



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

Doctorado en Ciencias Biológicas

Tesis

**Mecanismos de invasión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en células del
hospedero**

Que presenta:

María Magdalena Soto Perezchica

Para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias Biológicas

Tutor

Dra. Alma Lilian Guerrero Barrera

Asesores

Dr. Francisco Javier Avelar González

Dr. Teódulo Quezada Tristán

Aguascalientes, Aguascalientes., 21 de noviembre de 2024



Mtro. En C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO BÁSICAS

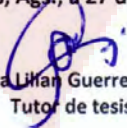
PRESENTE

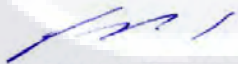
Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **MARIA MAGDALENA SOTO PEREZCHICA** con ID **40626** quien realizó la tesis titulada: **MECANISMOS DE INVASIÓN DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EN CÉLULAS DEL HOSPEDERO**, un trabajo propio, innovador, relevante 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 ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

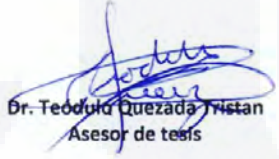
Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de junio de 2024


Dra. Alma Lilia Guerrero Barrera
Tutor de tesis


Dr. Francisco Javier Avelar González
Asesor de tesis


Dr. Teodoro Quezada Tristan
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

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-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 15 de noviembre de 2024

NOMBRE: María Magdalena Soto Perezchica **ID** 40626

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Tradicional **LGAC (del posgrado):** Toxicología y Bioingeniería ambiental

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo Práctico

TITULO: Mecanismos de invasión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en células del hospedero

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): La tesis permite acercarse a los mecanismos moleculares de interacción hospedero-parásito de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, para que en un futuro se puedan proponer soluciones a esta enfermedad. El impacto es para el sector agropecuario.

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:				
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
<i>NO</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:				
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral), etc)
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
<i>N.A.</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Coincide con el título y objetivo registrado
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene congruencia con cuerpos académicos
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
<i>Sí</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados				
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El estudiante es el primer autor
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	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 No

FIRMAS

Elaboró:
 * NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN: Dr. Édgar Eduardo Hernández Cuéllar
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: Dr. Gilberto Alejandro Espino Acosta
 * En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, registrado por el Decano
Revisó:
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: Dr. Alejandro Padilla Díaz
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.
 Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
 Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad,
 Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.
 Código: DO-SEE-FO-1
 Actualización: 01
 Emisión: 28/04/20.

 Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
 Jerry William Simecka,
 University of North Texas Health Science
 Center, United States

REVIEWED BY
 Rosa Estela Quiroz Castañeda,
 Instituto Nacional de Investigaciones
 Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP),
 Mexico
 Han Sang Yoo,
 Seoul National University, Republic of Korea

*CORRESPONDENCE
 Alma L. Guerrero Barrera
 ✉ alquerque@correo.uaa.mx;
 ✉ lilian.guerrero@edu.uaa.mx

RECEIVED 12 August 2023
 ACCEPTED 17 October 2023
 PUBLISHED 30 November 2023

CITATION
 Soto Perezchica MM, Guerrero Barrera AL,
 Avelar Gonzalez FJ, Quezada Tristan T and
 Macias Marin O (2023) *Actinobacillus*
pleuropneumoniae, surface proteins and
 virulence: a review.
Front. Vet. Sci. 10:1276712.
 doi: 10.3389/fvets.2023.1276712

COPYRIGHT
 © 2023 Soto Perezchica, Guerrero Barrera,
 Avelar Gonzalez, Quezada Tristan and Macias
 Marin. This is an open-access article distributed
 under the terms of the [Creative Commons
 Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
 distribution or reproduction in other forums is
 permitted, provided the original author(s) and
 the copyright owner(s) are credited and that
 the original publication in this journal is cited,
 in accordance with accepted academic
 practice. No use, distribution or reproduction is
 permitted which does not comply with these
 terms.

Actinobacillus pleuropneumoniae, surface proteins and virulence: a review

María M. Soto Perezchica¹, Alma L. Guerrero Barrera^{1*},
 Francisco J. Avelar Gonzalez², Teodulo Quezada Tristan³ and
 Osvaldo Macias Marin¹

¹Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, ²Laboratorio de Estudios Ambientales, Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, ³Departamento de Ciencias Veterinaria, Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) is a globally distributed Gram-negative bacterium that produces porcine pleuropneumonia. This highly contagious disease produces high morbidity and mortality in the swine industry. However, no effective vaccine exists to prevent it. The infection caused by App provokes characteristic lesions, such as edema, inflammation, hemorrhage, and necrosis, that involve different virulence factors. The colonization and invasion of host surfaces involved structures and proteins such as outer membrane vesicles (OMVs), pili, flagella, adhesins, outer membrane proteins (OMPs), also participates proteases, autotransporters, and lipoproteins. The recent findings on surface structures and proteins described in this review highlight them as potential immunogens for vaccine development.

KEYWORDS

Actinobacillus pleuropneumoniae, bacterial envelope, membrane proteins, proteome, vaccine, biofilm

Introduction

Porcine pleuropneumonia, caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), is one of the respiratory diseases with the greatest economic impact worldwide (1). This disease is the source of great economic losses because it produces high morbidity, mortality, and costs for treating infected animals. Despite the clinical and sanitary management carried out within pig farms, the transmission of the disease is very easy to spread due to the portability of the bacteria from animals that survived the infection or that were asymptomatic (2–4).

To date, 19 serotypes have been recognized. The classification of biovarieties by their growth *in vitro* is of two types. Biovar 1, requires nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) exogenously for growth, and Biovar 2, which is independent of NAD. Generally, serotypes 1 to 12 and 15 to 19 are biovar 1, and serotypes 13 and 14 are biovar 2 (1, 5, 6).

The prevalence of serotypes worldwide is very varied (7–19), making the infection very difficult to control since vaccines developed for some regions are not effective for others (9) (Table 1).

Transmission of App was thought to be solely due to direct contact of mucus and aerosol from one pig to another, but it has now been shown that App may be viable in water samples from pig farms, suggesting that it could function as a reservoir, inoculum or vehicle to transmit

Brazilian Journal of Microbiology - Submission Confirmation Homology between protein AasP of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and Vat of *Escherichia coli* for co-author - [EMID:249e52c72efa40ad]

Re: "Homology between protein AasP of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and Vat of *Escherichia coli*"

Full author list: María M. Soto Perezchica; Alma Lilián Lilián Guerrero Barrera; Francisco J. Avelar-Gonzalez; Teóduo Quezada-Tristan; Eduardo Hernández-Cuellar; Juan Manuel Díaz

Dear Mrs. María Perezchica,

We have just received the submission entitled: "Homology between protein AasP of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and Vat of *Escherichia coli*" for possible publication in Brazilian Journal of Microbiology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the Journal by PhD Alma Lilián Lilián 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
Brazilian Journal of Microbiology

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this Journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springerature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this Journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

Homology between protein AasP of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and Vat of *Escherichia coli*

María M. Soto Perezchica^a (0000-0002-5599-1679), Alma L. Guerrero-Barrera^{a*} (0000-0002-0952-8544), Francisco J. Avelar-Gonzalez^b (0000-0002-0777-9243), Teóduo Quezada-Tristan^c (0000-0002-3793-4582), Eduardo Hernández-Cuellar^d (0000-0002-5996-9313), and Juan Manuel Díaz^d (0000-0003-4652-4152)

^a*Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México*

^b*Laboratorio de Estudios Ambientales, Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México*

^c*Departamento de Ciencias Veterinaria, Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México*

^d*Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada*

*e-mail: lilian.guerrero@edu.uaa.mx

Abstract—Previous studies by our research group detected cross-reactivity of total protein extracts from *Actinobacillus pleuropneumoniae* with the anti-Vat antibody, including a protein band of approximately 100 kDa, suggesting it may be the AasP protein. This study performed an *in silico* analysis to determine the homology and conserved sequences between AasP and Vat proteins, protein three-dimensional structure prediction, epitopes, and functions of the AasP protein. For *in vitro* studies, a PCR for detecting the AasP protein gene in the App serotypes 4074, JL03, L20, and AP76 (1, 3, 5, and 7, respectively) was carried out, an immunoblot was done using total protein extracts of *A. pleuropneumoniae*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el financiamiento PIB19-3 recibido y a CONACYT por la beca 615420.

Mis más sinceros agradecimientos a mi comité tutorial. Dra. Alma Lilian Guerrero Barrera, gracias por permitirme ser parte de este equipo maravilloso y por tener su apoyo en todo momento. Dr. Francisco Javier Avelar González gracias por acompañarme en este proceso. Dr. Teódulo Quezada Tristán gracias por el apoyo proporcionado desde maestría puesto que esto ha permitido grandes avances en mi desarrollo profesional y personal.

Gracias Dr. Edgar Eduardo Hernández Cuellar, Dr. Juan Manuel Diaz Villaseñor, Dra. Flor Yazmín Ramírez Castillo, Biol. Adriana Cecilia Moreno Flores, BCE. Fabiola Galindo Guerrero, Biol. Ingrid Guadalupe Ornelas García, Biol. Osvaldo Macías Marín y Ing. Daniela Gutiérrez Montiel, gracias por ser mi equipo y permitirme crecer a lado de ustedes.

Gracias a mis hijos, familia y amigos que han sido parte de este arduo proceso.

DEDICATORIA

A mi cheche, que, aunque no está conmigo, sigo dedicando cada paso que doy esperando que este orgulloso de mi.



ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pág.
<hr/>	
ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE CUADROS	5
ÍNDICE DE GRÁFICOS	6
ACRÓNIMOS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. ENFERMEDADES RESPIRATORIAS EN CERDOS.....	10
1.2. ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE.....	10
1.3. DISTRIBUCIÓN DE SEROTIPOS.....	12
1.4. TRANSMISIÓN	13
1.5. INTERACCIÓN CELULAR DE ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	15
1.5.1. <i>Adhesión bacteriana</i>	15
1.5.2. <i>Internalización bacteriana</i>	16
1.6. FACTORES DE VIRULENCIA	17
1.6.1. <i>Polisacáridos</i>	17
1.6.2. <i>Adhesinas</i>	18
1.6.3. <i>Toxinas</i>	18
1.6.4. <i>Sistemas de adquisición de hierro</i>	19
1.6.5. <i>Proteínas de membrana externa (PME)</i>	20
1.6.6. <i>Proteína VacJ</i>	23
1.6.7. <i>Autotransportador de proteína AasP</i>	23
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
2.1. HIPÓTESIS	26
2.2. OBJETIVO GENERAL.....	26
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26

3.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1.	UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....	27
3.2.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	27
3.2.1.	<i>Predicción de estructura y función</i>	<i>27</i>
3.3.	CONDICIONES DE CULTIVO BACTERIANO.....	27
3.4.	IDENTIFICACIÓN DE GENES DE LAS PROTEÍNAS AASP Y VACJ	28
3.5.	OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	29
3.6.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO	31
3.7.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR METODOLOGÍA DE BRADFORD	31
3.8.	SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	32
3.9.	IDENTIFICACIÓN DE SERIN PROTEASAS	32
3.9.1.	<i>Alineación proteica</i>	<i>32</i>
3.9.2.	<i>Western Blot</i>	<i>32</i>
3.10.	SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS	33
3.11.	HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH).....	33
3.12.	CONDICIONES DE CRECIMIENTO CELULAR	34
3.13.	MODELO DE INTERACCIÓN CELULAR.....	34
3.13.1.	<i>Hibridación Fluorescente in situ (FISH) en interacciones celulares</i>	<i>35</i>
3.13.2.	<i>Marcaje del citoesqueleto de actina</i>	<i>35</i>
4.	RESULTADOS	36
4.1.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	36
4.1.1.	<i>Proteína Aasp</i>	<i>36</i>
4.1.2.	<i>Proteína VacJ</i>	<i>37</i>
4.2.	CINÉTICA DE SEROTIPOS DE APP	39
4.3.	IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE LAS PROTEÍNAS AASP Y VACJ.....	40
4.4.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	41
4.5.	SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	42
4.6.	IDENTIFICACIÓN DE SERIN PROTEASAS	44
4.6.1.	<i>Alineación de proteínas.....</i>	<i>44</i>
4.7.	SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS	45
4.8.	HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH).....	46
4.9.	CINÉTICA DE CULTIVOS CELULARES.....	46
4.10.	MODELO DE INTERACCIÓN CELULAR.....	47
4.11.	HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH) Y MARCAJE DE ACTINA	47
5.	DISCUSIONES	50

6. CONCLUSIONES..... 56

7. REFERENCIAS..... 57



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Formas de transmisión de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	14
2	Representación de la membrana externa y PME como factores de virulencia de App	22
3	Técnicas de extracción de proteínas totales bacterianas	30
4	Modelo de estructura tridimensional de la proteína AasP de App	36
5	Modelo de estructura tridimensional de la proteína VacJ de App	38
6	Identificación de genes de proteínas por PCR	40
7	Separación de proteínas totales por SDS-PAGE obtenidas de extractos proteicos bajo condiciones de aerobiosis	42
8	Separación de proteínas totales por SDS-PAGE obtenidas de extractos proteicos bajo condiciones de anaerobiosis	43
9	Separación de proteínas totales por SDS-PAGE obtenidas de extractos proteicos bajo condiciones de restricción de hierro	43
10	Sitios homólogos entre la proteína AasP de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y Vat de <i>Escherichia coli</i> .	44
11	Sitios homólogos entre la proteína VacJ de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y Vat de <i>Escherichia coli</i>	44
12	Identificación por técnica de Western Blot de serin proteasas	45
13	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1 (4074) detectada con FISH	46
14	Hibridación bacteriana con sonda AasP	48
15	Hibridación bacteriana con sonda VacJ	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
1	Serotipos predominantes de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en el mundo	13
2	Toxinas secretadas por los diferentes serotipos de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	19
3	Obtención de proteínas de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> bajo diferentes condiciones de crecimiento bacteriano	21
4	Primer's de genes AasP y VacJ de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	28
5	Homólogos determinados por BLAST para la proteína AasP	36
6	Análogos estructurales de la proteína AasP y predicción de función	37
7	Homólogos determinados por BLAST para la proteína VacJ	38
8	Análogos estructurales de la proteína VacJ y predicción de función	39
9	Cinética de serotipos de App y <i>Escherichia coli</i>	40
10	Proteínas identificadas por medio de LC-MS en banda de proteína de aproximadamente 100 kDa	45
11	Proteínas identificadas por medio de LC-MS en banda de proteína de aproximadamente 28 kDa	46

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Cuadro	Contenido	Página
1	Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales	41
2	Comparación de técnicas de extracción de proteínas totales	42
3	Cinética de crecimiento de cultivos de células endoteliales	47



ACRÓNIMOS

%	Porcentaje	SFB	Suero fetal bovino
° C	Grado centígrado	TNF	Factor de necrosis tumoral
µg	Microgramo	UFC	Unidades Formadoras de Colonias
µm	Micrómetro	VCRP	Virus coronavirus respiratorio porcino
\bar{x}	Media	VIP	Virus de la influenza porcina
App	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	VME	Vesículas de membrana externa
ASB	Albumina sérica bovina		
BHI	Infusión cerebro corazón		
CPV2	Circovirus porcino tipo 2		
DAB	Diaminobencidina		
DO	Densidad óptica		
IL	Interleucina		
kDa	Kilo Dalton		
LB	Luria Bertani		
LPS	Lipopolisacáridos		
MEC	Matriz Extracelular		
ml	Mililitro		
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina		
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica		
nm	Nanómetro		
PBS	Tampón fosfato salino		
PME	Proteína de membrana externa		
PRRS	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino		
SD	Desviación estándar		
SDS-Page	Gel de Poliacrilamida con dodecilsulfato sódico		

RESUMEN

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) es una bacteria Gram-negativa distribuida globalmente que produce pleuroneumonía porcina. Estudios previos de nuestro grupo de investigación detectan reactividad cruzada de extractos proteicos totales de App con el anticuerpo anti-Vat, concretamente con lo que podría ser AasP, además de la formación de vacuolas en interacciones celulares *in vitro*. La proteína de membrana AasP de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) y la toxina autotransportadora vacuolante (Vat) de *Enterobacteriaceae* pertenecen a la gran familia de los autotransportadores; ambas proteínas son serina proteasas, mientras que VacJ es una lipoproteína que se le ha atribuido formación de vacuolas en interacciones celulares. En este estudio se realizó un análisis *in silico* para determinar la posible función y estructura de AasP y VacJ, la identificación de la presencia de los genes de las proteínas AasP y VacJ en serotipos 4074, JL03, L20 y AP76 (1, 3, 5 y 7 respectivamente) de App mediante PCR, estudios de similitud e identidad con la proteína Vat tanto *in silico* como *in vitro* para corroborar la existencia de reactividad cruzada entre AasP y VacJ con el anticuerpo anti-Vat además de determinar la presencia de las proteínas AasP y VacJ de App en interacciones celulares. El análisis *in silico* de la proteína AasP encontró similitud con genes de *Mannheimia granulomatis* y *Actinobacillus lignirensi* y se predice pudiera tener función hidrolasa o función de escindir otras proteasas, para VacJ se encontró similitud con lipoproteínas de la familia MlaA de *A. lignirensi*, *A. equuli* y *A. urease* con posible función en el mantenimiento de la asimetría lipídica, transportador de proteína u oxidorreductasa. Se identifican genes de las proteínas AasP y VacJ en los cuatro serotipos de App. Se encontró una identidad del 31.2% para AasP y de 20.5% para VacJ en el alineamiento de proteínas con Vat. La inmunotransferencia revela bandas de 100 y 75 kDa en los serotipos 1, 3, 5b y 7 en condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y restricción de hierro. La secuenciación LC-MS de la banda de 100 kDa identifica la serina peptidasa de la familia S8 (AasP). Las interacciones celulares muestran la presencia de los genes de las proteínas AasP y VacJ.

