infringir su capacidad de invasión.

Siguiendo los resultados del ensayo de internalización, se demuestra que las cepas 4074, JL03, L20 y AP76 pueden invadir las células endoteliales, sin embargo, las tasas de invasión son muy bajas, lo que demuestra que son necesarias pocas UFC para causar la enfermedad, sin embargo, esto puede

deberse a que como se mencionó antes en la literatura, es esencial que App lise la célula huésped para obtener nutrientes de ella, por lo que utiliza los diversos factores de virulencia que tiene para realizar esta acción y recurre a su capacidad de invasión de una manera menor (Chiers *et al.*, 2010). En el caso particular de la cepa JL03, ésta no tiene altos niveles de adhesión, pero muestra la tasa de invasión más alta de las cuatro cepas utilizadas en este trabajo. Esto podría significar que incluso cuando su adhesión puede no ser fuerte, su mecanismo de invasión es altamente efectivo, lo que permite que no se detecte y se difunda fácilmente.

Como se mencionó las bacterias capaces de invadir causan un estímulo al huésped que genera un reordenamiento del citoesqueleto resultando en un proceso semejante a la fagocitosis realizado por la célula huésped no fagocítica para internalizar a la bacteria. Por lo tanto, una vez verificada la capacidad de internalización de App por el conteo de UFC (Kuehn & Kesty, 2005; Auger *et al.*, 2009; Chiers *et al.*, 2010; Letourneau *et al.*, 2011), se realizaron experimentos para analizar la posible participación del citoesqueleto de actina y tubulina en este proceso mediante microscopía confocal. Incluso cuando se observa una interacción de la bacteria con ambas proteínas del citoesqueleto a través de co-localización, no encontramos un reordenamiento visible de ninguno de estas dos proteínas, además al momento de usar medicamentos capaces de inhibir la polimerización de estos, y por lo tanto perder su función, la bacteria continuó entrando en la célula endotelial, de lo que se infiere que tanto el citoesqueleto de actina como el citoesqueleto de tubulina no son indispensables para la internalización de App, sin embargo, es posible que la bacteria posea varios mecanismos de internalización y en algunos de ellos si utilice el citoesqueleto para ingresar al huésped. Se sospecha que esta es una posibilidad debido a que en las figuras 2 y 3 se observan zonas redondas similares a las vesículas que indican una posible forma de internalización de las bacterias a través de ellas o que son utilizadas por la bacteria como método de transporte dentro del huésped. Su presencia también indica una posible capacidad de vacuolización por parte de App

o la probable formación de una estructura lisosómica por parte de la célula endotelial para tratar de eliminar el patógeno internalizado. Incluso cuando se desconoce la verdadera naturaleza de las estructuras intracitoplasmáticas mencionadas anteriormente, similares a las vesículas, confirman la presencia de App dentro del citoplasma endotelial.

Los resultados se compararon usando como control positivo *E. coli* BI21 pUCmT::Vat, una mutante que sobreexpresa la toxina vacuolizante Vat la cual es caracterizada por inducir la formación de vacuolas y cambios en la permeabilidad en las células epiteliales (Díaz *et al.*, 2020). El aumento en el número de organelos ácidos en la CE que interactuaron con App implica la función de vacuolización de esta, lo que lleva a pensar en una proteína probable similar a Vat, presente en App. El anticuerpo policlonal contra las toxinas Vat SPATE muestra afinidad por el extracto de proteínas de App, lo que indica el reconocimiento de los epítomos conservados de SPATE (Pokharel *et al.*, 2020). Los resultados de Western blot mostraron una banda de aproximadamente 100 kDa, presumiblemente la proteína autotransportadora AasP similar a la subtisilina de App (104 kDa) que tiene homología con el sitio de unión de las proteínas autotransportadoras de *E. coli* (Baltes *et al.*, 2007). Las proteínas autotransportadoras que contienen un motivo de serina proteasa están involucradas en diversas funciones como adhesión, colonización, invasión de células huésped, formación de biopelículas y toxicidad. La proteína AasP expresada universalmente en App es autocatalítica y tiene una función de proteasa de maduración. Muestra homología con autotransportadores de superficie de diversos patógenos bacterianos que incluyen *Mannheimia haemolytica*, *Bordetella pertussis* y *Neisseria meningitidis*; sugiriendo un posible papel en la adhesión, colonización, internalización y persistencia en App (Baltes *et al.*, 2007, Ali *et al.*, 2008), aunque el antígeno AasP recombinante no afectó la virulencia de App y no protegió a los cerdos de la colonización e infección por App (Oldfield *et al.*, 2009). Las otras dos bandas reconocidas por el anticuerpo anti-Vat posiblemente indican la expresión de más de un autotransportador de serina proteasa o la presencia de OmlA que madura y libera en presencia de AasP y se

ve en los geles de SDS-PAGE como una banda de 50 kDa y una banda de 33 kDa (Ali *et al.*, 2008). Aún no se ha determinado si la proteína Aasp es responsable de inducir la formación de vacuolas o si tiene un papel activo en la invasión de App.

Incluso cuando se desconoce la verdadera naturaleza de las estructuras intracitoplasmáticas similares a las vesículas mencionadas anteriormente, estas confirman la presencia de App dentro del citoplasma endotelial. Se deben realizar más investigaciones para dilucidar la verdadera naturaleza de estas estructuras.

Los resultados muestran a las cuatro cepas dentro del huésped principalmente en la región perinuclear y formando grumos; este comportamiento se observa en otras bacterias intracelulares como *Bartonella henselae* cuando invaden células endoteliales humanas (Verma *et al.*, 2000) la razón por la cual algunas bacterias intracelulares presentan un reordenamiento en cúmulos es actualmente desconocida, pero puede ser atribuida a una invasión y transporte modulado por microtúbulos, indicando un rol fundamental de este organelo en el proceso de infección (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2006; Sana *et al.*, 2015). Aunque es un nicho intracelular habitual, muchos patógenos intracelulares se encuentran en el espacio perinuclear, se ha planteado la hipótesis de que algunas bacterias intranucleares causan efectos benéficos para sus huéspedes, sin embargo, al ser una bacteria patógena, este no parece ser el caso de *A. pleuropneumoniae*, quienes con mayor precisión podrían estar usando esta área para satisfacer los requerimientos nutricionales e impactar los procesos nucleares (Verma *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2015). Las Figuras 2, 3 y 4 muestran en muchas áreas núcleos alargados en las células endoteliales cuando se produce la interacción con App, este fenómeno se ha informado previamente en la apoptosis de PAM inducida por App (Wang *et al.*, 2016) que muestra un objetivo intracelular claro y sugiriendo que App interactúa con ellos causando cambios morfológicos.

Dado que los patógenos intracelulares explotan las vías de señalización de la célula huésped para facilitar su absorción y supervivencia dentro de las células huésped (Pierini *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2015) y el citoesqueleto no parece tener

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un papel clave en la internalización de App; se analizó la posibilidad de que las bacterias ingresen al huésped a través de algún otro tipo de mecanismo. Por lo tanto, se estudió la participación de otros organelos celulares con la función de transporte de sustancias.

En casos como los reportados para las bacterias *Salmonella* alcanzan el área perinuclear e interactúa con las vías de señalización del huésped para llegar al aparato de Golgi donde comienza la replicación bacteriana intracelular (McGhie *et al.*, 2009) En el caso de *Bordetella bacilliformis* si el aparato de Golgi es interrumpido la invasión es disminuida (Verma *et al.*, 2009), mostrando un papel muy importante en estos mecanismos de invasión de bacterias. Como se ve en la figura 4, App continúa observándose dentro de la célula endotelial, en las estructuras similares a las vesículas y en el área perinuclear. La distribución del retículo endoplásmico no se ve perturbada por la presencia de ninguna de las 4 cepas de App, sin embargo, podemos encontrar colocalización en algunas regiones que indican una interacción entre el organelo y la bacteria. El RE es utilizado por las bacterias como un nicho dentro de la célula huésped que asegura la biosíntesis de nutrientes como lípidos, carbohidratos y proteínas y un lugar seguro debido a que el RE no tiene funciones bacterianas, lo que lo convierte en un lugar ideal para nicho intracelularmente (Celli y Tsolis, 2015). En cuanto al aparato de Golgi, la distribución normal está alterada y puede verse en un área perinuclear predominante. Ya sea directa o indirectamente, se genera un claro afecto a estos organelos en presencia intracelular de App. Aun no es conocido cómo interactúa y se relaciona App con los organelos celulares.

CONCLUSIÓN

Muchos organismos de la familia Pasteurellaceae se identifican como invasores patógenos, pero los mecanismos implicados en la invasión no se comprenden completamente.

Con este trabajo afirmamos que *Actinobacillus pleuropneumoniae* es capaz de internalizarse en las células endoteliales y posiblemente podría considerarse como un patógeno intracelular, aun cuando su capacidad de internalización es baja. Esto lleva a modificar la percepción de esta bacteria, los métodos convencionales para su estudio y la forma en que se trata su infección.

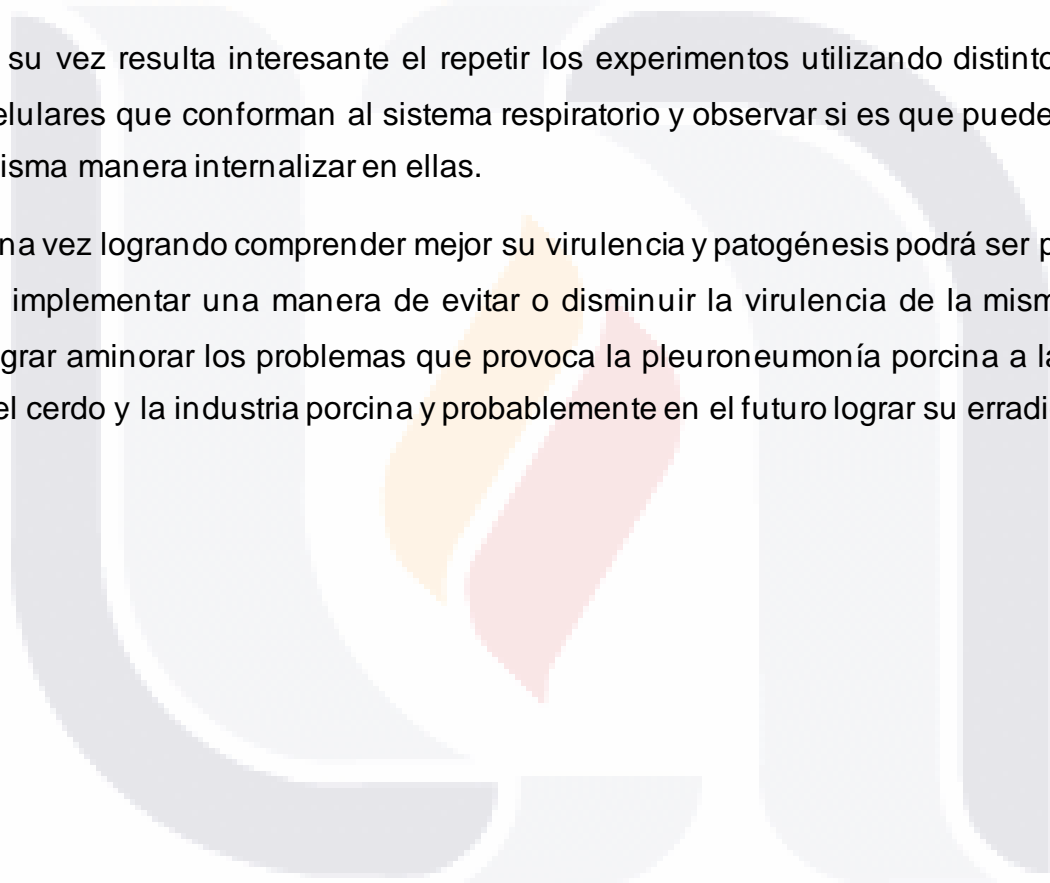
Aunque App se puede encontrar dentro de la célula y haciendo aparentes interacciones con varios organelos, aún se desconoce la ruta o mecanismo específico que utiliza para lograr la invasión. Cabe mencionar que las cepas JL03 y L20 (serotipos 3 y 5b) muestran mayor virulencia frente a CE al presentar los mayores porcentajes de adherencia e internalización y mayor presencia de organelos ácidos tras la infección. App podría poseer factores de virulencia que permitan lograr la invasión a través de la inducción de la autofagia y el transporte a través de vesículas o podría beneficiarse de los mecanismos de intercambio de moléculas celulares, como las involucradas en pinocitosis y la caveolina, como una vía de entrada y salida de la célula huésped (St Geme, 2002). Deben realizarse más experimentos para comprender y dilucidar el mecanismo de invasión de *A. pleuropneumoniae* y probar la supervivencia intracelular. El conocimiento completo de su patogenia ayudará a desarrollar mejores medidas y herramientas de diagnóstico para prevenir brotes de *A. pleuropneumoniae*.

PROYECCIONES A FUTURO

Es necesario el seguir desarrollando el proyecto para así poder conocer y entender más detalladamente los mecanismos de invasión de *A. pleuropneumoniae*. Probando mediante distintos marcajes para desvelar el método exacto por el que la bacteria logra internalizar que puede ser mediante caveolinas o vesículas pinocíticas.

A su vez resulta interesante el repetir los experimentos utilizando distintos tipos celulares que conforman al sistema respiratorio y observar si es que pueden de la misma manera internalizar en ellas.

Una vez logrando comprender mejor su virulencia y patogénesis podrá ser posible el implementar una manera de evitar o disminuir la virulencia de la misma para lograr aminorar los problemas que provoca la pleuroneumonía porcina a la salud del cerdo y la industria porcina y probablemente en el futuro lograr su erradicación.



REFERENCIAS

- Al-Lamki, R. S., Bradley, J. R., & Pober, J. S. (2017). Human Organ Culture: Updating the Approach to Bridge the Gap from In Vitro to In Vivo in Inflammation, Cancer, and Stem Cell Biology. *Frontiers in Medicine*, 4, 148. <http://doi.org/10.3389/fmed.2017.00148>
- Ali T, Oldfield N, Wooldridge K, Turner D, Ala'Aldeen, D. (2008). Functional characterization of aasp, a maturation protease autotransporter protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun*. 76:5608–14. doi: 10.1128/IAI.00085-08
- Alvarez-Fleites, M., Rodríguez-Buenfil, J., Ciprián Carrasco, A., Rodríguez Guzman, L., Ayora Tavera, G. & Segura Correa, J. (2004). Perfil serológico del virus de influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en granjas de Yucatán, México. *Veterinaria México*, 3: 295-305.
- Antenucci, F., Fougeroux, C., Deeney, A., Ø rskov, C., Rycroft, A., Holst, P., and Bojesen, A. (2018). In vivo testing of novel vaccine prototypes against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research*, 49:1. doi.org/10.1186/s13567-017-0502-x.
- Asano, K., Sashinami, H., Osanai, A., Hirose, S., Ono, K., Hu, D. & Nakane, A. (2016). Passive immunization with anti-ActA and anti-listeriolysin O antibodies protects against *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Scientific Reports*. 6:39628.
- Auger, E., Deslandes, V., Ramjeet, M., Contreras, I., Nash, J. H. E., Harel, J., . . . Jacques, M. (2009). Host-Pathogen Interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with Porcine Lung and Tracheal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 77(4), 1426-1441. doi:10.1128/iai.00297-08

- Avadhanula, V., Rodriguez, C. A., Devincenzo, J. P., Wang, Y., Webby, R. J., Ulett, G. C., & Adderson, E. E. (2006). Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. *Journal of virology*, 80(4), 1629–1636. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.4.1629-1636.2006>
- Baltes N, Buettner F, Gerlach G. (2007). Selective capture of transcribed sequences (scots) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the chronic stage of disease reveals an hlyx-regulated autotransporter protein. *Vet Microbiol.* 123:110–21. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.026
- Bercier, P., Gottschalk, M., Grenier, D. (2019). Effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on barrier function and inflammatory response of pig tracheal epithelial cells. *Pathogens and Disease*, 77. doi: 10.1093/femspd/fty079.
- Bossé, J., Janson, H., Sheehan, B., Beddek, A., Rycroft, A., Simon Kroll, J., and Langford, P. (2002). *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection*, 4:2, 225-235. doi:10.1016/s1286-4579(01)01534-9.
- Bossé, J., Li, Y., Sárközi, R., Fodor, L., Lacouture, S., Gottschalk, M., Casas Amoribieta, M., Angen, Ø., Nedbalcova, K., and Holden, M. *et al.* (2018). Proposal of serovars 17 and 18 of *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on serological and genotypic analysis. *Veterinary Microbiology*, 1-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.02.019.
- Brogaard, L., Klitgaard, K., Heegaard, P., Hansen, M., Jensen, T., and Skovgaard, K. (2015). Concurrent host-pathogen gene expression in the lungs of pigs challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC Genomics*, 16, 417. doi: 10.1186/s12864-015-1557-6.
- Burciaga-Nava, J. (2008). Interacción in vitro de *Actinobacillus pleuropneumoniae* con células endoteliales de aorta de cerdo (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.

- Burciaga-Nava, J. A., Reyes-Romero, M. A., Guerrero-barrera, A. L., and Avelar-González, F. J. (2009). Establishment and characterization of porcine aortic endothelial cell cultures with prolonged replicative lifespan by a non-enzymatic method. doi:10.1007/s11626-008-9146-5.
- Burns, J., Jonas, M., Chi, E., Clark, D., Berger, A., and Griffith, A. (1996). Invasion of Respiratory Epithelial Cells by *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*. *Infection and immunity* 64, 4054-4059. doi:10.1128/iai.64.10.4054-4059.1996.
- Celli, J., Tsolis, R. (2015). Bacteria, the ER and the Unfolded Protein Response: Friends or Foes? *Nat Rev Microbiol.*, 13:2, 71-82. doi:10.1038/nrmicro3393.
- Cheng Y, Kuo C, Lu S, Hiroko O, Wu Y, Hsieh C, et al. (2019) Group a *streptococcus* induces liposomes via SLO/b1 Integrin/NOX2/ROS pathway in endothelial cells that are ineffective in bacterial killing and suppress xenophagy. *mBio*. 10:e02148–19. doi: 10.1128/mBio.02148-19
- Chiers, K., De Waele, T., Pamas, F., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F. (2010). Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet. Res.*, 41:65. Doi:10.1051/vetres/2010037.
- Choi, S., Maeng, Y., Kim, T., Lee, Y., Kim, Y., and Kim, E. (2015). Lysosomal Trafficking of TGFβ1p via Caveolae-Mediated Endocytosis. *PLoS ONE*, 10, e0119561. doi: 10.1371/journal.pone.0119561.
- Edwards, A. M., and Massey, R. C. (2011). Invasion of human cells by a bacterial pathogen. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 49, 2693. doi: 10.3791/2693.
- Cossart, P., Boquet, P., Normark, S. & Rappouli, R. (2005). *Cellular Microbiology*. (2nd ed.). ASSA Press. USA. pp. 87-137.