ABSTRACT

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) is a globally distributed Gram-negative bacterium that causes swine pleuropneumonia. Previous studies by our research group detect cross-reactivity of total protein extracts of App with the anti-Vat antibody, specifically with what could be AasP, in addition to the formation of vacuoles in cellular interactions in vitro. The membrane protein AasP from *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) and the vacuolating autotransporter toxin (Vat) from *Enterobacteriaceae* belong to the large family of autotransporters; both proteins are serine proteases, while VacJ is a lipoprotein that has been attributed to vacuole formation in cellular interactions. In this study, an *in silico* analysis was performed to determine the possible function and structure of AasP and VacJ, identifying the presence of the AasP and VacJ protein genes in serotypes 4074, JL03, L20 and AP76 (1, 3, 5 and 7 respectively) of App by PCR, similarity and identity studies with the Vat protein both *in silico* and *in vitro* to corroborate the existence of cross-reactivity between AasP and VacJ with the anti-Vat antibody in addition to determining the presence of the AasP proteins and App VacJ in cellular interactions. The *in silico* analysis of the AasP protein found similarities with genes from *Mannheimia granulomatis* and *Actinobacillus lignirensi*. It is predicted that it could have a hydrolase function or function of cleaving other proteins. For VacJ, similarity was found with lipoproteins of the MlaA family of *A. lignirensi*, *A. equuli*, and *A. urease* with possible function in the maintenance of lipid asymmetry, protein transporter, or oxidoreductase. Genes for the AasP and VacJ proteins are identified in the four serotypes of App. An identity of 31.2% for AasP and 20.5% for VacJ was found in the alignment of proteins with Vat. The immunoblot reveals 100 and 75 kDa bands in the serotypes 1, 3, 5b, and 7 under aerobiosis, anaerobiosis, and iron restriction conditions. LC-MS sequencing of the 100 kDa band identifies the S8 family serine peptidase (AasP). Cellular interactions show the presence of the AasP and VacJ protein genes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades respiratorias en cerdos

La combinación de agentes infecciosos, condiciones ambientales y de manejo sanitario, dan como resultado la manifestación de la naturaleza multifactorial de las enfermedades respiratorias que se presentan en las explotaciones porcinas.

La clasificación de los patógenos que afectan el sistema respiratorio de los cerdos se menciona según su mecanismo de invasión al huésped; los patógenos primarios son aquellos que evaden los mecanismos de defensa y se establecen por sí mismo, como por ejemplo el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), virus de la influenza porcina (VIP), coronavirus respiratorio porcino (VCRP) y Circovirus porcino tipo 2 (CVP2); mientras que los agentes oportunistas son aquellos microorganismos que en conjunto con los patógenos primarios colonizan y provocan lesiones graves y crónicas como por ejemplo *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) (Brockmeier, Halbur and Thacker, 2002).

Estas infecciones son de importancia clínica y económica debido a la sintomatología multivariada, además de las pérdidas económicas generadas precisamente por los tratamientos para contrarrestar la mortalidad, la reducción del crecimiento, la mala conversión alimenticia y el rendimiento reproductivo, siendo App uno de los agentes oportunistas de mayor prevalencia debido al creciente comercio de animales portadores infectados subclínicamente (Oba et al., 2020).

1.2. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) causante de pleuroneumonía porcina, es un microorganismo patógeno estricto del tracto respiratorio de los cerdos, el cual provoca grandes pérdidas económicas (Nahar et al. 2021).

La bacteria *App* pertenece al grupo Gram negativo, con morfología típica de cocobacilo (Sheehan et al., 2003), bioquímicamente es hemolítico, ureasa positivo, positivo a fermentación de manitol, xilosa, ribosa y lactosa y negativo a glicerol, indol y esculina (Bélanger, et al., 1990; Enríquez-Verdugo et al., 2004) de un tamaño aproximado de 0.4 x 1.0 μm , para su crecimiento *in vitro* requiere condiciones aerobias o anaerobias a una temperatura de 37° C durante un periodo de 24 a 72 horas y como características morfológicas, las colonias son parcialmente transparentes, circulares lisas, brillantes y convexas (Žutić et al., 2008).

Hasta la fecha, se han reconocido 19 serotipos (Stringer et al., 2021). La clasificación de las biovariedades por su crecimiento *in vitro* es de dos tipos, el primero es el Biovar 1 que requiere dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD por sus siglas en inglés) de manera exógena para el crecimiento y el Biovar 2 que es independiente de NAD (Niven & Lévesque, 1988). Generalmente los serotipos 1 a 12 y 15 a 19 son biovariedades 1 y los serotipos 13 y 14 son biovariedades 2 (Bossé et al., 2018; Sassu et al., 2018; Stringer et al., 2021). Los serotipos 1, 5, 9, 11 y 16 son considerados de alta patogenicidad por la severidad de lesiones que provocan (Stringer et al., 2022).

La forma de presentación de la infección, además de estar relacionado a factores propios del microorganismo como el tipo de cepa, también pueden estar relacionados con factores del huésped como la inmunidad, coinfecciones, genética y a factores ambientales (Tobías et al. 2013).

Puede haber una presentación crónica o bien una presentación hiperaguda la cual causa muerte súbita; en este tipo de infección los animales cursan por insuficiencia cardiovascular, fiebre de 41° C, disnea, apatía, secreción nasal sanguinolenta y espumosa. En el caso de la presentación aguda, la morbilidad puede llegar hasta un 100% y la mortalidad a un 10%; la sintomatología principal es fiebre y dificultad respiratoria (Sassu et al., 2018). Las principales lesiones incluyen pleuroneumonía fibrinohemorrágica y necrotizante (Hoeltig et al. 2018) lo que conlleva a una reducción en la ganancia diaria de peso del 33.6% y una reducción en la

eficiencia alimentaria del 25.5%; esta reducción variará de igual manera según la intensidad de la infección (Holmgren et al., 1999).

La bacteria App normalmente se considera un patógeno estricto del tracto respiratorio de los cerdos, aunque existen casos dispersos de haberse detectado como uno agente causal de casos de artritis, osteomielitis, hepatitis, meningitis, nefritis, líquidos pericárdicos, sangre y bazo, pudiéndose mostrar tanto en animales con signos clínicos leves como graves (Hoeltig et al. 2018). Lo que evidencia que este patógeno necesita de una vía de transporte para llegar a torrente sanguíneo y poderse diseminar a otros órganos, pudiendo ser la alternativa el endotelio celular (Plasencia-Muñoz et al., 2020).

Los estudios de serotipificación permiten identificar los serovares presentes dentro de las explotaciones porcinas, permitiendo establecer un manejo sanitario propio para cada granja.

Los tratamientos para la infección provocada por App incluyen antibióticos y vacunas, aunque estos permiten disminuir la sintomatología y severidad de las lesiones, no existe tratamiento que elimine la infección del huésped, por lo que las buenas prácticas como controles de bioseguridad, manejo de factores estresantes y vigilancia son importantes para el control de la infección (Stringer et al., 2022).

1.3. Distribución de serotipos

La bacteria App afecta a los rebaños de casi todos los países del mundo (Sassu et al., 2018). Aunque falta mucha información acerca de la distribución actual de los serotipos a nivel de mundial (Cuadro 1).

Cuadro 1. Serotipos predominantes de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en el mundo

Continente	País	Serotipo predominante	Otros serotipos	Referencia
Asia	South Korea	1 and 5	2, 4, 7, 10 and 12	Lee et al., (2015)
	Japan	2	6 and 15	Ozawa et al., (2023)
	China	1, 3, 4, 5 and 7	-	Xu et al., (2008)
Europa	Belgium	2	3, 9 and 5	Dom et al., (1994)
	Hungary	2	13, 8 and 16	Sárközi, et al., (2018)
	Denmark	2	5, 6	G et al., (2003)
	England	8	2, 3, 6, 7 and 12	Li et al., (2016)
Oceanía	Australia	15	1, 5, 7 and 12	Turni et al., (2014)
América	Canada and USA	5 and 7	1, 2, 6, 8, 13, 12, 15 and 17	Gottshalk et al., (2015); Lacouture et al., (2020)
	Mexico	1	3, 4, 5, 7, 8	Ontiveros et al., (1995); Serrano-Rubio et al., (2008) Williams et al., (2002)

(Soto Perezchiaca et al., 2024)

En México los estudios no son tan recientes o al menos no se tiene evidencia de reportes científicos respecto a la distribución de serotipos, Ontiveros-Corpus, Camacho-Machín, y Álvarez de la Cuadra-J (1995) reportaron la identificación de los serotipos 1, 4, 5, 7 y 8 (40%, 12%, 32%, 12% y 4% respectivamente) en el municipio de Cuautitlán. Williams et al. (2002) identificaron serotipo 1, 7, 5 y 11 (68.2%, 22.5%, 0.8% y 8.5% respectivamente) en el estado de Yucatán. (Rodríguez et al., 2004) realizaron otro estudio donde demostraron una frecuencia del 100% de granjas positivas a App, siendo positivos a un 100% al serotipo 1 y detectando a los serotipos 6 y 7 (48% y 52% respectivamente del total de las muestras analizadas). Estableciendo de esta manera que los serotipos más predominantes en México son los serotipos 1, 5 y 7.

1.4. Transmisión

La transmisión de App se sospecha que puede deberse a la transmisión directa de moco y gotas de aerosol de un cerdo a otro, pero para que exista transmisión de granja a granja el microorganismo debe de sobrevivir al medio ambiente que le rodea, principalmente a través de fómites. Su viabilidad en secreciones nasales fuera del cerdo se ha comprobado que es de

3-4 días, logra sobrevivir a -20°C por 17 semanas y se mantiene a -70°C en almacenamiento prolongado (Assavacheep & Rycroft, 2013). Loera-Muro et al. (2014), encontraron a App de manera viable en muestras de agua, sugiriendo que el ambiente de las granjas funciona como reservorio, inoculo o vehículo para la transmisión de la bacteria (Figura 1).

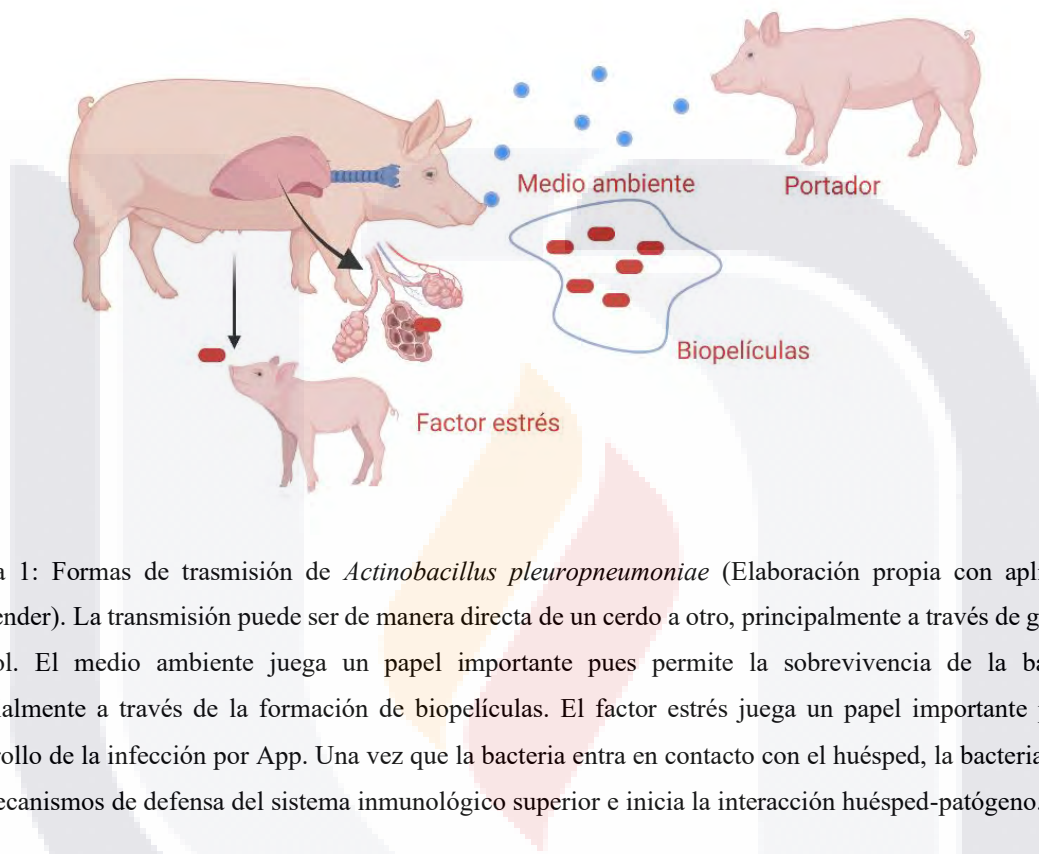


Figura 1: Formas de trasmisión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Elaboración propia con aplicación BioRender). La transmisión puede ser de manera directa de un cerdo a otro, principalmente a través de gotas de aerosol. El medio ambiente juega un papel importante pues permite la sobrevivencia de la bacteria, especialmente a través de la formación de biopelículas. El factor estrés juega un papel importante para el desarrollo de la infección por App. Una vez que la bacteria entra en contacto con el huésped, la bacteria evade los mecanismos de defensa del sistema inmunológico superior e inicia la interacción huésped-patógeno.

La transmisión de App de cerdas positivas a sus lechones se da después de un periodo de lactancia de tan solo 3 semanas (Vigre et al., 2002) con un 25% de lechones positivos y alcanzando hasta un 47% a las 6 semanas de edad (Tobías et al. 2014). En un estudio de simulación realizado por Klineberg et al. (2014), los modelos matemáticos proponen que la transmisión de App puede desencadenarse de dos formas diferentes; en la primera la enfermedad se transmite 50 veces más rápido si hay una cadena de transmisión y la segunda es, que los cerdos jóvenes necesitan un factor desencadenante para desarrollar la enfermedad. En este mismo estudio se realizó un análisis de los brotes de App reportados, concluyendo que la infección brota generalmente a las 12 semanas de edad.

1.5. Interacción celular de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

1.5.1. Adhesión bacteriana

Tanto humanos como animales tienen la capacidad de desarrollar barreras físicas e inmunológicas para evitar la invasión de microorganismos, sin embargo, estos han encontrado muchas formas para poder instalarse y colonizar el huésped, siendo la adhesión una de las características clave, que le permite a los microorganismos persistir de manera transitoria o permanente, iniciando de esta manera el evento inicial en la patogénesis de la infección (Patti et al., 1994). Para que se logre de manera definitiva la interacción huésped-patógeno, las bacterias perciben los cambios fisicoquímicos que le rodean y alteran su fisiología para adaptarse (Stones & Krachler, 2016). Siendo la adhesión el primer paso en esta interacción.

La adhesión de las bacterias a superficies biológicas está relacionada con una interacción ligando-receptor específica, existiendo una gran cantidad de receptores los cuales pueden ser proteínas o un glicoconjugados expresados en la superficie celular (Di Martino, 2018).

Los lipopolisacáridos son los principales componentes de la membrana celular externa de las bacterias Gram negativas, además de constituir una barrera de permeabilidad eficaz a los compuestos antimicrobianos y una protección frente a la lisis mediada por el complemento. Bélanger et al., (1990) comprobaron que los lipopolisacáridos (LPS) tienen relación con la adherencia de App a la superficie de los anillos traqueales porcinos, identificaron que los LPS es la principal adhesina de App responsable en la adherencia de células del tracto respiratorio superior. Efecto comprobado nuevamente por Paradis et al. (1994) al observar LPS expuestos en la superficie de la bacteria, además de identificarlos por su inmunolocalización en el endotelio vascular y epitelio traqueal.

La bacteria App tiene una interacción de igual manera con componentes de la matriz extracelular (MEC). La MEC es una red de soporte que tiene una gran influencia en la migración y proceso de células, además de participar en la curación de heridas, es un componente no celular de los tejidos, se une a las células al tejido conectivo, formada a base

de proteínas o glicoproteínas que dan el apoyo a células y tejidos y se clasifican como estructurales (colágeno y elastina) y no estructurales (fibronectina, laminina y tenascina) (Kular et al., 2014). La adhesión microbiana se une a algunos ligandos de la MEC para correlacionarse con el tropismo tisular que se observa en las infecciones (Hamer-Barrera et al., 2004). En el caso de App se ha observado que las enzimas proteolíticas reducen la adherencia bacteriana de App al colágeno hasta en un 70% (Enríquez-Verdugo et al., 2004b), mientras que la acción de fibrinógeno puede inhibir la adhesión de App hasta casi un 80% (Hamer-Barrera et al., 2004).

1.5.2. *Internalización bacteriana*

El movimiento producido por el epitelio ciliar del aparato respiratorio superior sirve como una de las primeras barreras físicas para evitar que el patógeno llegue al pulmón, pero a pesar de ello, muchos microorganismos logran adherirse y continuar su camino. En el aparato respiratorio existen uniones herméticas en el epitelio, que impiden el paso de grandes moléculas, pero a su vez permite el paso de células inmunes en los procesos infecciosos, en ocasiones los microorganismos utilizan a estas células como transporte escondiéndose dentro de ellos para llegar al pulmón (Sharma, Feng, Britto and de la Cruz, 2020).

Los neutrófilos, monocitos y macrófagos son la primera línea de defensa después de la infección de App, donde varias quimiocinas intervienen en el proceso de la infección (Ondrackova et al., 2013). En el caso de App, esta bacteria utiliza a los macrófagos para transportarse y producir una respuesta esta respuesta inflamatoria (Caruso & Ross, 1990).

Existen diversos estudios en los que se ha encontrado la internalización de la bacteria App en interacciones celulares, provocando ruptura de la integridad celular de la barrera epitelial afectando a la ocludina y la zónula ocludens de células traqueales, además de inducir en ellas la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-8, IL-6, TNF- α) en respuesta a una interacción con este patógeno (Bercier et. al., 2019; Plasencia-Muñoz et al., 2020).

Algunos microorganismos patógenos intracelulares pueden realizar un reordenamiento del citoesqueleto de actina, siendo este un mecanismo común de evasión inmune utilizado por la mayoría de las bacterias intracelulares. Sin embargo, algunos patógenos también modulan los microtúbulos del huésped por un mecanismo aún poco conocido (Sana et al. 2015). Aún se desconoce cómo es que App logra internalizarse en las células, por lo que es importante continuar en la búsqueda de cómo es que participan los diferentes factores de virulencia de la bacteria en la patogenia de la infección, para poder comprender mejor a la bacteria y poder encontrar un tratamiento eficaz que logre controlarla y erradicarla.

1.6. Factores de virulencia

Los factores de virulencia microbiana son moléculas producidas por microorganismos patógenos que le permiten tener una capacidad para evadir las defensas del huésped y causar enfermedades. Algunas de estas moléculas pueden llegar a tener la capacidad de ingresar a las células y desde ahí alterar su mecanismo (Leitão, 2020).

La bacteria App tiene la capacidad de infectar a través de diversos mecanismos que incluyen polisacáridos, adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición del hierro y proteínas de la membrana externa (Haesebrouck et al. 1997; Auger et al. 2009), los cuales pueden dividirse también según su mecanismo de acción tal como lo es a través de factores que implican la adhesión al huésped, factores en la adquisición de nutrientes esenciales, factores implicados en la inducción de lesiones y en la persistencia de la infección (Chiers et al., 2010).

1.6.1. Polisacáridos

La capsula bacteriana es el componente principal que protege la bacteria de las defensas del huésped, es responsable de la iridiscencia de las colonias bacterianas en un medio líquido claro. En cuanto a la determinación de la estructura, se ha inferido que los polisacáridos capsulares son bastantes diversos (Dubreuil et al., 2000).

La variación en el contenido de polisacáridos capsulares también puede contribuir a las diferencias de virulencia entre los aislados de App, en general, los aislamientos con capas gruesas de polisacáridos capsulares (determinado por microscopía electrónica) parecen ser más virulentas (Bandara et al., 2003).

Por otro lado, los lipopolisacáridos se han estudiado en el papel de adherencia de App al huésped, pero no se ha logrado demostrar a través de estudios moleculares (Bossé et al., 2002).

1.6.2. Adhesinas

La adhesión de las bacterias a estructuras mucosas es un paso esencial en la patogénesis de la infección, siendo las adhesinas el factor de virulencia implicado para este paso. Como se mencionó anteriormente para App una de las principales adhesinas encontradas son los LPS aunque se han encontrado otras proteínas de importancia.

En el caso de las adhesinas que mejoran la unión superficial de App es la adhesina ApfA, permitiendo incrementar la capacidad de la bacteria de colonizar el pulmón (Yang et al., 2013). Las proteínas fimbriales y una proteína de 55 kDa aun no descrita se ha relacionado con la capacidad de adhesión a células epiteliales (Overbeke et al., 2002), al igual que una proteína de 60 kDa podría estar relacionada con la adhesión a células epiteliales alveolares, componentes de la matriz como colágeno y fibrinógeno (Enríquez-Verdugo et al., 2004).

1.6.3. Toxinas

Hasta la fecha los 19 serotipos conocidos, se sabe que producen de forma diversa cuatro toxinas (ApxI, ApxII, ApxIII y ApxIV) (Stringer et al., 2021). Se tuvo conocimiento del efecto citotóxico causado por App por primera vez, gracias al estudio realizado por Kamp and van Leengoed (1989), encontrando que la mayoría de los serotipos que hasta esta fecha se conocían, tenían un efecto citotóxico y hemolítico para los neutrófilos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Toxinas secretadas por los diecinueve diferentes serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

	Operón			Actividad		Peso kDa	Serotipos
	Activador	Estructural	Exportación	Hemolítico	Citotóxico		
ApxI	apxIC	apxIA	apxIBD ^a	Fuerte	Fuerte	105-110	1, 5 ^a , 5b, 9, 10, 11, 14, 15, 16
ApxII	apxIIC	apxIIA	Ninguna ^a	Débil	Moderado	103-105	Todos excepto el 10
ApxIII	apxIIIC	apxIIIA	apxIIIBD	Nulo	Fuerte	120	2, 3, 4, 6, 8, 15
ApxIV ^b	ORF1? ^c	apxIVA	Ninguna ^a	Débil	ND ^d	200 ^d	Todos

Modificado de (Bossé et al., 2002) actualizado con datos de (Schaller et al., 2001), (Blackall et al., 2002) (Sárközi et al., 2015), (Bossé et al., 2018) y (Stringer et al., 2021)

^a Los genes apxIBD se encuentran en todos los serotipos excepto en el serotipo 3. La secreción de ApxII se produce a través de ApxIBD. Aún no se sabe nada sobre la secreción de ApxIV.

^b A diferencia de las otras toxinas Apx, ApxIV solo se produce in vivo.

^c ORF1 parece ser necesario para la actividad de ApxIV, aunque no comparte homología con ApxIC, ApxIIC o ApxIIIC.

^d ND: no determinado.

^e La masa molecular de ApxIV se predice a partir de la secuencia de proteínas.

Años después Kamp et al. (1991) describen 3 proteínas; la primera de 103 kDa con una actividad hemolítica débil y una actividad citotóxica moderada, la segunda de 105 kDa con una fuerte actividad hemolítica y una fuerte actividad citotóxica y por último una proteína de 120 kDa con una fuerte actividad citotóxica y sin actividad hemolítica, obtuvieron datos de estructura y organización genética que permitieron definir que estas moléculas pertenecen a la familia de proteínas RTX formadora de poros, denominándolas como toxinas Cly. No fue hasta que Frey et al. (1993) cambiaron la denominación por toxinas Apx I, II y III. El último descubrimiento hecho por Schaller et al. (1999), detectan una cuarta toxina denominada ApxIV con un peso molecular de 220 kDa la cual solo se detectó in vivo.

1.6.4. *Sistemas de adquisición de hierro*

El hierro es indispensable para las bacterias, el cual utilizan como cofactor en las proteínas que contienen hierro, las vías metabólicas y en el mecanismo de transporte de electrones (Seyoum et al., 2021).

Para satisfacer sus necesidades de hierro, las bacterias tienen múltiples sistemas de adquisición, lo que refleja la diversidad de sus biotipos. Los sistemas de adquisición de hierro

en bacterias son de tres tipos, el primero implica el contacto entre la bacteria y fuentes exógenas de hierro, la segunda a través de moléculas como sideróforos y hemóforos y por último mediante la absorción de hierro ferroso después de reducción del hierro férrico (Seyoum et al., 2021; Wandersman & Delepelaire, 2004)

Deslandes et al. (2007) realizaron un perfil transcripcional de App en condiciones de restricción de hierro, identificando 210 genes que se expresaban de manera diferencial, donde 92 de estos genes participan en funciones confirmadas en la adquisición de hierro, así como proteínas TonB (proteína transductora de energía) y receptores de hemoglobina HgbA.

1.6.5. *Proteínas de membrana externa (PME)*

En la búsqueda de nuevos inmunógenos que permitan crear una sola vacuna para App, se ha recurrido a buscar proteínas inmunogénicas que se encuentren en todos los serotipos de esta bacteria, siendo algunas de ellas las proteínas de membrana externa (PME). De igual manera se han realizado protocolos bajo diferentes condiciones de crecimiento bacteriano lo que ha permitido identificar proteínas involucradas en factores de virulencia bacteriana (Soto Perezchica et al., 2023) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Obtención de proteínas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* bajo diferentes condiciones de crecimiento bacteriano

Serotipo/Cepa de App	Condición de crecimiento bacteriano	Proteínas identificadas	Referencia
Serotipo 1 (4074), Serotipo 5 (1A, 155, 163, 178, 200, 201), Serotipo 7 (WF83)	Proteínas identificadas en infección natural	16.5 K, 29 K, 38.5 K, 43.5 K, 45 K, 49.5 K, 66.5 K	Rapp, et al., 1986
Serotipo 1 (79-9) Aislados clínicos de serotipos 1 a 7	Cultivos con adición de maltosa	Proteína 42 KDa	Deneer, et al., 1989
Serotipo 1 (SLWO1), Serotipo 10 (13039)	Cultivos en aerobiosis y temperaturas de 42, 16 y 37° C	Lip40	Hu, et al., 2015
Serotipo 1 (4074), Serotipo 2 (4226), Serotipo 3 (1421), Serotipo 4 (1462), Serotipo 5 (K-17), Serotipo 6 (FEMO), Serotipo 7 (WF83)	Medios de cultivo bajo restricción de hierro	HgbA	Srikumar, et al., 2004

(Soto Perezchica et al., 2023)

Tanto las PME como las proteínas extracelulares en microorganismos patógenos están involucradas en la colonización, adhesión e invasión de las células huésped. Interactúan directamente con el sistema inmunológico del huésped mientras juegan un papel crucial en el curso de las infecciones (Liao et al., 2009) (Figura 2).

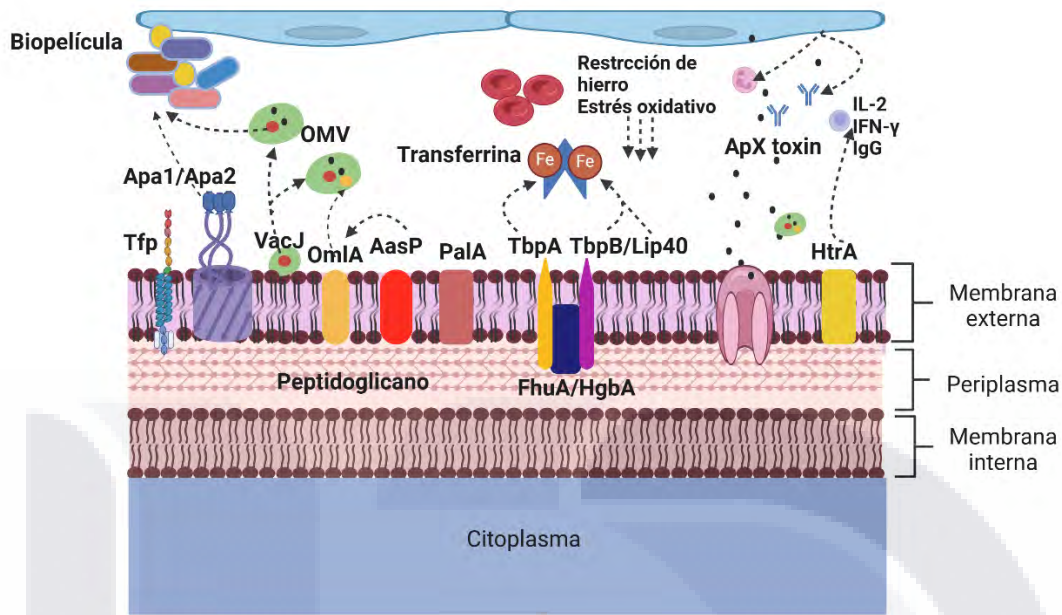


Figura 2. Representación de la membrana externa y PME como factores de virulencia de App. (Elaboración propia, Creado en Biorender.com). La proteína OmlA juega un papel importante en la integridad celular de las bacterias además de encontrarse dentro de vesículas de membrana externa, VacJ además de encontrarse dentro de las vesículas de membrana externa incrementa la secreción de estas, además participar en la formación de biopelículas y jugar un papel importante en la resistencia sérica. PalA une al peptidoglicano a la membrana externa. AasP modifica la secreción de OmlA. Las proteínas TbpA, TbpB, Lip40 y FhuA están relacionadas con el factor de virulencia de adquisición de hierro. Las toxinas ApX juegan un papel dentro de la virulencia de App provocando lisis celular y lisis de eritrocitos y neutrófilos.