- Cuccui, J., Terra, V., Bossé, J., Naegeli, A., Abouelhadid, S., Li, Y., . . . , Wren, B. (2017). The N-linking glycosylation system from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is required for adhesion and has potential use in glycoengineering. *Open Biol*, 7:160212.
- Diarra, M. S., Dolence, J. A., Dolence, E. K., Darwish, I., Miller, M. J., Malouin, F., & Jacques, M. (1996). Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 853-859.
- Díaz J, Dozois C, Avelar-González F, Hernández-Cuellar E, Pokharel P, de Santiago A, et al. (2020). The vacuolating autotransporter toxin (vat) of *Escherichia coli* causes cell cytoskeleton changes and produces non-lysosomal vacuole formation in bladder epithelial cells. *Front Cell Infect Microbiol*. 10:299. doi: 10.3389/fcimb.2020.00299
- Dreyfus, A., Schaller, A., Nivollet, S., Segers, R., Kobisch, M., Mieli, L., Soerensen, V., Hüssy, D., Miserez, R., and Zimmermann, W. et al. (2004). Use of Recombinant ApxIV in Serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Infections, Development and Prevalidation of the ApxIV ELISA. *Veterinary Microbiology* 99, 227-238. doi:10.1016/j.vetmic.2004.01.004.
- Drexler, H. G., & Uphoff, C. C. (2002). Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39(2), 75–90. <http://doi.org/10.1023/A:1022913015916>
- Enriquez-Verdugo, I., Guerrero, A. L., Serrano, J. J., Godinez, D., Rosales, J. L., Tenorio, V., & de la Garza, M. (2004). Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. *Microbiology-Sgm*, 150, 2391-2400. doi:10.1099/mic.0.27053-0
- Féletou M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011. Chapter 1, Introduction. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57145/>

- Fenwick, B., & Henry, S. (1994). PORCINE PLEUROPNEUMONIA. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(9), 1334-1340.
- Ferreira, J., Labrie, J., Beaudry, F., Gagnon, C., Jacques, M. (2015). *Actinobacillus pleuropneumoniae* induces SJPL cell cycle arrest in G2/M-phase and inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication. *Virology Journal*, 12:188.
- Fittipaldi, N., Klopfenstein, C., Gottschalk, M., Broes, A., Paradis, M. A., & Dick, C. P. (2005). Assessment of the efficacy of tilmicosin phosphate to eliminate *Actinobacillus pleuropneumoniae* from carrier pigs. *Journal of Swine Health and Production*, 69(2), 146-150.
- Frey J. (2003). Detection, Identification, and Subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *PCR Detection of Microbial Pathogens. Methods in Molecular Biology*, 216, 87-95. doi: 10.1385/1-59259-344-5:87.
- Frey J. (2008). Detection, Identification, and Subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Methods in Molecular Biology*. 216: 87-95.
- Frömmel, U., Lehmann, W., Rödiger, S., Böhm, A., Nitschke, J., Weinreich, J., . . . , Schierack, P. (2013). Adhesion of Human and Animal *Escherichia coli* Strains in Association with Their Virulence-Associated Genes and Phylogenetic Origins. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19): 5814-5829.
- Gao, M., Wu, S., Ji, J. Zhang, J., Liu, Q., Yue, Y., Liu, L., Liu, X., and Liu, W. (2017) The influence of actin depolymerization induced by Cytochalasin D and mechanical stretch on interleukin-8 expression and JNK phosphorylation levels in human retinal pigment epithelial cells. *BMC Ophthalmol* 17, 43. doi: 10.1186/s12886-017-0437-z.
- Gama, M. (2004). *Biología: Biogénesis y microorganismos*. (2.a ed.). PEARSON. México. pp. 26.

- Gonzales, J., and Verin, A. (2020). Pulmonary Vascular Endothelial Cells. doi:10.5772/intechopen.76995.
- Haesebrouck, F., Chiers, K., Van Overbeke, I., Ducatelle, R. (1997). *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Veterinary Microbiology*, 58, 239-249.
- Hamad, M. A., Skeldon, A. M., and Valvano, M. A. (2010). Construction of aminoglycoside-sensitive *Burkholderia cenocepacia* strains for use in studies of intracellular bacteria with the gentamicin protection assay. *Applied and environmental microbiology*, 76:10, 3170–3176. doi: 10.1128/AEM.03024-09.
- Hammer-Barrera, R., Godínez, D., Enríquez, I., Vaca-Pacheco, S., Martínez-Zúñiga, R., Talamás-Rohana, P., Suárez-Güemez, F., de la Garza, M. (2003). Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 68:33-41.
- Hansen, N., Hansen, A., Sams, A. (2017). The Endothelial Border to Health: Mechanistic Evidence of the Hyperglycemic Culprit of Inflammatory Disease Acceleration. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 69(3), 148-161.
- Hathroubi, S., Beaudry, F., Provost, C., Martelet, L., Segura, M., Gagnon, C., Jaques, M. (2016). Impact of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm mode of growth on the lipid A structures and stimulation of immune cells. *Innate Immunity*, 22(5), 353-362.
- Hoeltig, D., Rohde, J., Frase, R., Nietfeld, F., Waldmann, K., Valentin-Weigand, P., and Meens, J. (2018). Multi-organ spreading of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 in weaned pigs during the first week after experimental infection. *Veterinary research*, 49(1), 97. doi: 10.1186/s13567-018-0592-0.
- Hsu, C., Li, S., Chang, N., Chen, Z., Liao, J, Chen, T., Wang, J., Lin, J., Hsuan, S. (2016). Involvement of Nf-κB in regulation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* exotoxin

Apxl-induced proinflammatory cytokine production in porcine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology*, 195, 128-135.

Huertas, A., Guignabert, C., Barberà, J., Bärtsch, P., Bhattacharya, J., Bhattacharya, S., Bonsignore, M., Dewachter, L., Dinh-Xuan, A., and Dorfmueller, P. *et al.* (2018). Pulmonary vascular endothelium: the orchestra conductor in respiratory diseases. *European Respiratory Journal* 51, 1700745. doi:10.1183/13993003.00745-2017.

Jamur, M.C., and Oliver, C. (2010) Permeabilization of Cell Membranes. *Immunocytochemical Methods and Protocols*, 588, 63-66. doi:10.1007/978-1-59745-324-0_9.

Jarma, E., Corradino, G., & Regassa, L. B. (2004). Anaerobiosis, growth phase and *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin production. *Microbial Pathogenesis*, 37(1), 29-33. doi:10.1016/j.micpath.2004.04.004

Jessing, S. G., Angen, O., & Inzana, T. J. (2003). Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5, and 6. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4095-4100. doi:10.1128/jcm.41.9.4095-4100.2003

Kalita, A., Hu, J., and Torres, A. G. (2014). Recent advances in adherence and invasion of pathogenic *Escherichia coli*. *Current opinion in infectious diseases*, 27(5), 459–464. doi:10.1097/QCO.0000000000000092

Knudsen, L., and Ochs, M. (2018). The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochemistry and Cell Biology* 150, 661-676. doi:10.1007/s00418-018-1747-9.

Kuehn, M. & Kesty, N. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & Development*, 19, 2645-2655.

- Langford, P., Loynds, B., and Kroll, S. (1996). Cloning and Molecular Characterization of Cu,Zn Superoxide Dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*, 64(12): 5035-5041. doi:10.1128/iai.64.12.5035-5041.1996.
- Lemichez, E., Lecuit, M., Nassif, X., and Bourdoulous, S. (2009). Breaking the wall: targeting of the endothelium by pathogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 8, 93-104. doi:10.1038/nrmicro2269.
- Ledur, P. F., Onzi, G. R., Zong, H., & Lenz, G. (2017). Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? *Oncotarget*, 8(40), 69185–69197. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.20193>
- Letourneau, J., Lévesque, C., Berthiaume, F., Mourez, M., Jacques, M. (2011). In Vitro Assay of Bacterial Adhesion onto Mammalian Epithelial Cells. *Journal of Visualized Experiments* 51(51). doi: 10.3791/2783
- Lévesque, C., Provost, C., Labrie, J., Hernandez-Reyes, Y., Burciaga-Nava, J., Gagnon, C., Jacques, M. (2014). *Actinobacillus pleuropneumoniae* Possesses an Antiviral Activity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Plos One*, 9(5).
- Li, L., Chen, Z. H., Bei, W. C., Su, Z. P., Huang, Q., Zhang, L., . . . Zhou, R. (2015). Catecholamines Promote *Actinobacillus pleuropneumoniae* Growth by Regulating Iron Metabolism. *Plos One*, 10(4). doi:10.1371/journal.pone.0121887
- Li, Y., Cao, S., Zhang, L., Lau, G., Wen, Y., Wu, R, Zhao, Q., Huang, X., Yan, Q., Huang, Y., Wen, X. (2016) A TolC-Like Protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Is Involved in Antibiotic Resistance and Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*, 7:1618.
- Loera-Muro, A., Avelar-González, F. J., Loera-Muro, V. M., Jacques, M., & Guerrero-Barrera, A. L. (2013). Presence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in upper respiratory tract of swine in farms from

Aguascalientes, Mexico³, 132-137. Retrieved from
doi:<http://dx.doi.org/10.4236/ojas.2013.32020>

Loera-Muro, V. M., Loera-Muro, A., Morfín-Mata, M., Jacques, M., Avelar-González, F. J., Ramírez-Castillo, F., . . . Guerrero-Barrera, A. L. (2014). Porcine Respiratory Pathogens in Swine Farms Environment in Mexico 4, 196-205. Retrieved from
doi:<http://dx.doi.org/10.4236/ojas.2014.44025>

McGhie, E., Brawn, L., Hume, P., Humphreys, D., and Koronakis, V. (2009). Salmonella takes control: effector-driven manipulation of the host. *Current Opinion in Microbiology* 12, 117-124. doi:10.1016/j.mib.2008.12.001.

Mammadzada, P., Gudmundsson, J., Kvanta, A., and Andre, H. (2016). Differential hypoxic response of human choroidal and retinal endothelial cells proposes tissue heterogeneity of ocular angiogenesis. *Acta Ophthalmologica*, 94(S256). doi:10.1111/j.1755-0399.

Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *Journal of cellular physiology*, 196, 430-443. doi: 10.1002/jcp.10333

Millar, F. R., Summers, C., Griffiths, M. J., Toshner, M. R., and Proudfoot, A. G. (2016). The pulmonary endothelium in acute respiratory distress syndrome: insights and therapeutic opportunities. *Thorax*, 71(5), 462–473. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-207461.

Ofek, I., Hasty, D. & Doyle, R. (2003). *Bacterial Adhesion to Animal Cells and Tissues*. ASM Press. USA. pp. 113-126.

Ojha, S., Lacouture, S., Gottschalk, M., and MacInnes, J. (2010). Characterization of Colonization-deficient Mutants of *Actinobacillus suis*. *Veterinary Microbiology* 140, 122-130. doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.014.

Oldfield N, Worrall K, Rycroft A, Ali T, Wooldridge K, Ala'Aldeen, et al. (2009). Aasp autotransporter protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* does not protect pigs

against homologous challenge. *Vaccine*. 27:5278–83. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.06.047

Paradis, M. A., Vessie, G. H., Merrill, J. K., Dick, C. P., Moore, C., Charbonneau, G., . . . Wilson, J. B. (2004). Efficacy of tilmicosin in the control of experimentally induced *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 68(1), 7-11.

Pereira, P., Fernanez, L., de Souza, G., Heinemann, M., Romero, E., Nascimento, A. (2017). Multifunctional and Redundant Roles of *Leptospira interrogans* Proteins in Bacterial-Adhesion and fibrin clotting inhibition. *Int J Med Microbiol*. pii: S1438-4221(16)30439-8. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.05.006.

Perry, M., Altman, E., Brisson, J., Beynon, L., and Richards, J. (1990). Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease* 4, 299-308. doi:10.1016/0888-0786(90)90018-j

Pizarro-Cerdá J, Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. 124:715–27. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.012

Pokharel P, Díaz J, Bessaiah H, Houle S, Guerrero-Barrera A, Dozois C. (2020). The serine protease autotransporters tagb, tagc, and sha from extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* are internalized by human bladder epithelial cells and cause actin cytoskeletal disruption. *Int J Mol Sci*. 21:3047. doi: 10.3390/ijms21093047

Quinn F. (2005). *Cellular Microbiology*, 2nd ed. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1330. doi:10.3201/eid1108.050592

Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., and Nishigaki, I. (2013). The vascular endothelium and human diseases. *International journal of biological sciences*, 9(10), 1057–1069. doi: 10.7150/ijbs.7502

- Ribet, D., and Cossart, P. (2015). How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection*, 17(3): 173-183. doi:10.1016/j.micinf.2015.01.004.
- Risinger, A. L., Westbrook, C. D., Encinas, A., Mülbaier, M., Schultes, C. M., Wawro, S., Lewis, J. D., Janssen, B., Giles, F. J., & Mooberry, S. L. (2011). ELR510444, a novel microtubule disruptor with multiple mechanisms of action. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 336(3), 652–660. doi:10.1124/jpet.110.175331
- Sadilkova, L., Nepereny, J., Vrzal, V., Sebo, P., & Osicka, R. (2012). Type IV fimbrial subunit protein ApfA contributes to protection against porcine pleuropneumonia. *Veterinary Research*, 43. doi:10.1186/1297-9716-43-2.
- Salo, J., Pietikäinen, A., Söderström, M., Auvinen, K., Salmi, M., Ebady, R., Moriarty, T., Viljanen, M., and Hytönen, J. (2016). Flow-Tolerant Adhesion of a Bacterial Pathogen to Human Endothelial Cells Through Interaction with Biglycan. *Journal of Infectious Diseases* 213, 1623-1631. doi:10.1093/infdis/jiw003.
- Sana, T., Baumann, C., Merdes, A., Soscia, C., Rattei, T., Hachani, A., Jones, C., Bennett, K., Filloux, A., and Superti-Furga, G. *et al.* (2015). Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network. *mBio* 6. doi:10.1128/mbio.00712-15.
- Sassu, E., Bossé, J., Tobias, T., Gottschalk, M., Langford, P., and Henning-Pauka, I. (2017a). Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*—knowledge, gaps and challenges. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 72-90. doi: 10.1111/tbed.12739.
- Sassu, E., Ladinig, A., Talker, S., Stadler, M., Knecht, C., Stein, H., . . . Gerner, W. (2017b). Frequency of Th17 cells correlates with the presence of lung lesions in pigs chronically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Res* 48:4.

- Schulz, F., Tymł, T., Pizzeti, L., Dyková, I., Fazi, S., Kostka, M., and Horn, M. (2015). Marine amoebae with cytoplasmic and perinuclear symbionts deeply branching in the Gammaproteobacteria. *Scientific Reports*, 5. doi:10.1038/srep13381.
- Sechi, A., Wehland, J. & Small, V. (1997). The Isolated Comet Tail Pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: A Tail of Two Actin Filament Populations, Long and Axial and Short and Random. *The Journal of Cell Biology*. 137(1),155-167.
- Sheehan, B. J., Langford, P. R., Rycroft, A. N., and Kroll, J. S. (2000). [Cu,Zn]-Superoxide dismutase mutants of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* are unattenuated in infections of the natural host. *Infection and immunity*, 68(8), 4778–4781. doi:10.1128/iai.68.8.4778-4781.2000.
- St Geme, J. (2002). Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. *Cellular Microbiology* 4, 191-200. doi:10.1046/j.1462-5822.2002.00180.x.
- Tilney, L., DeRosier, D., and Tilney, M. (1992). How *Listeria* Exploits Host Cell Actin to Form Its Own Cytoskeleton. I. Formation of a Tail and How That Tail Might Be Involved in Movement. *The Journal of Cell Biology*, 118(1),71-81. doi:10.1083/jcb.118.1.71.
- Valbuena, G., and Walker, D. H. (2006). The endothelium as a target for infections. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1, 171–198. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100031.
- Verma, A., Davis, G., Ihler, G. (2000). Infection of Human Endothelial Cells with *Bartonella bacilliformis* is Dependent on Rho and Results in Activation of Rho. *American Society for Microbiology*, 68, 10.
- Yang, X., Si, R., Liang, Y., Ma, B., Jiang, Z., Wang, B., and Gao, P. (2016). Mir-30d increases intracellular survival of *Helicobacter pylori* through inhibition of autophagy pathway. *World Journal of Gastroenterology*, 22(15), 3978-3991. doi: 10.3748/wjg.v22.i15.3978

- Wang, L., Qin, W., Zhang, J., Bao, C., Zhang, H., Che, Y., Sun, C., Gu, J., Feng, X., and Du, C. et al. (2016). Adh enhances *Actinobacillus pleuropneumoniae* Pathogenicity by Binding to OR5M11 and Activating p38 Which Induces Apoptosis of PAMs and IL-8 Release. *Scientific Reports* 6. doi:10.1038/srep24058.
- Weber, A., Iturri, J., Benitez, R., Zemljic-Jokhadar, S., and Toca-Herrera, J. (2019). Microtubule disruption changes endothelial cell mechanics and adhesion. *Scientific Reports* 9. doi:10.1038/s41598-019-51024-z.
- Weidensdorfer, M., Chae, J., Makobe, C., Stahl, J., Averhoff, B., Müller, V., Schürmann, C., Brandes, R., Wilharm, G., and Ballhorn, W. et al. (2015). Analysis of Endothelial Adherence of *Bartonella henselae* and *Acinetobacter baumannii* Using a Dynamic HumanEx Vivo Infection Model. *Infection and Immunity* 84, 711-722. doi:10.1128/iai.01502-15.
- Williams, J., Torres-León, M., Echeverria-Coelo, P., Matos-Medina, M. (2000). Aislamiento e identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en pulmones de cerdos con pleuroneumonía crónica sacrificados en el rastro municipal de Mérida, Yucatán, México.
- Wright, P. F., Ikizler, M. R., Gonzales, R. A., Carroll, K. N., Johnson, J. E., & Werkhaven, J. A. (2005). Growth of respiratory syncytial virus in primary epithelial cells from the human respiratory tract. *Journal of virology*, 79(13), 8651–8654. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8651-8654.2005>
- Xie, F., Wang, Y., Li, G., Liu, S., Cui, N., Liu, S., Langford, P., Wang, C. (2017). The SapA Protein Is Involved in Resistance to Antimicrobial Peptide PR-39 and Virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Front. Microbiol*, 8:801.
- Yu-Kemp, H., Briehner, W. (2015), Collapsin Response Mediator Protein-1 Regulates Arp2/3-dependent Actin Assembly. *The Journal of Biological and Molecular Chemistry*. 291(2), 658-664. doi: 10.1074/jbcC115.689265

Zhu, Y., Wang, H., Xu, Y., Hu, Y., Chen, H., Cui, L., ... He, W. (2016). Human $\gamma\delta$ T Cells Augment Antigen Presentation in *Listeria Monocytogenes* Infection. *Molecular Medicine*, 22, 737–746. <http://doi.org/10.2119/molmed.2015.00214>



ANEXO I

Portada Artículo Publicado



ORIGINAL RESEARCH
published: 29 October 2020
doi: 10.3389/fvets.2020.569370



Actinobacillus pleuropneumoniae Interaction With Swine Endothelial Cells

Berenice Plasencia-Muñoz¹, Francisco J. Avelar-González², Mireya De la Garza³,
Mario Jacques⁴, Adriana Moreno-Flores¹ and Alma L. Guerrero-Barrera^{1*}

¹ Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, ² Laboratorio de Estudios Ambientales, Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, ³ Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México, México, ⁴ Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses en Production Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

OPEN ACCESS

Edited by:
Maureen T. Long,
University of Florida, United States

Reviewed by:
Adina R. Bujold,
University of Alberta, Canada
Janet MacInnes,
University of Guelph, Canada

*Correspondence:
Alma L. Guerrero-Barrera
alguero@comae.usa.mx

Specialty section:
This article was submitted to
Veterinary Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 03 June 2020
Accepted: 28 September 2020
Published: 29 October 2020

Citation:
Plasencia-Muñoz B,
Avelar-González FJ, De la Garza M,
Jacques M, Moreno-Flores A and
Guerrero-Barrera AL (2020)
Actinobacillus pleuropneumoniae
Interaction With Swine Endothelial
Cells. *Front. Vet. Sci.* 7:569370.
doi: 10.3389/fvets.2020.569370

Actinobacillus pleuropneumoniae is a swine (host) specific respiratory pathogen and the etiological agent of swine pleuropneumonia which affects pigs of all ages, many being asymptomatic carriers. This pathogen has high morbidity and mortality rates which generates large economic losses for the pig industry. *Actinobacillus pleuropneumoniae* is a widely studied bacterium, however its pathogenesis is not yet fully understood. The prevalence of the 18 serotypes of *A. pleuropneumoniae* varies by geographic region, in North American area, more specifically in Mexico, serotypes 1, 3, 5b, and 7 show higher prevalence. *Actinobacillus pleuropneumoniae* is described as a strict extracellular pathogen with tropism for lower respiratory tract. However, this study depicts the ability of these serotypes to adhere to non-phagocytic cells, using an endothelial cell model, as well as their ability to internalize them, proposing it could be considered as an intracellular pathogen.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, cytoskeleton, bacterial cell adhesion, bacterial cell internalization, endothelial cell

INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) is a respiratory pathogen member of the family Pasteurellaceae and etiological agent of swine pleuropneumonia (1, 2). Depending on its nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) requirements, it is classified into two biotypes, biotype 1 groups NAD-dependent strains, biotype 2 groups NAD-independent strains. Currently 18 different serotypes are recognized. The biotypes and serotypes of *A. pleuropneumoniae* have genetic, structural, and virulence differences. Serotyping is mainly based on capsular antigens. The presence and prevalence of serotypes varies between countries. In North America serotypes 1 and 5 historically are the most commonly isolated. In recent findings most prevalent App serotypes in Canada were 5 and 7 with a notable reduction of serotype 1 incidence due to serological control of breeders. While in Mexico serotype 1 still has a high prevalence alongside serotypes 3, 5, and 7 (3–8).