Actualmente se han identificado una gran diversidad de proteínas de membrana externa de App; Chung et al. (2007) identificaron 47 proteínas de membrana externa en App serotipo 5b, representando un 50% el proteoma. Liao et al. (2009) describen también 30 proteínas para App serotipo 3.

En cuanto a la función individual de las PME de App actualmente identificadas hay muy poca información. En los siguientes capítulos se desglosan dos de las proteínas que han llevado un seguimiento de investigación y se proponen como proteínas candidatas para la elaboración de vacunas contra App en donde una de ellas se encuentra dentro del grupo de proteínas secretadas por las enterobacterias denominadas proteínas autotransportadoras, estas proteínas son secretadas por la membrana externa y se les atribuye factores de virulencia incluida actividad proteolítica, adhesión, invasión, motilidad intracelular y eliminación de hierro (Henderson et al., 2004).

1.6.6. *Proteína VacJ*

VacJ (locus J del cromosoma asociado a la virulencia) fue descrito por primera vez como una lipoproteína de membrana externa de la bacteria *Shigella flexneri*, se describió como una proteína capaz de permitir la diseminación intercelular y de formar protuberancias membranosas dentro de células infectadas, con un peso molecular de 28 kDa (Suzuki et al., 1994).

En estudios realizados por Roier et al. (2016) encontraron que la lipoproteína VacJ de las bacterias *Haemophilus influenzae* y *Vibrio cholerae* contribuye al aumento de vesículas de membrana externa (VME) y posteriormente Antenucci et al. (2017), mostraron este mismo resultado para la lipoproteína VacJ de App, además de demostrar que VacJ está altamente conservada y es expresada App durante una infección natural.

La lipoproteína de membrana externa VacJ en la patogenicidad de App tiene un papel importante en la formación de biopelículas, participa de manera importante en el mantenimiento de la integridad celular y la resistencia sérica (Xie et al., 2016a). Las biopelículas son comunidades estructuradas de diferentes células bacterianas dentro de una matriz polimérica producida por ellas mismas las cuales se encuentran incrustadas a una superficie, permitiéndoles la supervivencia al medio que las rodea (Jacques et al., 2010). El papel de la proteína VacJ en la patogenia de la infección por App pudiera relacionarse con los estudios realizados por Tremblay et al. (2017) y Loera-Muro et al. (2021) donde encontraron que App puede formar biopelículas en cerdos en proceso de infección y formar biopelículas en condiciones de laboratorio en combinación con otros patógenos respiratorios, lo cual es de importancia debido a la gran diversidad de agentes patógenos que interactúan en el complejo respiratorio porcino, donde App forma parte de este complejo.

1.6.7. *Autotransportador de proteína AasP*

La proteína AasP fue identificada por primera vez por Baltes, Buettner, and Gerlach (2007), es una proteína de tipo subsistilina de 104 kDa conservada en la membrana externa similar a

una serina proteasa, el gen de este autotransportador fue detectado en los 15 serotipos que se conocían hasta el momento de su identificación y este gen se transcribe en tejido pulmonar porcino los días 7 y 21 días después de la infección. Además de identificarse como la primera proteína autotransportadora regulada por el regulador anaeróbico global (HlyX).

Ali et al. (2008) usaron una proteína AasP recombinante y demostraron que AasP no sufre escisión proteolítica además de lograr la identificación de fragmentos de proteína OmlA (lipoproteína de membrana externa A), factor de virulencia de App que participa en la unión de la transferrina para facilitar la adquisición de hierro del huésped, lo que supone que AasP está involucrado en la modificación de OmlA.

En lo que respecta a la función de la proteína AasP en cuanto a la adherencia como factor de virulencia Tegetmeyer, Fricke, and Baltés (2009) utilizaron un mutante App donde confirmaron que esta proteína no juega un papel importante en la adherencia, en específico a superficies abióticas.

En cuanto al uso de la proteína AasP en vacunas, Oldfield et al. (2009) se plantearon la hipótesis de que una vacuna con AasP protegería a los cerdos de infecciones contra App, pero los resultados obtenidos no fueron favorables ya que la vacuna que utilizaron no fue capaz de inhibir la colonización e infección con una cepa homóloga de App.

Plasencia-Muñoz et al. (2020) realizaron un estudio de interacción de células endoteliales con diferentes serotipos de App, encontrando cambios en estructuras celulares, y la presencia de un gran número de orgánulos ácidos en el citoplasma endotelial, esta acción fue relacionada con una posible función vacuolizante, debido a los resultados de un Western Blot que mostro una banda de aproximadamente 100 kDa, presumiblemente la proteína AasP, la cual tuvo homología con el sitio de unión de la proteína Vat de *Escherichia coli*. (Díaz et al. 2020).

A pesar de estos descubrimientos aún no se determina si AasP es la responsable de inducir la formación de vacuolas por lo que se propone seguir realizando investigaciones acerca de la

naturaleza de estas vesículas intracitoplasmáticas producidas en modelos de interacción celular in vitro.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Las proteínas AasP y VacJ de *Actinobacillus pleuropneumoniae* participan en la internalización en células endoteliales durante la interacción huésped-patógeno *in vitro*.

2.2. Objetivo general

Identificar mediante un análisis bioinformático la posible función y estructura de las proteínas AasP y VacJ, en base a resultados, desarrollar un modelo de interacción celular *in vitro* que permita identificar las posibles vías de invasión de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

2.3. Objetivos específicos

1. Predecir la función y estructura de las proteínas AasP y VacJ de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a través de un análisis bioinformático.
2. Establecer el método para producir, concentrar y detectar a las proteínas AasP y VacJ de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
3. Establecer un modelo de interacción de las proteínas AasP y VacJ de *Actinobacillus pleuropneumoniae* con células endoteliales *in vitro*.
4. Establecer si existen expresión de las proteínas AasP y VacJ de *Actinobacillus pleuropneumoniae* durante la interacción huésped-patógeno *in vitro*.
5. Describir los mecanismos de invasión de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del estudio

El estudio se está realizando en el laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.

3.2. Análisis bioinformático

3.2.1. *Predicción de estructura y función*

Para el estudio de análisis bioinformático de la predicción de función y estructura de las proteínas, se realizó búsqueda del gen AasP y VacJ utilizando la base de datos GenBank disponible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) a partir del 31 de octubre de 2021. Posteriormente se realizó un alineamiento genético utilizando el programa BLASTp en línea (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para la búsqueda de genes con alta similitud a los genes del estudio. Por último, se realizó análisis de estructura tridimensional y predicción de función de las proteínas AasP y VacJ con servidor I-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>).

3.3. Condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas de App serotipo 1, 3, 5 y 7 (4074, JL03, L20 y AP76 respectivamente) y *Escherichia coli* ATCC (25922) fueron proporcionadas por el laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Todas las cepas se mantuvieron en criocongelación a -80° C hasta su uso.

Una vez descongeladas, para su mantenimiento y crecimiento las cepas de App se sembraron en medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés) suplementado con 15 μ g / ml de dinucleótido adenina y nicotina (NAD), a una temperatura de 37° C por 24

horas. Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron en agar Luria Bertani (LB) a una temperatura de 37° C por 24 horas. Posteriormente se pasaron a caldo BHI suplementado con NAD y caldo LB según fuera el caso, bajo las mismas condiciones de crecimiento bacteriano anteriormente mencionadas.

Se realizaron curvas de crecimiento bacteriano para conocer la cinética de los serotipos seleccionados. Se realizó lectura de densidad óptica a una absorbancia de 595 nm por un periodo de 8 horas de incubación, de estas mismas muestras se realizó posteriormente dilución seriada para la inoculación de 100 µl de muestra en agar BHI suplementado con NAD, para la cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Comunicación verbal, Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Universidad Autónoma de Aguascalientes). Los análisis se realizaron por triplicado.

3.4. Identificación de genes de las proteínas AasP y VacJ

Se realizó extracción de ADN de las cepas de App serotipo 1, 3, 5 y 7 (4074, JL03, L20 y AP76 respectivamente) y *Escherichia coli* ATCC (25922) siguiendo protocolo de (Loera-Muro et al., (2013). Se llevó a cabo reacciones de PCR para la identificación de los genes de las proteínas AasP y VacJ, los primers utilizados se enlistan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Primers de genes AasP y VacJ de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Nombre del gen	Secuencia	Nombre de los Primers	pb
AasP	5' GCCTACGCAGACTCTTTGGA 3' 3' CCTGACCTTCGTCCTCACTT 5'	AasP-F AasP-R	445
VacJ	5' TAACCGCTTGTTTCGTGTCGTA 3' 3' CGCTATAACTGCCAGCGTA 5'	VacJ-F VacJ-R	384

Secuencia de oligonucleótidos de genes de las proteínas de AasP y VacJ para uso en PCR. Identificados como DQ490067.2 para la proteína AasP y LR134515.1 para la proteína VacJ.

Se utilizaron diferentes condiciones para el PCR de cada proteína, para el gen AasP se utilizaron 35 ciclos de desnaturalización a 95° C por 30 segundos, alineación a 58° C por 1 minuto, extensión a 68° C por 45 segundos y extensión final a 68° C por 10 minutos. Para el gen VacJ se utilizaron 35 ciclos de desnaturalización a 95° C por 30 segundos, alineación a

53°C por 45 segundos, extensión a 68° C por 45 segundos y extensión final a 68° C por 10 minutos.

El producto de ambas PCR se llevó a electroforesis a 80V por 45 min en gel de agarosa al 1% utilizando un marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

3.5. Obtención de proteínas totales

La extracción de proteínas totales se realizó mediante técnica cracking, polvos acetónicos, sonicación y filtración y centrifugación del sobrenadante (Figura 3) (Díaz et al., 2020; Guerrero-Barrera et al., 1996; Plasencia-Muñoz et al., 2020) para establecer que técnica daría una mayor concentración de proteína total, pudiendo garantizar mejor identificación de las proteínas AasP y VacJ en estudios posteriores.

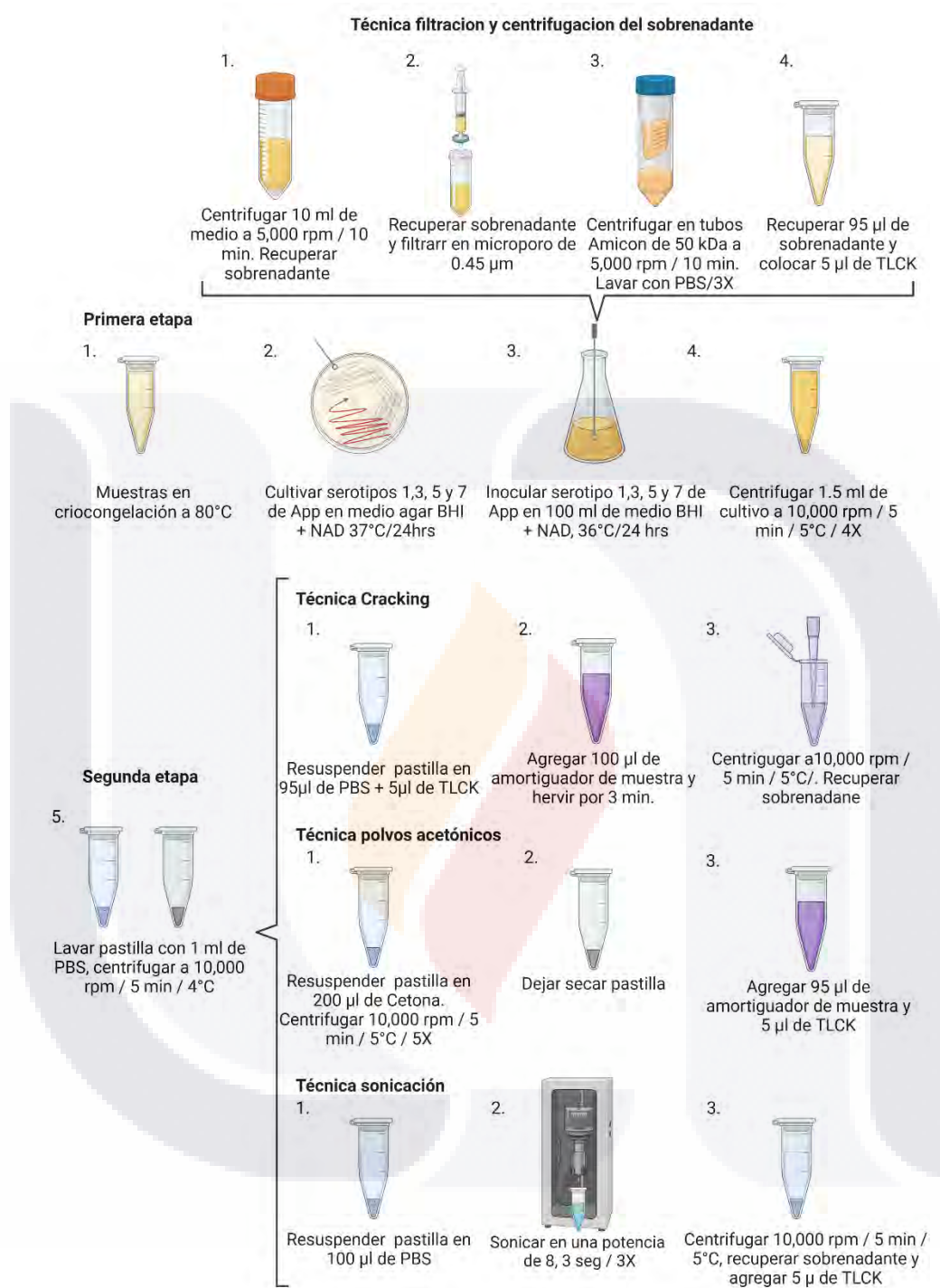


Figura 3. Técnicas de extracción de proteínas totales bacterianas (Elaboración propia con aplicación BioRender). Las técnicas de extracción de proteínas se presentan de manera cronológica a como se obtuvieron. Todas las pastillas bacterianas fueron obtenidas de un mismo medio de cultivo de manera independiente para cada serotipo de App y *Escherichia coli*.

3.6. Extracción de proteínas totales en diferentes condiciones de crecimiento bacteriano

Las cepas de App serotipo 1, 3, 5 y 7 (4074, JL03, L20 y AP76 respectivamente) y *Escherichia coli* ATCC (25922) se sometieron a diferentes condiciones de crecimiento bacteriano, para establecer bajo que condición de crecimiento se expresan las proteínas AasP y VacJ.

Para las condiciones de crecimiento bajo restricción de hierro se realizó la metodología de Deslandes et al., (2007) con ligeras modificaciones, se inoculo bacteria en caldo BHI suplementado con NAD a 37° C por 6 horas, después del periodo de incubación se adiciono 2'2 Dipyridyl (200 µM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 37°C por 3 horas más de incubación. Para las condiciones de anaerobiosis se siguió metodología de Baltes et al., (2007) con ligeras modificaciones, cultivos se colocaron en una cámara de anaerobiosis a 37°C desde el sembrado de placa hasta el cultivo en caldo, este último se dejó incubar por un periodo de 6 horas. Para la condición de aerobiosis se inoculo la bacteria y se dejó incubar a 37° C por 6 horas.