Swine pleuropneumonia caused by App and is a major problem for swine production. It has a significant impact on animal welfare and economic production, due to high morbidity and mortality rates, the reduction of average daily weight gain and feed conversion rates, loss

ANEXO II

Artículo en Proceso de Revisión por Revista Académica

Confirmación recepción de artículo

Dear Biotech, Berenice Plasencia-Muñoz,

We have just received the submission entitled: "Adhesion and internalization of Actinobacillus pleuropneumoniae to a cell model of aortic endothelium" for possible publication in International Microbiology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr Alma Lilian Guerrero-Barrera who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
International Microbiology

Proceso revisión por pares

Dear Dr Guerrero-Barrera,

We have received the reports from our advisors on your manuscript, "Adhesion and internalization of Actinobacillus pleuropneumoniae to a cell model of aortic endothelium", which you submitted to International Microbiology.

Based on the advice received, I have decided that your manuscript could be reconsidered for publication should you be prepared to incorporate major revisions. When preparing your revised manuscript, you are asked to carefully consider the reviewer comments which can be found below, and submit a list of responses to the comments. You are kindly requested to also check the website for possible reviewer attachment(s).

While submitting, please check the filled in author data carefully and update them if applicable - they need to be complete and correct in order for the revision to be processed further.

In order to submit your revised manuscript, please access the following web site:

<https://www.editorialmanager.com/intm/>

Your username is: alguerre@correo.uaa.mx

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page.

We look forward to receiving your revised manuscript before 11 Dec 2020.

With kind regards,

José Berenguer, Prof.

Editor in Chief

International Microbiology

Manuscrito

Adhesion and internalization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to a cell model of aortic endothelium

Saúl E Torres-García¹, Mario Jacques², Berenice Minerva Plasencia-Muñoz¹, Jorge A Burciaga Nava³, Francisco J Avelar-Gonzalez¹, Eduardo Hernandez-Cuellar¹, Eduardo M Martín¹, and Alma L Guerrero-Barrera¹

¹ Departamento de Morfología. Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes

² Groupe de recherche sur les maladies infectieuses en production animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal

³ Facultad de Medicina y Nutrición, Universidad Juárez del Estado de Durango. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Juárez del Estado de Durango.

Alma Lilian Guerrero-Barrera (Corresponding author). Laboratorio de Biología Celular y Tisular. Departamento de Morfología. Centro de Ciencias Básicas. Av. Universidad 940. CU. Aguascalientes, Ags., 20131.

Tel: 52-449-910-74-00 ext. 342 E-mail: alguerre@correo.uaa.mx

Abstract

Actinobacillus pleuropneumoniae is an exclusive pig pathogen, and the etiologic agent of contagious porcine pleuropneumonia, which is one of the major swine respiratory diseases widely distributed, that causes severe economic losses in almost all the farms with swine production throughout the world. This pathogen possesses a well-equipped arsenal of virulence factors and mechanisms to elude host's immune system; which allows its survival and prevalence in the host. *A. pleuropneumoniae* internalization is a mechanism that has been reported in phagocytic cells but not demonstrated in non-professional phagocytic cells. Hence, we evaluated adhesion and internalization of *A. pleuropneumoniae* biotype 1, serovar 1 ATCC 4074 (type strain) using as cell model a cell line derived from swine aortic endothelium because of the importance of this tissue for the respiratory function. Bacterial survival rate within endothelial cells was assessed through counting colony forming units recovered from a gentamicin protection assay and evidenced by laser scanning confocal microscopy, also was evaluated its dependence to host actin cytoskeleton and its capability to induce cell death by apoptosis, which is one of the mechanisms for dissemination that internalizing microorganisms employ. The results showed that *A. pleuropneumoniae* has the capability to adhere and internalize to aortic swine endothelial cells *in vitro* at the experimental conditions used, in a manner directly proportional to the amount of bacteria interacted per cell (multiplicity of infection), internalization was independent of the integrity of actin cytoskeleton and incubation with *A. pleuropneumoniae* resulted in apoptosis of endothelial cells after 3 hours of interaction.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, porcine pleuropneumonia, swine endothelial cells, gentamicin protection assay, internalization, actin cytoskeleton.

INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae causes contagious porcine pleuropneumonia which is considered one of the most important diseases affecting swine respiratory tract, it produces a fibrinous, hemorrhagic, necrotizing and exudative pleuropneumonia (Li et al., 2015; Li et al., 2018), can be manifested as hyperacute form with a

quick development of clinical signs and death within the first 24 hour post infection (Sassu et al., 2018); or as chronic form where animals survive infection and remain as asymptomatic carriers, in this case animals present low weight gain and lesions that are observed at the moment of slaughter (Gottschalk 2012). This disease affects pigs of all ages and either forms represent significant economic losses to swine producers (Wyns et al., 2015; Li et al., 2018). It is widely distributed in all the countries with swine production and considered relatively under control in United States of America and Canada (Gottschalk 2015); being a serious problem for the rest of the world.

Belonging to Gamma proteobacteria class and Pasteurellaceae family, *A. pleuropneumoniae* is a Gram negative pleomorphic coccobacillus (Loera-Muro 2015; Shivachandra et al. 2014; Tremblay et al. 2013) classified by its dependency to cofactor nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) in two biotypes: 1) NAD dependent and 2) NAD independent; based on its capsular antigens is classified in 16 serotypes (Árközi et al. 2015; dos Santos et al., 2018); all of them capable of causing disease with different virulence degrees (Bossé et al. 2015; Gottschalk 2015; dos Santos et al., 2018).

A. pleuropneumoniae possesses a great capacity of adaptation to environment, making it an excellent study model. Its well-equipped arsenal of virulence factors allows it to produce a severe damage to host for example, has a capsule that brings protection against immune system and degradation by phagocytes; adhesion factors as lipopolysaccharide (LPS), fimbriae type IV and adhesins that participate in adhesion to host cell and extracellular matrix compounds; iron acquisition systems as transferrin binding proteins and ferrichrome receptors, even binds to porcine hemoglobin by LPS and outer membrane proteins (OMPs); have secretion products, such as pore forming toxins (Apx toxins I-IV) with hemolytic and cytotoxic activity, urease that guarantee an appropriate pH and proteases that degrade porcine gelatin, actin and hemoglobin (Chiers et al. 2010; dos Santos et al., 2018; García-Cuéllar et al. 2000; Negrete-Abascal et al. 1998). *A. pleuropneumoniae* and its secretion products are cytotoxic for several cell lines including porcine cells *in vitro* (Serebrin et al. 1991; dos Santos et al., 2018) even incubation of cell lines with its culture supernatants produces cell cycle arrest at the G2/M-phase (Barbosa et al. 2015). In hilar nodes transcriptome has been showed that *A. pleuropneumoniae* induces signal transduction pathways that include vascular endothelial grow factor pathway (Yu et al. 2013).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A. pleuropneumoniae forms biofilms over abiotic and biotic surfaces (Tremblay et al. 2013; Xie et al., 2016); more over biofilm formation provides resistance to antimicrobial compounds, helps to elude host's immune system and probably allows it to persist in swine tonsils (Chiers et al. 2010). Outside its host could survive through forming biofilms in water (Loera-Muro et al. 2013) and in vitro appear to solve its NAD dependency by association with other bacterial species (Hathroubi et al. 2017; Loera-Muro et al. 2016). Although, this bacterium is a respiratory pathogen, in some reported clinical cases it has been found at non-pulmonary sites as pericardium, joints, bones, trachea (Jensen et al. 1999), kidneys and meninges (Madsen et al. 2001), probably due to sepsis.

Since adhesion and internalization to host cells are the major steps of bacterial pathogenesis, both showed in microorganisms relatives to *A. pleuropneumoniae* members of Gammaproteobacteria class as uropathogenic strains of *Escherichia coli* (Lin et al. 2014) and members of Pasteurellaceae family as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Lai and Walters 2013), *Haemophilus parasuis* (Frndoloso et al. 2012) and *Haemophilus influenzae* (Salcedo and Cid 2011), over the last decade, has been studied to how *A. pleuropneumoniae* interacts with different kinds of host cells, showing adhesion to extracellular matrix compounds as fibronectin, fibrinogen and collagen (Enríquez-Verdugo et al. 2004), swine pulmonary cells, tracheal cells (Auger et al. 2009) and buccal epithelial cells (Hamer-Barrera et al. 2004) as an extracellular bacteria. Also has been observed its internalization and survival within swine alveolar macrophages (Crujisen et al. 1992; Wang et al. 2015); though, it has not been demonstrated in non-professional phagocytic cells even adhesion. In this work is demonstrated that *A. pleuropneumoniae* has the ability to adhere and internalize to non-professional phagocytic cells, using as cell model endothelial aortic cells, as an evasion of host defense mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

***A. pleuropneumoniae* and growth conditions**

A. pleuropneumoniae biotype 1, serovar 1 ATCC 4074 (type strain) was grown at 37°C in brain–heart infusion liquid medium (BHI, Difco) supplemented with 15 µg/mL of β-NAD until exponential phase of growth measured by optical density at 600 nm, aliquots of bacteria were used at optical density of 0.6 (Auger

et al. 2009; Tremblay et al. 2013). For interaction experiments bacteria were recovered by centrifugation, washed with Dulbecco's phosphate-buffered saline solution (DPBS) pH 7.2 and adjusted at 2×10^6 colony forming units (CFU) per milliliter (Burciaga-Nava et al. 2009).

Swine Endothelial Cells and culture conditions

Naturally immortalized endothelial cell line obtained from swine aorta (Burciaga-Nava et al. 2009) growing in 199 medium was used here (Gibco BRL, Grand Island, NY), supplemented with 50mg/L gentamicin, 2.5mg/L of amphotericin B, 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, Grand Island, NY) and 50 μ g/ml heparin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) at 37°C in an humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. Subcultures were performed by enzymatic digestion with TrypLE Express (Gibco BRL, Grand Island, NY) and reseeded at the same conditions. Cell viability along reseeding was determined by trypan blue exclusion (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.).

Adhesion test

Endothelial cell cultures at confluence (80000 cells per well approximately) grown in multi-well plates were incubated with a bacterial suspension containing 2×10^6 CFU/mL (multiplicity of infection of 25 CFU per endothelial cell) in RPMI-1640 Medium (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco BRL, Grand Island, NY) free of antibiotics and antifungals at 37°C in an humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air by 0.5, 1, and 2 hours, then were washed 5 times with sterile DPBS. Negative controls were made without bacteria and bacteria previously fixed with 3.7% formaldehyde solution (Baker Analyzed ACS Reagent, J.T. Baker) as well as bacteria inactivated by boiling for 5 minutes (data not shown). The no adherent bacteria were recuperated, washed three times with PBS 1X and were grown on BHI-NAD agar plates and incubated 24 hours at 37°C, and the colonies were counted. Experiments were performed by triplicate and preliminary experiments do not showed free bacteria in supernatants at the end of the washes with DPBS.

Internalization test by gentamicin protection assay

Endothelial cell cultures at confluence (80000 cells per well) were incubated with a bacterial suspension at multiplicity of infection of 25 CFU per endothelial cell in RPMI-1640 Medium (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco BRL, Grand Island, NY) free of antibiotics and antifungals at 37°C in an humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air by 3 hours, then cultures were washed 5 times with sterile DPBS supplemented with 100µg/mL of gentamicin in order to kill and detach the adherent extracellular bacteria (Yang et al. 2016; Ye et al. 2015); medium was replaced with fresh medium supplemented with 100µg/mL of gentamicin and incubated 1h more at the same conditions. Dead extracellular bacteria and gentamicin were removed from cultures by gently washing 5 times with sterile antibiotic-free DPBS, cells were lysed with 1 mL of pre-chilled sterile deionized water to release viable intracellular bacteria (Vanier et al. 2006; Yang et al. 2016; Ye et al. 2015) and dilutions of lysates were grown on BHI-NAD agar plates and incubated 24 hours at 37°C, colonies were counted and number of CFU was divided by the number of cells per well to determine intracellular bacteria per endothelial cell. Negative controls were made without bacteria and all experiments were performed by triplicate.

In order to corroborate internalization and evaluate the eukaryotic actin cytoskeleton participation, cytochalasin D, a drug that acts as actin microfilament disruptor, were employed; so endothelial cells were preincubated in RPMI-1640 Medium (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum, 1µM cytochalasin D (CD) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) and free of antibiotics and antifungals, by 30 minutes at the same culture conditions and subsequently washed 3 times with DPBS to eliminate residual CD (Krucker et al. 2000). Then, the gentamicin protection assay was done and endothelial cell cultures exempted of CD preincubation were used as negative controls of actin cytoskeleton inhibition.

Demembration and Cytoeskeleton labeling

In order to assessing to the intra cellular space, all of the samples obtained from the last experiments were fixed with 3.7% formaldehyde solution (Baker Analyzed ACS Reagent, J.T. Baker) by 30 minutes at 37°C, then eukaryotic cell membranes were dissolved by incubation in Triton X-100 0.2% (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) by 5 minutes and washed 3 times with DPBS.

Internalized bacteria were labeled by indirect immunofluorescence with an specific polyclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* biotype 1, serovar 1 ATCC 4074 produced in rabbit (Guerrero-Barrera et al. 1999), and a secondary monoclonal antibody Alexa Fluor 594 Goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Actin cytoskeleton was stained with Alexa Fluor 488 Phalloidin (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) and nuclei counterstained with Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA); then cells were subsequently washed with DPBS and mounted in aqueous medium. Images were obtained with a Carl Zeiss LSM700 confocal scanning microscope.

Electron Microscopy

Samples from internalization experiments were fixed with buffered glutaraldehyde 2.5% and demembrated as above mentioned, then were washed 3 times with DPBS, and processed to be gold coated for conventional scanning electron microscopy. Samples were processed by triplicated and all the solutions used were previously sterilized by filtration through a sterile nitrocellulose membrane with pore size of 0.22 μm ; images were obtained with a JEOL 5000 LV SEM microscope.

Cytotoxicity in swine endothelial cells produced by incubation with *A. pleuropneumoniae*

Swine endothelial cell cultures at confluence were incubated with a bacterial suspension at different multiplicity of infection (MOI) (1:1, 10:1, 25:1, 100:1, 1000:1 and 10000:1) in RPMI-1640 Medium (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (Gibco BRL, Grand Island, NY) free of antibiotics and antifungals at 37°C in an humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air by 3 hours; then supernatants were recovered and lactate dehydrogenase (LDH) release was evaluated with an LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit (BioVision Incorporated, Milpitas, CA, USA) and analyzed in a BIO-RAD Benchmark microplate reader. In order to establishing a 100% of cytotoxicity (LDH releasing), non-interacted cell cultures were lysed with 2% Triton X-100 diluted in culture medium and analyzed as above mentioned.

Apoptosis assay

Endothelial cells cultures at confluence were incubated with a bacterial suspension at different multiplicity of infection (MOI) (1:1, 10:1, 25:1, 100:1, 1000:1 and 10000:1) in RPMI-1640 Medium (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (Gibco BRL, Grand Island, NY) free of antibiotics and antifungals at 37°C in an humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air by 3 hours; then washed with sterile DPBS and detached from plate with TrypLE Express (Gibco BRL, Grand Island, NY), centrifuged 5 minutes X 300g, supernatant were removed and pellet were fixed with 3.7% formaldehyde at 4°C overnight; cells were processed with an APO-BrdU TUNEL Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Samples were processed by triplicated and observed by epifluorescence microscopy with an Axioskop 40 Zeiss microscope; positive controls were generated by exposing non-interacted swine endothelial cell cultures to ultraviolet irradiation.

RESULTS

Quantification of adhered bacteria to swine endothelial cells

A reference strain of *A. pleuropneumoniae* biotype 1, serovar 1 ATCC 4074 was used in this study, first was evaluated the ability of *A. pleuropneumoniae* to adhere to swine aortic endothelial cells in culture after 0.5h, 1h and 2h of incubation at multiplicity of infection (MOI) 25:1, adherence of *A. pleuropneumoniae* to such cells, was incubation time dependent, adherence rates at 30 minutes and 1 hour were not statistically significant different between them, but after 1 hour rate increasing were significant (two-way ANOVA) (Fig 1).

Quantification of internalized bacteria

Internalization. The ability of *A. pleuropneumoniae* to internalize endothelial cells measured by antibiotic assay protection and recovery of viable intracellular bacteria by plating on BHI-NAD agar of cell lysates were performed in two experimental groups of swine endothelial cell cultures, one with actin cytoskeleton disrupted with cytochalasin D and other with actin cytoskeleton intact; at MOI 25:1 by 3h. Both groups showed internalization, nevertheless the rate of internalization was higher but not statistically significant (ANOVA test) in the group treated with cytochalasin D compared with those non-treated (Table 1); negative control rates were 0.

Table 1. Quantification of *A. pleuropneumoniae* CFU's recovered from cell lysates after internalization test in swine endothelial cells.

| | Negative control | Experimental | Experimental treated with cytochalasin D |
|---|------------------|--------------|--|
| Gentamicin Surviving CFU counted on agar plate per well | 0 | 60 ± 36 | 34 ± 16 |
| Internalization rate (CFU per 10000 swine endothelial cells) | 0 | 2.3 ± 1.38 | 3.54 ± 1.68 |

Rates are the means ± standard deviation of experiments by triplicate. Negative controls were made without bacteria and all experiments were performed by triplicate. Statistically significant differences were observed between the negative control and the experimental groups interacted with *A. pleuropneumoniae*.

Immunofluorescent labeling

Triton X-100 demembrated and immuno-labeled samples from internalization assay were observed and analyzed by laser scanning microscopy; bacteria at the intracellular space in contact with actin cytoskeleton were observed (Fig 2); more over tridimensional reconstructions were obtained by Z-stacking

immunofluorescent labeled samples, observing bacteria distributed along the total thickness of the cells and also in contact with actin cytoskeleton (Fig 3).

Scanning Electron Microscopy

Triton X-100 demembrated and gold coated samples from internalization assay were observed and analyzed by scanning electron microscopy at 5000 amplifications, finding internalized bacteria in contact with microfilaments, negative controls do not showed bacterial structures (Fig 4).

***Actinobacillus pleuropneumoniae* Cytotoxicity**

Supernatants of cell incubated with *A. pleuropneumoniae* at different multiplicities of infection, cultures were collected and cytotoxicity was observed by measuring released LDH present in those supernatants, statistically significant differences were not observed between cells interacted with *A. pleuropneumoniae* at low MOI from 1:1 to 1:25, nevertheless increases were statistically significant different from MOI 100:1 onwards (two-way ANOVA) (Fig 5).

Apoptosis assay

Swine endothelial cells interacted 3h with *A. pleuropneumoniae* at different multiplicities of infection, were enzymatically detached, fixed and fluorescent labeled against a apoptotic DNA by TUNEL assay, samples were observed by epifluorescence microscopy and populations of 100 cells counted by triplicated, Data analysis of counted cells was performed in Graphpad Prism software, observing apoptosis induction directly proportional to multiplicity of infection; again multiplicities of infection from 1:1 to 25:1 do not produced apoptosis but from 100:1 onward were observed statistically significant increases of apoptosis production (two-way ANOVA) (Fig 6).