Una vez pasado el tiempo de incubación las muestras fueron sometidas a la extracción por polvos acetónicos como se describió anteriormente.

3.7. Cuantificación de proteína por metodología de Bradford

La cuantificación de proteínas totales, de las extracciones obtenidas de las diferentes cepas de App y *Escherichia coli*, se realizó mediante la metodología de Bradford (Bradford, 1976). Primero se obtuvo una curva de calibración con albumina sérica bovina (ASB), posteriormente se procedió a lectura de muestras, se colocó 10 µl de la muestra y 90 µl del reactivo de Bradford, se incubaron las muestras por 10 minutos y posteriormente se realizó lectura a una absorbancia de 595 nm en lector de microplaca (Bio-Rad #028007). El resultado se extrapolo a la curva de calibración de ASB para la determinación de concentración de proteína total de las muestras.

3.8. Separación de proteínas totales

La separación de proteínas totales de las muestras sometidas a diferentes condiciones de crecimiento se realizó mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (Laemmli. U K, 1970), a una concentración del 15%, se cargó aproximadamente 50µg de proteína total. Las muestras se corrieron a 80 V constantes. Una vez realizada la corrida de las muestras, el gel se tiñó con azul de Commasie por 15 min en agitación constante, se utilizó solución desteñidora tres veces por 15 min. Se conservó en papel celofán dulce.

3.9. Identificación de serin proteasas

Debido a los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo de investigación referente a la unión del anticuerpo policlonal anti-Vat a sitios homólogos de extractos proteicos de App, se continuo con el análisis para la identificación de serin proteasas y corroborar si las proteínas en cuestión eran AasP y VacJ.

3.9.1. *Alineación proteica*

Para buscar secuencias conservadas entre las proteínas AasP y VacJ con la serin proteasa Vat de *Escherichia coli* se realizó alineación de sus secuencias proteicas. Se utilizaron los datos en formato FASTA de las secuencias proteicas obtenido la búsqueda en la plataforma NCBI. Se realizó un alineamiento por pares de las proteínas AasP y Vat utilizando la plataforma EMBOSS Matcher (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_matcher) para identificar secuencias conservadas entre ambas proteínas. Para visualizar estos sitios conservados, superpusimos las proteínas en modelos tridimensionales (<https://swissmodel.expasy.org/>).

3.9.2. *Western Blot*

Una vez obtenido los resultados de similitud e identidad se procedió a realizar inmunoblot a las muestras obtenidas de las diferentes condiciones de crecimiento. Se les realizó la técnica de Western Blot mediante electroforesis en SDS-PAGE y transferencia a una superficie de membrana (PVDF, nitrocelulosa) a un voltaje de 12 mA por 12 hrs. Se corroboró la

transferencia realizando tinción con rojo de Ponceau y se destiño. Se realizo bloqueo de membrana con leche descremada al 5% (Gibco, BRL, Grand Island, NY), por una hora, posteriormente se realizó la incubación con anticuerpo policlonal anti-Vat (Díaz et al. 2020) a una concentración 1:1,000 a 37° C por 2 hrs y 30 min, se lavó tres veces con PBS-Tween 0.1% y se continuo con incubación de anticuerpo secundario anti-conejo IgG-HRP [1:10,000] (Molecular Probes, Eugene, Oregón, EUA) durante 30 min a 34°C. Por último, se revelo con tabletas diaminobencidina (DAB) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), según las instrucciones del proveedor. Como control positivo se utilizó un extracto de la bacteria *Escherichia coli* BL21 (pUCmT:vat) (Díaz et al. 2020) obtenido con la técnica de extracción de sobrenadante anteriormente descrita.

3.10. Secuenciación de proteínas

Una vez identificadas las bandas de App con homología a la serin proteasa Vat, se seleccionaron bandas con pesos aproximados a las proteínas AasP y VacJ (104 y 28 kDa aproximadamente) de extracto de proteínas totales de App serotipo 1, las proteínas fueron separadas a través de un SDS-Page, para realizar secuenciación de proteínas por medio de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (LC-MS).

La base de datos utilizada para la identificación fue la de Uni-prot (www.uniprot.org), en formato FASTA, que contiene secuencias de proteínas relacionadas con la especie App serovar 1 (UP000003442).

3.11. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Para corroborar la efectividad de nuestras sondas a utilizar en la interacción celular, se realizó la técnica FISH en biopelículas en portaobjetos, se utilizaron las mismas secuencias de los primers anteriormente mencionados en la técnica de PCR pero marcados con CY5 (sonda AasP y sonda VacJ).

La formación de biopelícula se realizó en portaobjeto colocando 2.5 ml de preínoculo de bacteria App serotipo 1 (4075) con 22.5 ml de caldo BHI suplementada con NAD (15 µg / ml), se incubo a 37° C por 24 horas. Una vez obtenida la biopelícula se sacó el portaobjetos de la caja y se dejó secar a temperatura ambiente. Se realizó fijación de la biopelícula en alcohol al 80% por 30 min. Se colocó la sonda con buffer de hibridación por 16 horas a 45° C, después de tres lavados, se secó y se montó con Prolong Gold (Invitrogen).

La biopelícula fue observada a través de microscopía confocal (Carl Zeiss LMS700).

3.12. Condiciones de crecimiento celular

El cultivo de células endoteliales aórticas de cerdo se obtuvo del laboratorio de Morfología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, se mantuvieron en un medio Eagle modificado de Dulbecco's suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 100 µg / ml de penicilina / estreptomina y 2,5 µg / ml de anfotericina a 37 ° C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂ y 95% de aire hasta su uso.

Para conocer la cinética de crecimiento de las células se realizó curva de crecimiento celular, se cultivaron 1x10⁴ células endoteliales en una caja de 24 pocillos por un periodo de 5 días. Se realiza cuantificación mediante técnica de exclusión con azul de tripán. Todos los análisis se realizan por triplicado.

3.13. Modelo de interacción celular

Una vez que se obtuvieron cultivos de células endoteliales en confluencia del 80%, se realizó pase de células a cámara flexiPERM® de 8 pocillos hasta dejar llegar a confluencia del 60%. Se realizó cuantificación de células a través de la técnica de exclusión con azul de tripán.

Se realizó cultivo de App serotipo 1 en condiciones normales de crecimiento, bajo las especificaciones anteriormente mencionadas. Después de 24 horas se realizó lectura de absorbancia para obtener concentración bacteriana.

Se inóculo la bacteria del serotipo 1 en los pocillos seleccionados a un MOI 1:10 y se realizó la interacción celular por un periodo de 4 horas.

3.13.1. *Hibridación Fluorescente in situ (FISH) en interacciones celulares*

Una vez pasado el tiempo de interacción se procedió a realizar el marcaje FISH. Se retiró el medio de cultivo y la bacteria sobrenadante, se lavó y posteriormente se fijó con formaldehído al 3.7%. Se utilizó sonda AasP marcada con CY5. Se realizó hibridación por un periodo de incubación de 16 horas a 45°C en cámara húmeda. Se realizó lavado y se procedió a realizar el marcaje de actina.

3.13.2. *Marcaje del citoesqueleto de actina*

Los pocillos seleccionados para el marcaje se lavaron y posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100% al 1% por 7 minutos en oscuridad y cámara húmeda. Se realizó 3 lavados y se procedió a realizar el marcaje del citoesqueleto de actina con Faloidina Alexa Fluor 488 (1:100) (Molecular Probes, Eugene, Oregón, USA) por 3 horas en oscuridad y cámara húmeda a 37° C. Se realizó lavado y secado. Se montó con Prolong Gold (Invitrogen). Los resultados tanto de la hibridación como el marcaje de actina fueron observados en a través de microscopía confocal (Carl Zeiss LMS700).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis bioinformático

4.1.1. Proteína AasP

Resultados obtenidos a través de análisis BLAST indican la presencia de homólogos con alta similitud para la proteína AasP de App (Cuadro 5) principalmente una homología con genes de las bacterias del género *Actinobacillus spp* y *Mannheimias spp*.

Cuadro 5: Homólogos determinados por BLAST para la proteína AasP

Species	% Id*	Accesion
<i>Actinobacillus suis</i>	99.46	WP_257175274.1
<i>Mannheimia granulomatis</i>	98.18	WP_027074342.1
<i>Actinobacillus lignieresii</i>	97.64	WP_126374853.1
<i>Actinobacillus capsulatus</i>	97.32	WP_018651723.1
<i>Bibersteinia trehalosi</i>	60.71	WP_125134354.1
<i>Mannheimia haemolytica</i>	60.04	HDL5699191.1
<i>Bibersteinia trehalosi</i>	60.60	WP_015431691.1
<i>Mannheimia varigena</i>	57.95	WP_178217978.1
<i>Mannheimia bovis</i>	57.20	WP_283385634.1
<i>Mannheimia</i> sp. USDA-ARS-USMARC-1261	57.31	WP_025236272.1

Elaboración propia con datos de resultados GenBank No. DQ490067.2

El modelo de la estructura tridimensional de AasP fue obtenido a través del servidor I-Tasser. Revela una estructura de proteína polipeptídica de 7 dominios (Figura 4).

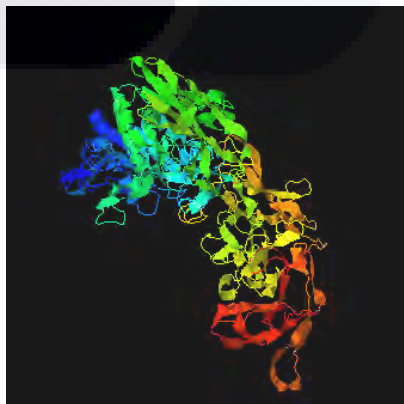


Figura 4: Modelo de estructura tridimensional de la proteína AasP de App. Obtenido a través del servidor I-Tasser, No. S603509

Los análogos estructurales para la proteína AasP de App y su predicción de función se describen en el Cuadro 6. Se predice pudiera tener una función hidrolasa.

Cuadro 6. Análogos estructurales de la proteína AasP y predicción de función

Rango*	Nombre científico	Análogo	Función	Referencia
1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	C5a	Hidrolasa. Adhesión e invasión de células huésped. Se une a la fibronectina y posiblemente a receptores RGD.	(Kagawa et al., 2009)
2	<i>Drosophila melanogaster</i>	TPP II	Hidrolasa. Serin proteasa de tipo subsistilina, con actividad exopeptidasa y endopeptidasa, degrada agente colecistoquinina-8 (CCK- 8) involucrado en el metabolismo de las grasas.	(Chuang et al., 2010)
3	<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	Fervidolisin	Hidrolasa, serin proteasa de tipo subsistilina, que puede tener actividad queratinasa.	(Kim et al., 2004)
4	<i>Homo sapiens</i>	fV y fVa	Coagulación de la sangre: definen el complejo de protrombinasa y activa la protrombina en el penúltimo paso de la cascada de coagulación	(Ruben et al., 2021)
5	<i>Plasmodium vivax</i>	PvSUB1	Hidrolasa, serin proteasa de tipo subsistilina, ejecuta el procesamiento específico de las proteínas involucradas en la salida de los merozoitos de Plasmodium.	(Giganti et al., 2014)

* Rango: Análogos de mayor a menor similitud

4.1.2. Proteína VacJ

Las búsquedas de homología que utilizan BLAST indican la presencia de homólogos con alta similitud para la proteína VacJ de App (Cuadro 7), especialmente con lipoproteínas de diferentes géneros de *Actinobacillus*.

Cuadro 7. Homólogos determinados por BLAST para la proteína VacJ

NOMBRE CIENTÍFICO	DESCRIPCIÓN	PORCENTAJE DE IDENTIDAD
<i>Actinobacillus lignieresii</i>	Lipoproteína de la familia MlaA	98.39
<i>Actinobacillus equuli</i>	Lipoproteína de la familia MlaA	90.36
<i>Actinobacillus ureae</i>	Lipoproteína de unión a fosfolípidos MlaA	88.76
<i>Actinobacillus ureae</i>	Lipoproteína de la familia MlaA	88.35

Elaboración propia con datos de resultados GenBank No. AXA22398.1

El modelo de la estructura tridimensional de VacJ fue obtenido a través del servidor I-Tasser. Revela una estructura de proteína polipeptídica de 7 dominios (Figura 5).



Figura 5: Modelo de estructura tridimensional de la proteína VacJ de App. Obtenido a través del servidor I-Tasser, No. S647896

Los análogos estructurales para la proteína VacJ de App y su predicción de función se describen en el Cuadro 8. A diferencia de la proteína AasP en este caso la predicción de funciones es más variadas, se predice pudiera participar como base estructural de la membrana, como un transportador de proteínas y como oxidoreductasa.

Cuadro 8. Análogos estructurales de la proteína VacJ y predicción de función

Rango*	Nombre científico	Análogo	Función	Referencia
1	<i>Escherichia coli/Klepsiella pneumoniae</i>	Proteína F de membrana externa/Permeasa del transportador ABC	Base estructural para el mantenimiento de la asimetría lipídica de la membrana externa bacteriana.	(Abellón-Ruiz et al., 2017)
2	<i>Drosophila melanogaster/Mus musculus</i>	Transportador de dopamina/cadena ligera de anticuerpo 9D5	Transportador de proteína	(Penmatsa et al., 2013)
3	<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans Z-2901</i>	NI,FE-CODH-320 MV+CN state	Oxidorreductasa	(Jeoung & Dobbek, 2001)
4	<i>Dusulfovibrio vulgaris</i>	Monóxido de carbono deshidrogenasa	Oxidorreductasa	(Wittenborn et al., 2018)
5	<i>Aquifex aeolicus VF5</i>	LeuT	Transportador de proteínas	(Singh et al., 2007)

* Rango: Análogos de mayor a menor similitud

4.2. Cinética de serotipos de App

Se obtiene curva de crecimiento bacteriano de los serotipos 1, 3, 5b y 7 (4074, JL03, L20 y AP76 respectivamente) de App y una curva de *Escherichia coli* ATCC como control. En el Cuadro 9 se observa de manera resumida los resultados obtenidos que servirán como base para el conocimiento de las concentraciones de UFC según la densidad óptica para la interacción celular.

Cuadro 9. Cinética de serotipos de App y *Escherichia coli*.

Cepa / Tiempo	DO 595 nm	Cuantificación de UFC
App-1	0.168	41 x 10 ⁶
App-3	0.206	70 x 10 ⁶
App-5b	0.254	58 x 10 ⁶
App-7	0.34	10 x 10 ⁷
<i>Escherichia coli</i>	0.253	41 x 10 ⁶

Elaboración propia con resultados obtenidos de la cinética de bacterias de un tiempo de 0 a 8 horas.

DO: densidad óptica

h: horas

Los valores 0 fueron resultados de una dilución seriada de 10 x 10⁵

Todos los valores son medias de análisis por triplicado

4.3. Identificación de los genes de las proteínas AasP y VacJ

Para la identificación de genes de las proteínas AasP y VacJ se obtuvieron extractos de ADN de los serotipos 1, 3, 5 y 7 de App y la cepa *Escherichia coli* ATCC como control negativo. Las muestras de ADN fueron electroforadas en gel de agarosa al 1%. Los resultados fueron la identificación de bandas de los dos genes tanto de las proteínas AasP y VacJ para los cuatro serotipos de App y no se muestra bandeo para nuestro control negativo de *E. coli* (Figura 6).