DISCUSSION

Actinobacillus pleuropneumoniae is a pathogen commonly found in swine farm environment, its characteristic virulence makes it one of the most important pathogens of swine respiratory tract, causing severe economic losses. This bacteria has been reported as extracellular. However, in this work was assessed the possibility to find *A. pleuropneumoniae* internalized in non-phagocytic cells by gentamicin protection assay and laser scanning confocal microscopy.

Previous works shows that *A. pleuropneumoniae* has the ability to adhere but not internalize to New born pig tracheal cells (NPTr) and Saint Jude porcine lung cells (SJPL) (Auger et al. 2009) since the first minutes and reached the maximum level in three hours after interaction (Table 2). The results obtained here showed that *A. pleuropneumoniae* adheres and can be internalized in swine endothelial cells after three hours of interaction, in a manner independent of the stability of the host actin cytoskeleton. More over this interaction resulted in cell death by two ways, necrosis and apoptosis. This is an important fact since internalization is a common way that pathogens uses to get protected from immune system, in addition, endothelial cells represent an interesting object of study since play an important role of barrier between tissues and blood; often endothelium is used as a target of pathogens such as *Haemophilus parasuis* or *Actinobacillus suis* (a close relative to *A. pleuropneumoniae*) that internalizing in endothelial cells from brain microvasculature, causing meningitis (Ojha et al. 2010; Vanier et al. 2006).

Table 2. Comparative rates of adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* to different host cells

| Specie | Cell line | CFU/Cell | Time (min) | Adhesion rate Bacteria/Cell | Consulted from: |
|----------------------------|-----------|----------|------------|-----------------------------|----------------------|
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | NPTR | 10 | 60 | 0.04 | (Auger et al., 2009) |
| | | 10 | 120 | 0.4 | |
| | | 10 | 180 | 4 | |

| | | | | | |
|----------------------------|---------------------|------|-----|-------|------------------------------|
| | Swine | | | | |
| A. | Buccal | | | | |
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | Epithelial Cells | 4000 | 60 | 80 | (Hamer-Barrera et al., 2004) |
| <i>H. parasuis</i> | PBMEC | 1000 | 120 | 10 | (Vanier et al., 2006) |
| <i>H. parasuis</i> | PK15 | 1000 | 60 | 0.25 | (Frاندoloso et al., 2012) |
| | | 1000 | 90 | 3.6 | |
| | Swine | | | | |
| A. | endothelial cells * | 25 | 60 | 0.028 | |
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | | 25 | 180 | 0.05 | |

* Our experimental model

Adhesion and internalization to endothelial cells seems to facilitate translocation to blood stream and then to non-pulmonary sites by killing the host cell. In a discreet manner, dissemination via apoptosis allow pathogens to translocate protected from immune system, since is a process of programmed cell death in which cells get fragmented in apoptotic bodies, each one, conformed of rests of DNA and cytosolic content surrounded by cell membrane. This way of bacterial translocation happens with pathogens as *Mycobacterium tuberculosis*, which replicates inside macrophages and then is released in apoptotic bodies. At the other hand, necrosis is a less discreet mechanism of dissemination where cell membrane is disrupted with liberation of the whole cellular content and exposition to immune system.

In swine endothelial cells incubated 3h with washed *A. pleuropneumoniae*, we observed that although major part of cell death is produced by necrosis (LDH assay, Fig 5), there is a part produced by apoptosis at high multiplicities of infection as 1000:1 (Fig 6). In this work is reported by first time apoptosis cell death produced by *A. pleuropneumoniae* in non-phagocytic cells, since death produced by *A. pleuropneumoniae* over its host cells still being consider until this moment only by necrosis (Auger et al. 2009), and apoptosis was only reported in pulmonary macrophages (Wang et al. 2015).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A. pleuropneumoniae internalization in swine endothelial cells appear to be independent of the eukaryotic actin cytoskeleton integrity and actually its disruption with cytochalasin D seems to facilitate it. Quantification of internalized CFU show a higher amount of bacteria inside cells treated with cytochalasin D compared with not treated (Table 1); nevertheless differences were not statistically significant with a P. value of 0.05. In both cases, internalized bacteria seems to be in interaction with actin cytoskeleton (Fig 3 D-J) which could be verified with a Z-stacking, where is possible to see how red label corresponding to *A. pleuropneumoniae* is embedded in the green label of actin cytoskeleton.

Talking about the methodology used here, gentamicin protection assay it's the most classical internalization experiment, where eukaryotic cells in interaction with bacteria are exposed to gentamicin, a broad-spectrum antibiotic that can't spread to intracellular space, killing only extracellular bacteria without affecting that intracellular. In addition, extracellular bacteria were removed from cells by one hour of incubation with gentamicin, which produces bacterial detachment and death (Vidya et al. 2005).

Before immunolabeling, interacted cells are incubated with Triton X-100 0.2% which is a reported detergent that solubilizes eukaryotic cell membranes (Kalipatnapu and Chattopadhyay 2005) allowing the visualization of the intracellular space and inhibits bacterial adhesion (Grootaert et al. 2011) guaranteeing the absence of extracellular bacteria. Likewise our images were generated using actin cytoskeleton counterstained with Alexa Fluor 488 Phalloidin as reference of intracellular location since is the most abundant intracellular protein in eukaryotic cells (Lodish et al. 2000).

By plating bacteria recovered from inside the cells, was quantified the amount of colony forming units (CFU) internalized per endothelial cell; the rates of internalization appear to be low; although, it can be underestimated since methods to recover internalized bacteria are aggressive and could affect bacterial viability. Moreover, there is not a parameter to consider a microorganism intracellular or not. In a comparison with *H. parasuis*, a well-known internalizing pathogen and close relative of *A. pleuropneumoniae*, we can see that adhesion and internalization change between interaction times, multiplicities of infection and cell line; that's why in order to obtain a better perspective, were made the next comparative tables of adhesion and internalization rates of *A. pleuropneumoniae* and *H. parasuis* to different cell lines, adjusting the reported

values of different works to a standard rate (bacteria per host cell) and including our results at the final of each table (Table 2 and 3). Placing at this perspective is possible to observe that despite to look low, our results are not so different to those reported in *H. parasuis* considering that multiplicities of infection used in this work were lower than those used in others, moreover is important to mention that all of this information were obtained from experiments in vitro, being necessary to evaluate what is happening in vivo.

Table 3. Comparative rates of internalization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* to different host cells

| Specie | Cell line | CFU/Cell | Time | Internalization rate (CFU/Cell) | Consulted from: |
|----------------------------|---------------------|----------|------|---------------------------------|---------------------------|
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | SJPL | 100 | 120 | 0 | (Auger et al., 2009) |
| | | | 180 | 0 | |
| | NPTRL | 100 | 120 | 0 | |
| | | | 180 | 0 | |
| <i>H. parasuis</i> | SJPL | 100 | 120 | 0.00042 | (Auger et al., 2009) |
| | | | 180 | 0.0005 | |
| <i>H. parasuis</i> | NPTR | 100 | 120 | 0.000072 | (Auger et al., 2009) |
| | | | 180 | 0.000128 | |
| <i>H. parasuis</i> | PBMEC | 1000 | 240 | 0.045 | (Vanier et al., 2006) |
| <i>H. parasuis</i> | PK15 | 1000 | 90 | 0.12 | (Frاندoloso et al., 2012) |
| | | | 180 | 0.58 | |
| | Swine | | | | |
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | Endothelial Cells * | 25 | 180 | 0.00023 | |

* Our experimental model

ACKNOWLEDGEMENTS

We render thanks especially to the Biologist Adriana Cecilia Moreno and Araceli Adabache Ortiz for their technical support in confocal and scanning microscopy, respectively.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Auger E, Deslandes V, Ramjeet M, Contreras I, Nash JE, Josée Harel J, Gottschalk M, Olivier M, Jacques M (2009) Host-Pathogen Interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with Porcine Lung and Tracheal Epithelial Cells. *Infect Immun* 77(4):1426–1441. <https://doi.org/10.1128/IAI.00297-08>

Ferreira Barbosa JA, Labrie J, Beaudry F, Gagnon CA, Jacques M (2015) *Actinobacillus pleuropneumoniae* induces SJPL cell cycle arrest in G2/M-phase and inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication. *Virology* 521:188.

<https://doi.org/10.1186/s12985-015-0404-3>

Bossé JT, Li Y, Atherton TG, Walker S, Williamson SM, Rogers J, Chaudhuri RR, Weinert LA, Holden MT, Maskell DJ, Tucker AW, Wren BW, Rycroft AN, Langford PR; BRaDP1T consortium (2015) Characterisation of a mobilisable plasmid conferring florfenicol and chloramphenicol resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 178(3-4):279-82.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.05.020>

Burciaga-Nava JA, Reyes-Romero MA, Avelar-González FJ, Guerrero-Barrera AL (2009) Establishment and characterization of porcine aortic endothelial cell cultures with prolonged replicative lifespan by a non-enzymatic method. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45(1-2):15-8.

<https://doi.org/10.1007/s11626-008-9146-5>

Chiers K, De Waele T, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F (2010) Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet Res* 41(5): 65.

<https://doi.org/10.1051/vetres/2010037>

Crujisen TL, Van Leengoed LA, Dekker-Nooren TC, Schoevers EJ, Verheijden JH (1992) Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infect Immun* 60(11): 4867–4871.

Dos Santos LF, Costa Polveiro R, Scatamburlo Moreira T, Pereira Vidigal PM, Chang YF, Scatamburlo Moreira MA (2018) Polymorphism analysis of the apxIA gene of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 5 isolated in swine herds from Brazil. *Plos One* 13(12):e0208789.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208789>

Enríquez-Verdugo I, Guerrero AL, Serrano JJ, Godínez D, Rosales JL, Tenorio V, de la Garza M (2004) Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. *Microbiology* 150(Pt 7):2391-400.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.27053-0>

Frاندoloso R, Martínez-Martínez S, Gutiérrez-Martín CB, Rodríguez-Ferri EF (2012) Haemophilus parasuis serovar 5 Nagasaki strain adheres and invades PK-15 cells. *Vet Microbiol* 154(3-4):347-52.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.022>

García-Cuéllar C, Montañez C, Tenorio V, Reyes-Esparza J, Durán MJ, Negrete E, Guerrero A, de la Garza M (2000) A 24-kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleaves actin in vitro. *Can J Vet Res.* 64(2):88-95.