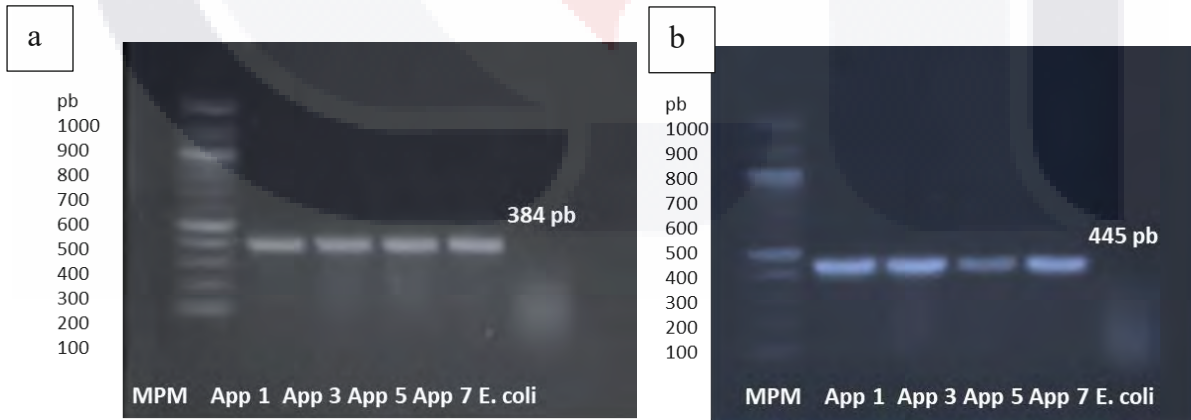


Figura 6. Identificación de genes de proteínas por PCR. A) VaJ; B) AasP. Se utilizaron extractos de ADN de serotipos 1, 3, 5 y 7 (4074, JL03, L20 y AP76 respectivamente) y *Escherichia coli* ATCC, se separaron por electroforesis a 80 V por 45 min. a) Gen VacJ de 384 pb y b) Gen AasP de 445 pb

4.4. Cuantificación de proteínas totales

Se realizó la extracción de proteínas totales de los serotipos 1, 3, 5 y 7 de App (4074, JL03, L20 y AP76 respectivamente) y la cepa *Escherichia coli* ATCC incubados bajo condiciones de crecimiento estándar (para el caso de App bajo condición de crecimiento en agar BHI suplementado con NAD, temperatura de 37°C por 24 horas y para *Escherichia coli* en agar LB a 37°C por 24 horas), obteniendo muestras de extracciones proteicas mediante las técnicas anteriormente descritas.

Se obtiene curva de calibración con ASB con más 99% de confiabilidad para la cuantificación de proteínas totales de los extractos proteicos bacterianos (Gráfico 1).

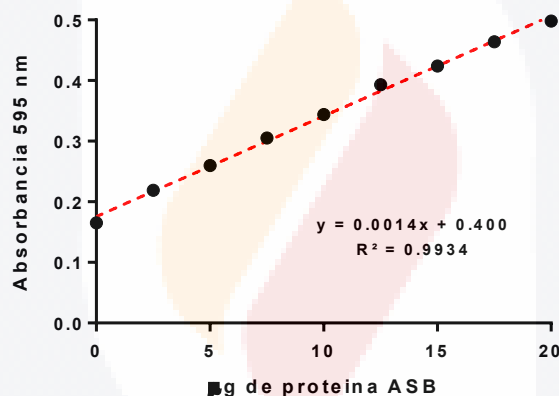


Gráfico 1. Curva de calibración para cuantificación de proteínas totales. Los resultados son expresados en µg de albumina sérica bovina (ASB) con una lectura de absorción de 595 nm.

Utilizando la fórmula de regresión lineal se realizó la cuantificación de proteína total de las muestras de las diferentes extracciones realizadas.

El mejor método en el que se obtiene una mayor concentración de proteínas totales de los diferentes serotipos de App y *Escherichia coli*, es la técnica de Polvos acetónicos, seguida de la técnica de sonicación (Grafica 2).

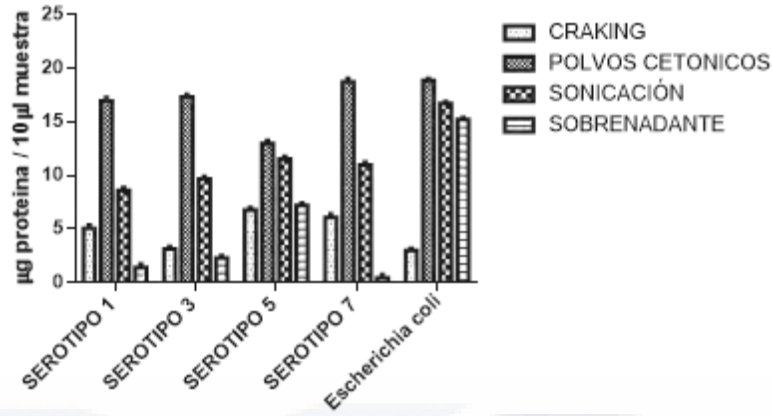


Gráfico 2. Comparación de técnicas de extracción de proteínas totales. Se muestra datos \bar{X} y SD con un intervalo de confianza del 0.05%.

4.5. Separación de proteínas totales

Se obtiene la separación de proteínas totales de las tres condiciones de crecimiento bacteriano.

Para la condición de crecimiento de aerobiosis se observa un mismo patrón de bandeo para los serotipos 1, 3, 5 y 7 (4074, JL03, L20 y AP76 respectivamente) de App. Se pueden observar bandas de los pesos moleculares aproximados de las proteínas AasP (104 kDa) y VacJ (28 kDa). Además, cabe resaltar que encontramos 3 bandas proteicas que sobresalen en los patrones de bandeo, correspondientes a pesos moleculares aproximados de 48, 37 y 30 kDa aproximadamente (Figura 7).

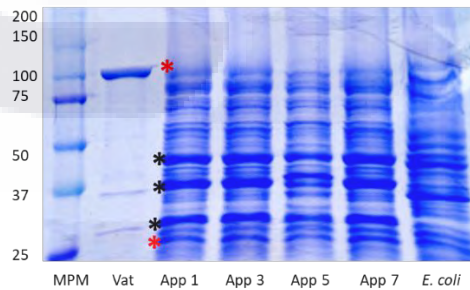


Figura 7. Separación de proteínas totales por SDS-PAGE obtenidas de extractos proteicos bajo condiciones de aerobiosis. Muestras de extractos proteicos por polvos acetonicos de serotipos 1, 3, 5 y 7 (4074, JL03, L20 y AP76 respectivamente) y *Escherichia coli* ATCC. Asteriscos rojos: proteínas de 100 y 38 kDa aproximadamente (AasP y VacJ respectivamente). Asteriscos negros, proteínas de mayor concentración en muestras de serotipos App 1, 3, 5 y 7 de App, con pesos de 48, 37 y 30 kDa.

Para las extracciones proteicas de la condición de crecimiento de anaerobiosis, también se encuentra un mismo patrón de bandeo para los 4 serotipos de App, al igual que la condición de aerobiosis se pueden localizar las mismas bandas referentes a las proteínas AasP y VacJ pero se nota claramente la disminución de la concentración de las proteínas, a diferencia de las proteínas de los pesos moleculares de 48 y 37 kDa (Figura 8).

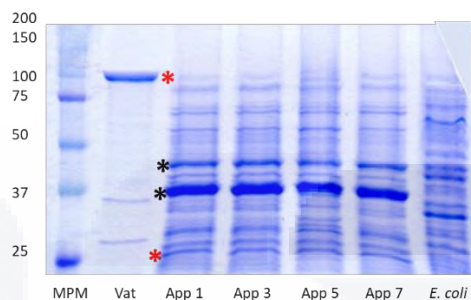


Figura 8: Separación de proteínas totales por SDS-PAGE obtenidas de extractos proteicos bajo condiciones de anaerobiosis. Muestras de extractos proteicos por polvos acetónicos de serotipos 1, 3, 5 y 7 (4074, JL03, L20 y AP76 respectivamente) y *Escherichia coli* ATCC. Asteriscos negros, proteínas de mayor concentración en muestras de serotipos App 1, 3, 5 y 7 de App, con pesos de 48, 37 kDa.

Para la condición de crecimiento de restricción de hierro se observa nuevamente el mismo patrón de bandeo para los cuatro serotipos de App, pero en esta ocasión la banda de [aproximadamente 100 kDa que se pudiera sugerir fuera AasP se encuentra más definida, se mantienen en una mayor concentración bandas de pesos moleculares a los 48 y 37 kDa similar a la condiciones de crecimiento de anaerobiosis, pero en esta ocasión también se marca a una mayor concentración una banda de un peso molecular aproximado de 70 kDa (Figura 9).

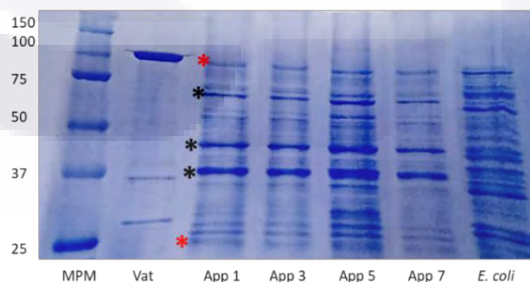


Figura 9. Separación de proteínas totales por SDS-PAGE obtenidas de extractos proteicos bajo condiciones de restricción de hierro. Muestras de extractos proteicos por polvos acetónicos de serotipos 1, 3, 5 y 7 (4074, JL03, L20 y AP76 respectivamente) y *Escherichia coli* ATCC. Asteriscos negros, proteínas de mayor concentración en muestras de serotipos App 1, 3, 5 y 7 de App, con pesos de 75, 48, 37 kDa.

4.6. Identificación de serin proteasas

4.6.1. Alineación de proteínas

Para la alineación entre la proteína AasP y Vat se obtiene como resultado secuencias conservadas con una identidad de 31.2% y una similitud de 43.8%. La alineación por pares de la secuencia con mayor similitud es mostrada en la Figura 10.

AasP	488	RQGYMATENSQTLTLLDSNGLIGKDKAIIQLNGSLKIADKLTENSKQGS	535
		::	
Vat	346	QKGSDLNAGKNLTLFLGHNGQIDLENSVTQGAGSLTFTDDYTVTTSNGS	393

Figura 10. Sitios homólogos entre la proteína AasP de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y Vat de *Escherichia coli*.

En el caso de la proteína VacJ y Vat se obtiene como resultado secuencias conservadas con una identidad de 20.5% y una similitud de 46.2%. La alineación por pares de las secuencias con mayor similitud es mostrada en la Figura 11.

VacJ	116	IDWASQTKDLKLDNGNREFGHTLGSYSVPTGAYIMVPGY	154
		: :..:.. : :..:..:.. : :..:..	
Vat	529	LDYQTRPADVKVNEWSSNRRGTGSLYIYNNPYTHVDY	567

Figura 11. Sitios homólogos entre la proteína VacJ de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y Vat de *Escherichia coli*.

Para confirmar sí la similitud e identidad encontrada en el análisis *in silico*, puede darnos la identificación de nuestras proteínas y confirmar si existen sitios de homología entre ellas, se realizó la técnica de Western Blot utilizando los extractos proteicos de nuestras tres condiciones de crecimiento bacteriano, además de nuestro control positivo de la proteína sobre expresada Vat de *E. coli*.

En el caso de las tres condiciones de crecimiento bacteriano encontramos sitios de homología con las bandas de peso molecular correspondiente a la proteína AasP (100 kDa aproximadamente), esta homología se puede observar aún más en la condición de crecimiento bajo restricción de hierro, destacando cambios en la homología del serotipo 5 de App en las tres condiciones de crecimiento bacteriano (Figura 12).

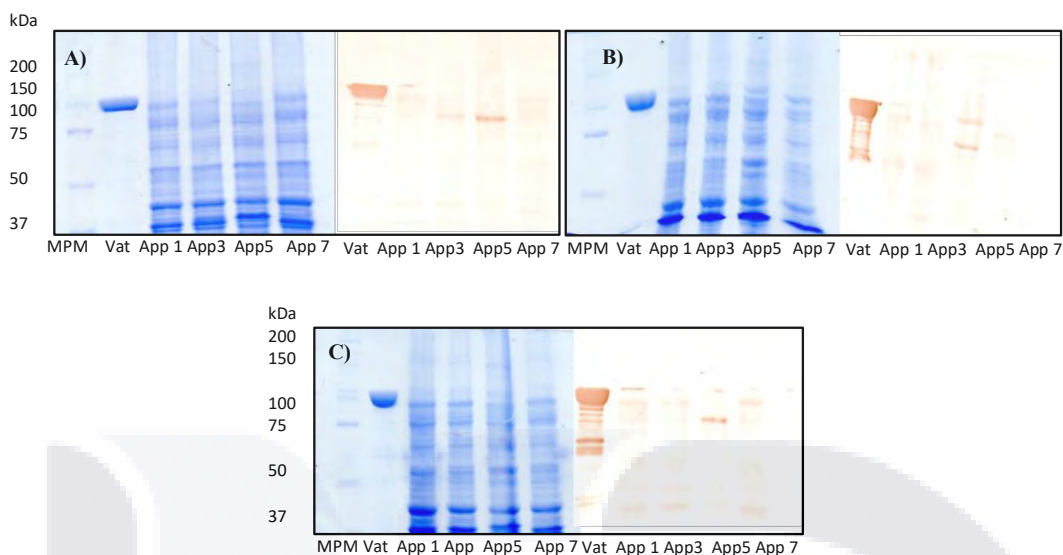


Figura 12. Identificación por técnica de Western Blot de serin proteasas. Geles con concentración de 7.5% de acrilamida. Se obtiene sitios de homología del anticuerpo anti-Vat en extractos de proteínas totales de serotipos 1, 3, 5 y 7 de App (4074, JL03, L20 y AP76 respectivamente) y Escherichia coli ATCC bajo tres condiciones de crecimiento: a) Aerobiosis b) Anaerobiosis y c) Restricción de hierro

4.7. Secuenciación de proteínas

Una vez que se obtuvo el análisis de las secuencia del LC-MS los datos se analizaron a través de Matrix Science – Mascot y la base de datos Uniprot,. Para la banda de la proteína con un peso aproximado de 100 kDa se obtuvo como resultado la identificación de la proteína S8 family serine peptidase con un 22% de cobertura. A través del BLASTp anteriormente realizado de la proteína AasP en la plataforma del NCBI, se identifica que tienen una similitud del 100%. Concluyendo la identificación de la proteína AasP (Cuadro 10).

Cuadro 10: Proteínas identificadas por medio de LC-MS en banda de proteína de aproximadamente 100 kDa

Numero de acceso	Peso molecular	Nombre de la proteína	Mascot score	Cobertura
UPI0001E4935F	99.05	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring), homodimeric type	872	33%
UPI0001E4A2D4	95.87	Aldehyde dehydrogenase 2	678	25%
UPI0003028F59	103.88	S8 family serine peptidase	667	22%

En el caso de la banda proteica seleccionada con un peso aproximado de 28 kDa no se encontro evidencia de que fuera la proteína VacJ, el peso de la proteína identificada en la banda con una cobertura del 53% para la proteína OmpA (Cuadro 11).

Cuadro 11: Proteínas identificadas por medio de LC-MS en banda de proteína de aproximadamente 28 kDa

Numero de acceso	Peso molecular	Nombre de la proteína	Mascot score	Cobertura
UPI0000050C83	38.77	Outer membrane protein A	1959	53%
UPI0000050C84	39.63	Cluster: Outer membrane protein P5	480	32%
UPI0000397C41	30.42	Lipoprotein E	339	23%

4.8. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Se obtuvo hibridación positiva para la sonda AasP y VacJ en el serotipo 4074 de App (Figura 13).

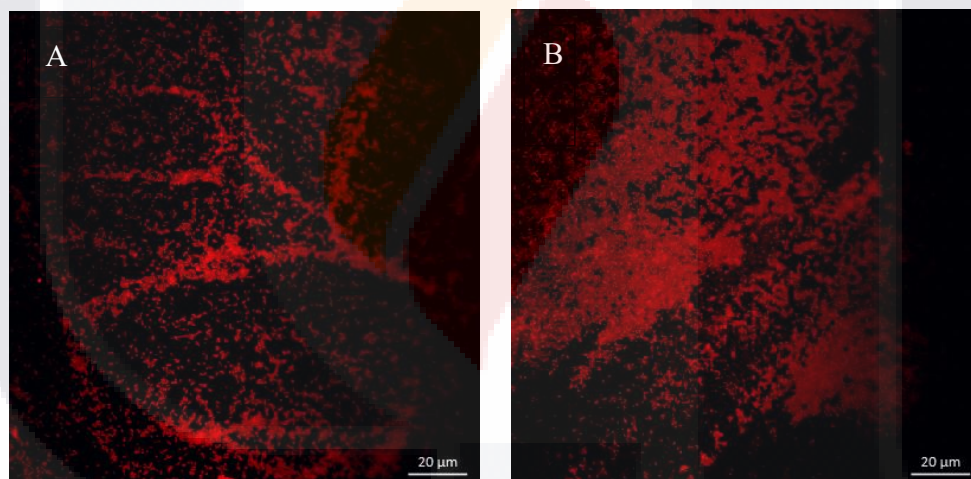


Figura 13. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 (4074) detectada con FISH. A) AasP; B) VacJ. Sondas marcadas con CY5.

4.9. Cinética de cultivos celulares

Se obtiene curva de crecimiento de células endoteliales de aorta de cerdo, se realiza análisis de muestras por triplicado. La curva muestra un crecimiento sigmoideo normal (Grafico 3).

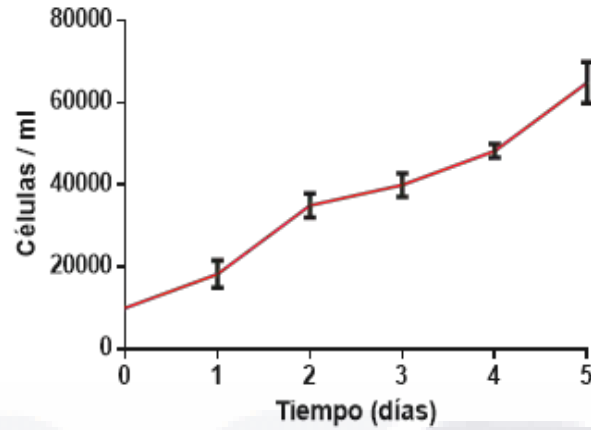


Gráfico 3. Cinética de crecimiento de cultivos de células endoteliales. Células endoteliales fueron cultivadas para un inoculo inicial de 10×10^4 , se muestran medias y desviación estándar de análisis por triplicado de 5 días consecutivos de cuantificación celular. Se obtiene como resultado, curva sigmoidea normal.

4.10. Modelo de interacción celular

Se obtiene cultivo de células endoteliales con una confluencia del 60% en condiciones de cultivos libres de antibióticos.

Después de la cuantificación de células endoteliales se estableció crecimiento celular de 5×10^4 células a una confluencia del 60% en cámara flexiPERM®.

Se obtuvo concentración de bacterias por ml de cultivo. Se estable una multiplicidad de infección (MOI) de 1 y 10.

4.11. Hibridación fluorescente in situ (FISH) y marcaje de actina

En el caso de la hibridación con sonda AasP y VacJ, las sondas hibridaron a dichas proteínas (Figura 14), lo que sugiere la participación de ambas proteínas en un modelo de interacción celular *in vitro*. La hibridación se encontró principalmente en zonas de núcleos y nucleolos.

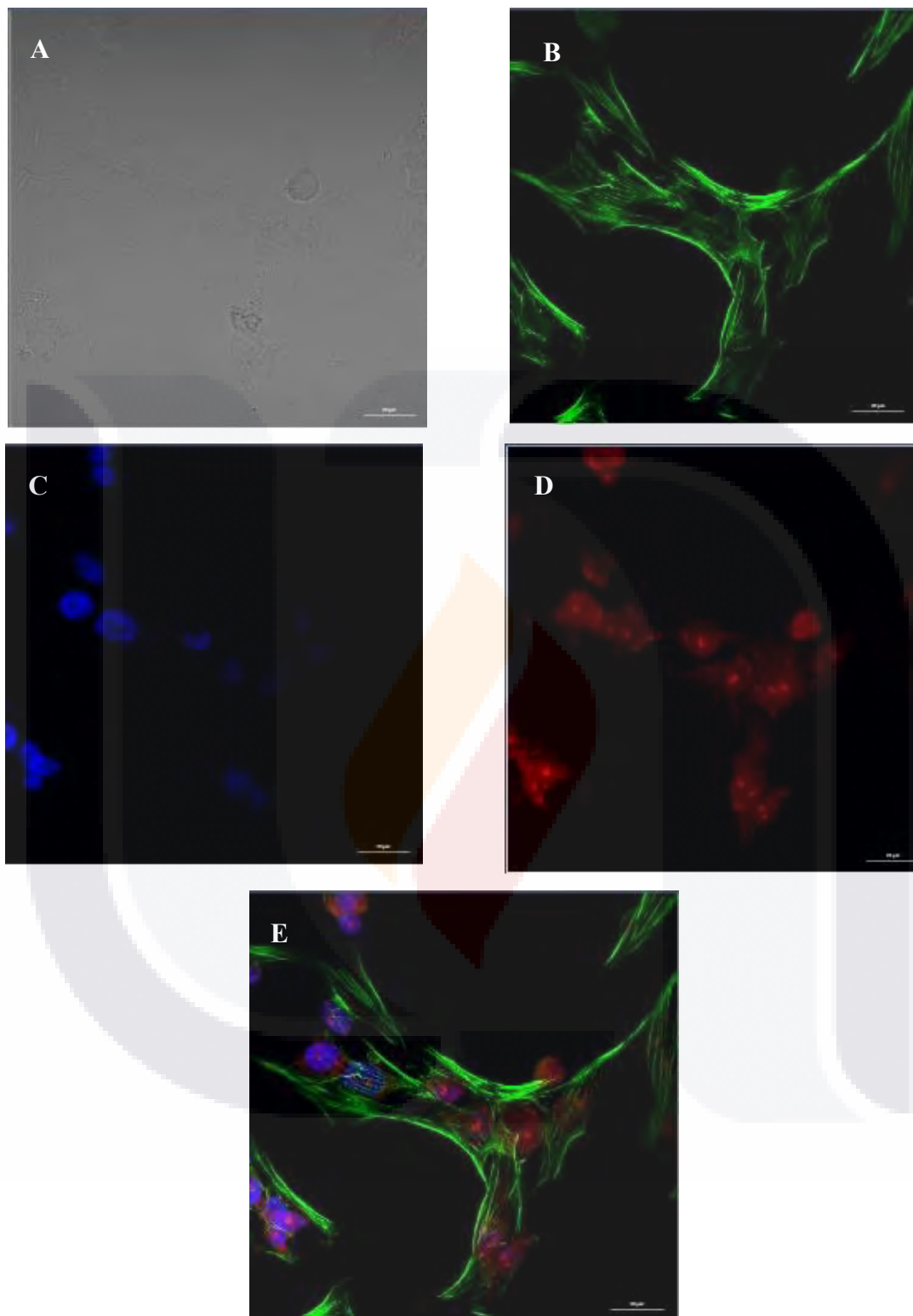


Figura 14. Hibridación bacteriana con sonda AasP. Interacción de células endoteliales (MOI 10) con App 4074. A) Interacción celular con luz transmitida; B) Citoesqueleto de actina se muestra en verde (marcaje Faloidina Alexa Fluor 488); C) Núcleos celulares se muestran en azul (marcaje con DAPI); D) Hibridación positiva con sonda AasP se muestra en rojo (marcaje con CY5); E). Merge de marcajes celulares.

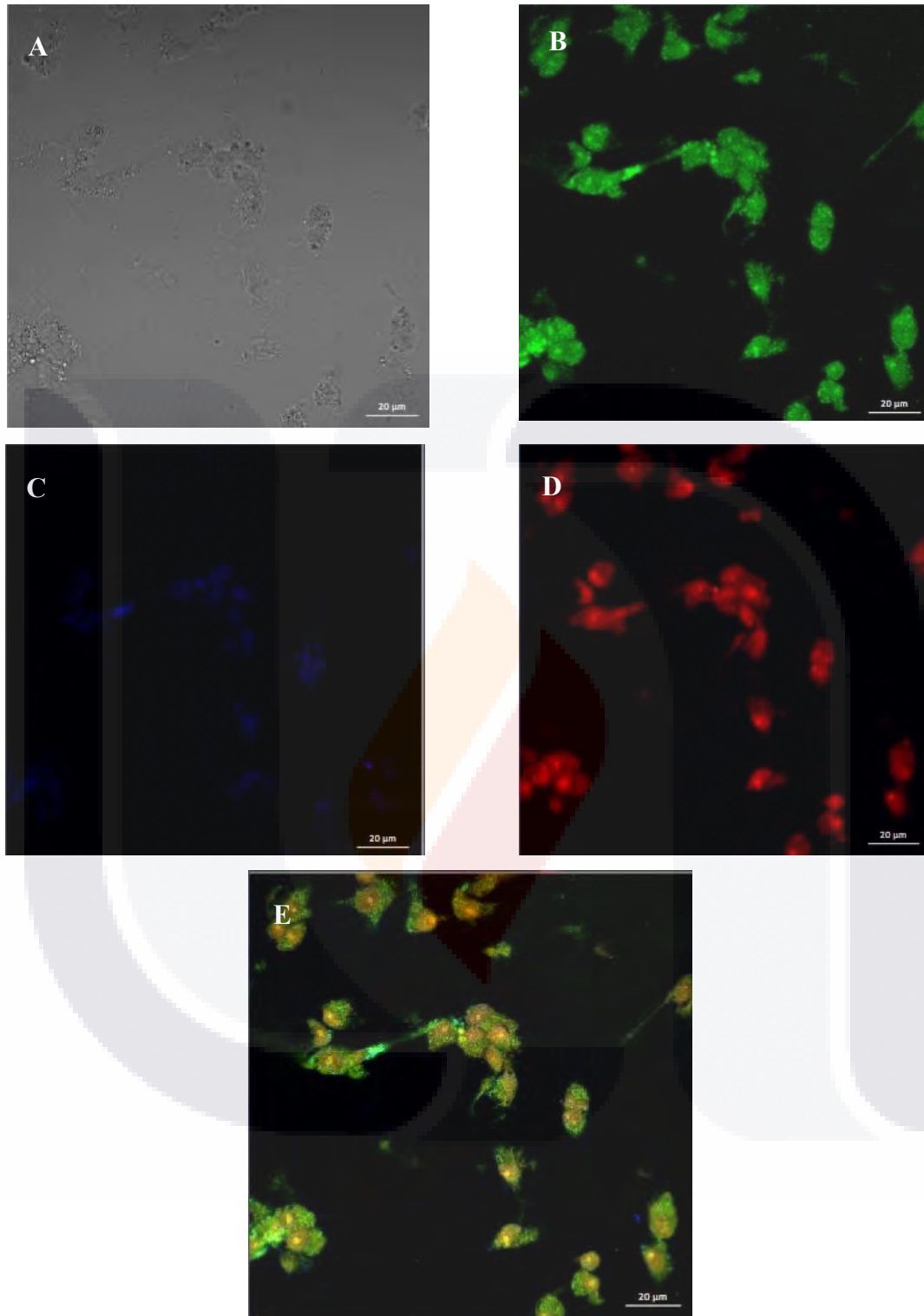


Figura 15. Hibridación bacteriana con sonda VacJ. Interacción de células endoteliales (MOI 10) con App 4074. A) Interacción celular con luz transmitida; B) Citoesqueleto de actina se muestra en verde (marcaje Faloidina Alexa Fluor 488); C) Núcleos celulares se muestran en azul (marcaje con DAPI); D) Hibridación positiva con sonda VacJ se muestra en rojo (marcaje con CY5); E). Merge de marcajes celulares.

5. DISCUSIONES

En un estudio previo realizado por nuestro equipo de investigación (Plasencia-Muñoz et al., 2020), se detectó la posible presencia de serin proteasas utilizando un anticuerpo policlonal anti-Vat, serin proteasa de *Escherichia coli*, mediante inmunotransferencia de extractos de proteínas totales de App, encontrando reactividad cruzada con una banda de un peso molecular aproximado de 100 kDa, sugiriendo pudiera ser la proteína AasP, además de encontrar formación de vacuolas en células endoteliales en interacción con diferentes serotipos de App. Mientras que, en un trabajo de revisión de proteínas de membrana de App, se encontró que VacJ pudiera tener este mismo efecto de formación de vacuolas sobre cultivos celulares (Soto Perezchica et al., 2023). Este estudio de investigación es una continuación de este proyecto, en el cual se desarrollaron diferentes técnicas bioinformáticas y técnicas *in vitro* para poder determinar mediante un análisis bioinformático la posible función de estas proteínas y mediante un análisis *in vitro* confirmar la existencia de reactividad cruzada entre AasP, VacJ y Vat, así como establecer si ambas proteínas pueden estar presente durante las interacciones celulares y participar en los mecanismos de invasión de App.

Los estudios realizados hasta el momento respecto a la posible función de la proteína AasP han determinado que la proteína no sufre escisión proteolítica, no participa en la adherencia y se ha sugerido pudiera tener un papel en la formación de vesículas en interacciones celulares (Gerlach et al., 1993; Ali et al., 2008; Tegetmeyer et al., 2009; Plasencia-Muñoz et al., 2020). Por su parte la proteína VacJ se le atribuye que pudiera participa en la integridad de membrana, resistencia sérica y en la formación de biopelícula además de expresarse en infecciones naturales (Antenucci et.al., 2020; Xie et al., 2016). Ambas proteínas, tanto AasP y VacJ no han sido analizadas en interacciones celulares de ningún tipo. La toxina autotransportadora vacualizante (Vat) es una proteína autotrasportadora de las bacterias *Enterobacteriaceae* (SPATE), perteneciente al grupo de las serin proteasas mismo grupo al que pertenece la proteína AasP y se ha comprobado que participa en la formación de vacuolas en fibroblastos embrionarios de aves (Parreira & Gyles, 2003), además de causar formación

de vacuolas y cambios en la redistribución de proteína de unión estrecha en las células de la vejiga permitiendo una mayor permeabilidad celular en estudios *in vitro* (Díaz et al., 2020).

Los primeros resultados de nuestro estudio permitieron determinar la homología entre proteínas existentes en una base de datos. La homología es la similitud entre dos secuencias debido a una ascendencia común (Pearson, 2014); esta homología se puede inferir estadísticamente a partir de un sistema de búsqueda llamado BLAST, aunque esta homología no garantiza que cada parte de la proteína sea homóloga (Pearson, 2013).

El BLAST realizado en nuestro estudio muestra que la proteína AasP de App tiene un porcentaje bastante grande de identidad con parte de secuencias del genoma de bacterias como *Mannheimia granulomatis* y dos cepas de *A. lignirensii* (98.54, 97.83 y 93.33% respectivamente). En el caso del BLAST realizado para VacJ nos arroja un resultado de identidad para lipoproteína de la familia MlaA de *A. lignieresii*, *A. equuli* y *A. urea* (98.39, 90.36 y 88.76% respectivamente).