Gottschalk M (2015) The challenge of detecting herds sub-clinically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet J* 206(1):30-8.

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.06.016>

Grootaert C, Boon N, Zeka F, Vanhoecke B, Bracke M, Verstraete W, Van de Wiele T (2011) Adherence and viability of intestinal bacteria to differentiated Caco-2 cells quantified by flow cytometry. *J Microbiol Methods* 86(1):33-41.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.03.011>

Guerrero-Barrera AL, de la Garza M, Mondragón R, García-Cuéllar C, Segura-Nieto M (1999) Actin-related proteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their interactions with actin-binding proteins. *Microbiology* 145 (Pt 11):3235-44.

Hamer-Barrera R, Godínez D, Enríquez VI, 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. *Can J Vet Res* 68(1):33-41.

[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90004-Y](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90004-Y)

Hathroubi S, Loera-Muro A, Guerrero-Barrera AL, Tremblay YDN, Jacques M (2017) *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms: Role in pathogenicity and potential impact for vaccination development. *Anim Health Res Rev* 19(1):17-30.

<https://doi.org/10.1017/S146625231700010X>

Jensen TK, Boye M, Hagedorn-Olsen T, Riising HJ, Angen O (1999) *Actinobacillus pleuropneumoniae* osteomyelitis in pigs demonstrated by fluorescent in situ hybridization. *Vet Pathol* 36(3):258-61.

<https://doi.org/10.1354/vp.36-3-258>

Kalipatnapu S, Chattopadhyay A (2005) Membrane protein solubilization: recent advances and challenges in solubilization of serotonin1A receptors. *IUBMB Life.* 2005 Jul;57(7):505-12.

<https://doi.org/10.1080/15216540500167237>

Krucker T¹, Siggins GR, Halpain S (2000) Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6856-61.

<https://doi.org/10.1073/pnas.100139797>

Lai PC¹, Walters JD (2013) Azithromycin kills invasive *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in gingival epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 57(3):1347-51.

<https://doi.org/10.1128/AAC.02558-12>

Li G, Xie F, Zhang Y, Bossé JT, Langford PR, Wang C (2015) Role of (p)ppGpp in Viability and Biofilm Formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* S8. *PLoS One* 10(10): e0141501

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141501>

Li B, Fang J, Zuo Z, Yin S, He T, Yang M, Deng J, Shen L, Ma X, Yu S, Ren Z (2018) Activation of porcine alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide via the Toll-like receptor 4/NF- κ B-mediated pathway. *Infect Immun* 86:e00642-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00642-17>.

Loera Muro A, Avelar González FJ, Loera-Muro VM, Jacques M, Guerrero-Barrera AL (2013) Presence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in upper respiratory tract of swine in farms from Aguascalientes, Mexico. *Open Journal of Animal Sciences* 03(02):132-137.

<https://doi.org/10.4236/ojas.2013.32020>

Loera-Muro A, Jacques M, Avelar-González FJ, Labrie J, Tremblay YD, Oropeza-Navarro R, Guerrero-Barrera AL (2016) Auxotrophic *Actinobacillus pleuropneumoniae* grows in multispecies biofilms without the need for nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD) supplementation. *BMC Microbiol* 16(1):128.

<https://doi.org/10.1186/s12866-016-0742-3>

Loera-Muro A, Ramírez-Castillo FY, Avelar-González FJ, Guerrero-Barrera FJ (2015) Porcine Respiratory Disease Complex and Biofilms. *J Bacteriol Parasitol* 6:1-9.

Madsen LW, Boye M, Jensen TK, Svensmark B (2001) *Actinobacillus pleuropneumoniae* demonstrated in situ in exudative meningitis and nephritis. *Vet Rec*.149(24):746-7.

<http://dx.doi.org/10.1136/vr.149.24.746>

Ojha S¹, Lacouture S, Gottschalk M, MacInnes JI (2010) Characterization of colonization-deficient mutants of *Actinobacillus suis*. *Vet Microbiol* 140(1-2):122-30.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.014>

Negrete-Abascal E, Tenorio VR, Guerrero AL, García RM, Reyes ME, de la Garza M (1998) Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Can J Vet Res* 62(3):183-90.

Salcedo SP, Cid VJ (2011) Nontypable *Haemophilus influenzae*: an intracellular phase within epithelial cells might contribute to persistence. *Microbiology* 157(Pt 1):1-2.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.046722-0>

Sárközi R, Makrai L, Fodor L (2015) Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Serovar 16. *Acta Vet Hung* 4:444-50.

<https://doi.org/10.1556/004.2015.041>

Sassu EL, Bossé JT, Tobias TJ, Gottschalk M, Langford PR, Hennig-Pauka I (2018) Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*-knowledge, gaps and challenges. *Transbound Emerg Dis* 65 Suppl 1:72-90.

<https://doi.org/10.1111/tbed.12739>

Tremblay YD, Lévesque C, Segers RP, Jacques M (2013) Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface. *BMC Vet Res* 9:213.

<https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-213>

Vanier G, Szczotka A, Friedl P, Lacouture S, Jacques M, Gottschalk M (2006) *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells. *Microbiology* 152(Pt 1):135-42.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.28312-0>

Vidya KC, Mallya PS, Rao PS (2005) Inhibition of bacterial adhesion by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Indian J Med Microbiol* 23(2):102-5.

<https://doi.org/10.4103/0255-0857.16048>

Wang L, Qin W, Ruidong Z, Liu S, Zhang H, Sun C, Feng X, Gu J, Du C, Han W, Langford PR, Lei L (2014) Differential gene expression profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during induction of primary alveolar macrophage apoptosis in piglets. *Microb Pathog* 78:74-86.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.11.017>

Wyns H, Croubels S, Vandekerckhove M, Demeyere K, De Backer P, Goddeeris BM, Meyer E (2015) Multiplex analysis of pro-inflammatory cytokines in serum of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected pigs. *Res Vet Sci* 102:45-8.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.07.006>

Yang X, Si R, Liang Y, Ma B, Jiang Z, Wang B, Gao P (2016) Mir-30d increases intracellular survival of *Helicobacter pylori* through inhibition of autophagy pathway. *World J Gastroenterol* 22(15): 3978–3991.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i15.3978>

Ye J, Pan Q, Shang Y, Wei X, Peng Z, Chen W, Chen L, Wang R

Citation: *Gut Pathogens* (2015) Core 2 mucin-type O-glycan inhibits EPEC or EHEC O157:H7 invasion into HT-29 epithelial cells. *Gut Pathogens* 7(31). <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0078-9>

Yu S, Zuo Z, Cui H, Mingzhou Li, Peng X, Zhu L, Zhang M, Li X, Xu Z, Gan M, Deng J, Fang J, Ma J, Su S, Wang Y, Shen L, Ma X, Ren Z, Wu B, Hu Y (2013) Transcriptional Profiling of Hilar Nodes from Pigs after Experimental Infection with *Actinobacillus Pleuropneumoniae*. *Int J Mol Sci* 14(12): 23516–23532.

<https://doi.org/10.3390/ijms141223516>

Tables

Table I. Quantification of *A. pleuropneumoniae* CFU's recovered from cell lysates after gentamicin protection

assay in swine endothelial cells; rates are the means \pm standard deviation of experiments by triplicate. Statistically significant differences were observed between the negative control and the experimental groups interacted with *A. pleuropneumoniae*.

Table II. Comparative rates of adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* to different host cells.

Table III. Comparative rates of internalization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* to different host cells

Figures

Figure 1. Effect of incubation time over adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine endothelial cells. Points represent the amount of CFU adhered to swine endothelial cells and recovered per well at different time of incubation.

Figure 2. Internalization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine endothelial cells observed by confocal laser scanning microscopy. (a) Actin cytoskeleton of swine endothelial cells labeled in green with Alexa Fluor 488 Phalloidin; (b,c) *A. pleuropneumoniae* internalized in swine endothelial cells, incubated with Anti-*A. pleuropneumoniae* primary polyclonal antibody; (d-j) *A. pleuropneumoniae* internalized in swine endothelial cells is labeled in red with Alexa Fluor 594, actin cytoskeleton is counterstained in green with Alexa Fluor 488 Phalloidin. Confocal laser scanning microscopy: CLSM 700 Zeiss microscope, 400X.

Figure 3. Digital reconstruction of swine endothelial cells with *Actinobacillus pleuropneumoniae* internalized. Actin cytoskeleton of swine endothelial cells is labeled in green with Alexa Fluor 488 Phalloidin and *A. pleuropneumoniae* was labeled in red with indirect labeling with Anti-*A. pleuropneumoniae* primary polyclonal antibody Alexa Fluor 594. Confocal laser scanning microscopy, CLSM 700 Zeiss microscope, 400X.

Figure 4. Scanning electron microscopy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* internalized in swine endothelial cells. Left column corresponds to negative control (cells non interacted with bacteria) and right column to experimental samples. Bacteria were false colored in red, microfilaments in green and nuclei in blue. Scanning electron microscopy, JEOL 5000 LV SEM microscope, 5000X.

Figure 5. Cytotoxicity measured by lactate dehydrogenase (LDH) released from swine endothelial cells incubated 3 hours with *Actinobacillus pleuropneumoniae* at different multiplicities of infection.

Figure 6. Apoptosis measured by TUNEL assay produced in swine endothelial cells by incubation with *Actinobacillus pleuropneumoniae* observed by epifluorescence microscopy. The incubation was by 3 hours at different multiplicities of infection (CFU per cell); (a,b) Non-interacted cells (negative control); (c,d) UV Light irradiated cells (Positive control); (e,f) Cells interacted with *A. pleuropneumoniae* (1000 CFU per cell); Fragmented DNA in green and Total DNA in red. Axioskop 40 Zeiss microscope, 400X.