La estructura tridimensional de la proteína AasP predice que podría participar como hidrolasa, dirigiéndose a componentes de la matriz extracelular como la fibronectina y la queratina. A los autotransportadores se les han atribuido funciones como proteasas, toxinas adhesinas o inmunomoduladores, por ejemplo, TagB, TagC, Sha o Vat permiten una mayor adhesión en las células renales; Sha, TagB, Vat y Tsh tienen actividad hemaglutinina en eritrocitos de diferentes especies animales, y estas proteínas pueden inducir cambios citopáticos (Habouria et al., 2019). En el caso de TagB, TagC y Sha, se ha demostrado que son capaces de degradar mucina y gelatina y alterar la distribución del citoesqueleto de actina de las células de la vejiga, permitiendo su internalización (Pokharel et al., 2019).

La estructura tridimensional de VacJ predice que esta proteína pudiera participar en el mantenimiento de la asimetría lipídica, transportador de proteína y como una oxidoreductasa. La asimetría lipídica es llevada a cabo por un sistema denominada LMA donde participa la proteína MlaA denominada anteriormente como VacJ debido al papel que juega en la diseminación intracelular de *Shigella flexneri* permitiendo la formación de vacuolas y

permeabilidad celular (Kaur & Mingeot -Leclercq, 2024). Los transportadores de proteínas participan en la importación y exportación de metabolitos, lo cual permite la homeostasis en las bacterias, permitiendo su supervivencia, exportación de compuestos tóxicos y la construcción de la envoltura celular (Zhai et al., 2023). Por otro lado, las oxidorreductasas también participan en la supervivencia bacteriana pues permiten el intercambio de electrones para el transporte de proteínas a nivel de la membrana celular (Pham & Polakovič, 2020).

El análisis bioinformático, nos permite deducir que estas proteínas, tanto AasP como VacJ, tienen funciones que permiten de algún modo modificar la estructura y función de las células huésped, generando la formación de vacuolas o utilizando mecanismos de transporte para poder internalizarse dentro de las mismas.

Continuando con los estudios *in vitro*, para la identificación de los genes de las proteínas AasP y VacJ, se realizó PCR punto final en los serotipos 4074, JL03, L20 y AP76 de App (1, 3, 5 y 7 respectivamente). Se obtuvieron bandas de identificación de secuencia para ambas proteínas. La identificación de la proteína AasP corresponde a la misma encontrada por Ali et al. (2008), la cual está relacionada con la homología encontrada por Oldfield et al. (2009) con los diferentes serotipos analizados en la base de datos del NCBI. La proteína VacJ se había identificado mediante análisis de secuencias por cromatografía de líquidos en serotipo 5 por Chung et al., (2007) y en vesículas de membrana externa en los serotipos 3, 5 y 7 mediante Western Blot por Antenucci et al., (2017); pero en esta ocasión son identificadas a través de PCR incluyendo el serotipo 1.

Una vez confirmada la presencia del gen, se procedió a separar las proteínas bajo las diferentes condiciones de crecimiento celular. La separación de los componentes celulares es de gran importancia para detectar qué proteínas específicas forman la membrana externa de las bacterias. En el caso de App, se han desarrollado técnicas genómicas, consiguiendo la identificación de muchos componentes celulares de la membrana externa, incluidas las OMP (Deneer and Potter, 1989; Rapp and Ross, 1986; MacInnes and Rosendal, 1987; Weatherill et al., 2022), consiguiendo igualmente la estandarización de técnicas que permiten el cribado de proteínas y antígenos específicos y enriquecimiento de la membrana externa de App

(MacInnes and Rosendal, 1987; Antenucci et al., 2020) además de que la expresión de ciertas proteínas puede ser inducida a través de diferentes condiciones de crecimiento bacteriano *in vitro*, mientras que otras solo se encuentran bajo condiciones de infección natural (Deneer and Potter, 1989; Rapp and Ross, 1986; Frey, Kuhnert, Villiger and Nicolet, 1996)

En el caso de nuestro estudio las técnicas no fueron tan sofisticadas, pero nos permitió identificar, cambios en la conformación de las proteínas de membrana externa según las condiciones de crecimiento bacteriano a las que fueron sometidas. Bajo condiciones de crecimiento estándar, en nuestro estudio se identificaron las bandas de proteínas de 100 y 28 kDa (AasP y VacJ respectivamente) que son las proteínas que buscamos, pero cabe resaltar que en mayor concentración se encontraron en proteínas con un peso molecular de 48, 37 y 30 kDa. Para el caso de la proteína de 48 kDa encontrada se sugiere pudieran ser la proteína AopA identificada en 12 serotipos de App, pero no asociada a ninguna posible función en relación a factores de virulencia (Cruz et.al, 1996). La banda de proteína de 30 kDa pudieran relacionarse con la proteína ApaA la cual pertenece al grupo de lipoproteínas, descrita como una proteína con una alta homología con el antígeno de superficie CjaA de *Campylobacter jejuni* y con las proteínas de unión a solutos de la familia de transportadores ABC, además de atribuírsele que participa en la adquisición de nutrientes (Martin & Mulks, 1999). En el caso de las proteínas de 37 kDa no se encontró evidencia de que hayan sido descritas.

Se ha demostrado la estrecha relación que existe entre algunas de las OMP en relación con el factor de virulencia de adquisición de hierro. En este estudio también se detectaron bandas de proteínas con el peso molecular que buscamos (AasP y VacJ) pero las proteínas cuya concentración mayor se observa evidentemente fueron las antes descritas de 48 y 37 kDa, además de una proteína de 75 kDa que se sugiere pudiera ser la lipoproteína FhuA, que es un receptor para TbpA/TbpB, de 100 y 60 kDa respectivamente, lipoproteínas relacionadas con la unión de transferrina (Mikael et.al., 2003).

Las bacterias hacen frente a las condiciones ambientales, y al estrés coordinando la producción, plegamiento, tráfico y degradación de proteínas. El conocimiento de cómo es que son expresadas nos da una idea del comportamiento durante la patogenia de una

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

infección, además de que muchas de estas proteínas participan activamente como factores de virulencia (Njenga et al., 2023). Las bandas de proteínas correspondientes a los pesos moleculares tanto de AasP y VacJ, se observa más claramente bajo anaerobiosis y restricción de hierro, lo que confirma que bajo los cambios de condición permiten una expresión de diferentes proteínas según lo necesite la bacteria, ahora se sabe por ejemplo que la proteína AasP está regulada por un factor de anaerobiosis global HlyX, además de expresarse durante una infección activa (Baltes et al., 2007).

Actualmente se tiene conocimiento de posibles factores de virulencia que pueden tener la proteína Vat de *Escherichia coli*, como lo mencionamos anteriormente. Los resultados obtenidos nos permitieron constatar que realmente existe reactividad cruzada entre AasP y Vat, tanto de manera *in silico* como *in vitro*, pudiendo sugerir funciones similares.

Aunque en el caso de nuestro primer BLAST no se predijo la homología entre las proteínas AasP y VacJ de App y la toxina Vat de *E. coli*, estas proteínas pertenecen al grupo de las proteínas autotransportadoras, lo que sugiere pudieran tener una similitud en sus secuencias de aminoácidos. El alineamiento de secuencias de la proteína AasP y VacJ con Vat nos dio identidad de 31.2% y 20.5% y una similitud del 43.8 y 46.2% respectivamente. En estudios de bioinformática, una identidad > 40% predice una función conservada, mientras que una identidad > 25% de clase funcional amplia está conservada (Habouria et al., 2019; Sangar et al., 2007).

La reactividad cruzada determinada mediante el Western Blot detecta bandas de diferentes pesos moleculares, especialmente para bandas de un peso aproximado de 100 y 75 kDa, y no se detectan para el caso de proteínas de 28 kDa. Aun así, se realizó secuenciación de las bandas proteicas mediante LC-MS de la banda obtenida por SDS PAGE, resultando una cobertura del 22% para la proteína serina peptidasa de la familia S8 que corresponde a la proteína AasP. Estableciendo sitios de homología entre la proteína AasP con el anticuerpo anti-Vat pudiendo inferir que posiblemente existan funciones similares entre ambas. Para el caso de los resultados obtenidos de la proteína de 28 kDa no se pudo confirmar que fuera VacJ pues el resultado del análisis estableció que pudiera tratarse de otras proteínas de

membran de un peso molecular mayor, por lo que se tendría que realizar estudios con una concentración mayor de poliacrilamida para obtener proteínas de un menor peso molecular.

Vat es una proteína a la que se le han atribuido funciones citotóxicas en interacciones celulares; provoca formación de vacuolas, alteración de las uniones celulares, cambios en la distribución de los filamentos de actina y tubulina, produce daño y en cierta medida muerte celular, permitiendo la internalización (Díaz et al., 2020). Con los resultados obtenidos de las interacciones celulares de nuestro proyecto de investigación corroboramos que la sonda se une a ácidos nucleicos de la célula endotelial, lo que podríamos sugerir la importancia de estas proteínas en este tipo de interacciones celulares. Algunas bacterias patógenas producen proteínas que pueden localizarse en el núcleo de las células huésped y modificar sus procesos celulares (Reddick & Alto, 2014), además se ha observado en diferentes estudios resultados similares en donde se creía que había reactividad cruzada y después se constató que efectivamente las proteínas interactuaban con componentes nucleares (Lebreton et al., 2011).

Será importante seguir investigando si AasP cumple estas mismas funciones a nivel celular y determinar definitivamente si la homología encontrada *in silico* corresponde a las mismas funciones *in vitro* e *in vivo*, determinando si AasP participa en la internalización celular encontrada por Plasencia-Muñoz et al. (2020).

6. CONCLUSIONES

El análisis bioinformático permitió conocer que la proteína AasP tiene una homología importante con genes de la bacteria *Mannheimia granulomatis* y *Actinobacillus lignieresii*, en cuanto a la predicción de su función se obtiene que la proteína AasP pudiera tener una acción proteolítica contra componentes de la matriz extracelular (MEC) como lo es la queratina y fibronectina. Para la proteína VacJ se permitió conocer que se tiene una homología con la lipoproteína de la familia MlaA de *Actinobacillus lignieresii* y en cuanto a la predicción de su función se obtiene la proteína VacJ pudiera tener una acción como transportador de proteínas y como componente de la integridad de la membrana celular. Se obtiene la estructura tridimensional de las proteínas AasP y VacJ.

La cuantificación de proteínas totales permitió establecer que la mejor técnica de extracción para los diferentes serotipos de App es la técnica de polvos acetónicos.

El gen de las proteínas AasP y VacJ se encuentra en los serotipos 1, 3, 5 y 7 de App.

En la separación de proteínas bajo las condiciones de creciente estándar, anaerobiosis y restricción de hierro se identifican bandas de pesos molecular similares a las proteínas AasP y VacJ (104 y 28 kDa). Se confirma la presencia de la proteína AasP en condición de restricción de hierro por secuenciación de proteínas.

Existen reactividad cruzada del anticuerpo anti-Vat de *Escherichia coli* con la proteína AasP de App, por lo que se sugiere pudiera tener funciones similares a la proteína Vat de *E. coli*.

Existen una gran cantidad de proteínas de membrana externa involucradas en los mecanismos de invasión de App, se sugiere que las proteínas AasP y VacJ pudieran participar en la modificación de la estructura y función celular del huésped, permitiendo la internalización bacteriana, se necesitan más estudios in vitro que para poder comprobar esta teoría.

7. REFERENCIAS

- Abellón-Ruiz, J., Kaptan, S. S., Baslé, A., Claudi, B., Bumann, D., Kleinekathöfer, U., & van den Berg, B. (2017). Structural basis for maintenance of bacterial outer membrane lipid asymmetry. *Nature Microbiology*, 2(12), 1616–1623. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0046-x>
- Ali, T., Oldfield, N. J., Wooldridge, K. G., Turner, D. P., & Ala'Aldeen, D. A. A. (2008). Functional characterization of AasP, a maturation protease autotransporter protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*, 76(12), 5608–5614. <https://doi.org/10.1128/IAI.00085-08>
- Antenucci, F., Fougeroux, C., Bossé, J. T., Magnowska, Z., Roesch, C., Langford, P., Holst, P. J., & Bojesen, A. M. (2017a). Identification and characterization of serovar-independent immunogens in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research*, 48(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0479-5>
- Antenucci, F., Fougeroux, C., Bossé, J. T., Magnowska, Z., Roesch, C., Langford, P., Holst, P. J., & Bojesen, A. M. (2017b). Identification and characterization of serovar-independent immunogens in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research*, 48(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0479-5>
- Antenucci, F., Ovsepián, A., Wrobel, A., Winther-Larsen, H. C., & Bojesen, A. M. (2020). Design and Characterization of a Novel Tool for the Antigenic Enrichment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Outer Membrane. *Pathogens*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/pathogens9121014>
- Assavacheep, P., & Rycroft, A. N. (2013). Survival of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outside the pig. *Research in Veterinary Science*, 94(1), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.024>
- Auger, E., Deslandes, V., Ramjeet, M., Contreras, I., Nash, J. H. E., Harel, J., Gottschalk, M., Olivier, M., & Jacques, M. (2009). Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 77(4), 1426–1441. <https://doi.org/10.1128/IAI.00297-08>
- Baltes, N., Buettner, F. F. R., & Gerlach, G.-F. (2007). Selective capture of transcribed sequences (SCOTS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the chronic stage of

- disease reveals an HlyX-regulated autotransporter protein. *Veterinary Microbiology*, 123(1–3), 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.026>
- Bandara, A. B., Lawrence, M. L., Veit, H. P., & Inzana, T. J. (2003). Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs. *Infection and Immunity*, 71(6), 3320–3328. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3320-3328.2003>
- Bélangier, M., Dubreuil, D., Harel, J., Girard, C., & Jacques, M. (1990). Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infection and Immunity*, 58(11), 3523–3530. <https://doi.org/10.1128/iai.58.11.3523-3530.1990>
- 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(1), fty079. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty079>
- Blackall, P. J., Klaasen, H. L. B. M., van den Bosch, H., Kuhnert, P., & Frey, J. (2002). Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Veterinary Microbiology*, 84(1–2), 47–52. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(01\)00428-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00428-x)
- Bossé, J. T., Janson, H., Sheehan, B. J., Beddek, A. J., Rycroft, A. N., Simon Kroll, J., & Langford, P. R. (2002). *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection*, 4(2), 225–235. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01534-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01534-9)
- Bossé, J. T., Li, Y., Sárközi, R., Fodor, L., Lacouture, S., Gottschalk, M., Casas Amoribieta, M., Angen, Ø., Nedbalcova, K., Holden, M. T. G., Maskell, D. J., Tucker, A. W., Wren, B. W., Rycroft, A. N., Langford, P. R., & consortium, Br. (2018). Proposal of serovars 17 and 18 of *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on serological and genotypic analysis. *Veterinary Microbiology*, 217, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.019>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Brockmeier, S., Halbur, P., & Thacker, E. (2002). *Porcine Respiratory Disease Complex* (K. A. Brogden & J. M. Guthmiller, Eds.).
- Caruso, J. P., & Ross, R. F. (1990). Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *American Journal of Veterinary Research*, *51*(2), 227–231. <http://europepmc.org/abstract/MED/2301832>
- 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). <https://doi.org/10.1051/vetres/2010037>
- Chuang, C. K., Rockel, B., Seyit, G., Walian, P. J., Schönege, A.-M., Peters, J., Zwart, P. H., Baumeister, W., & Jap, B. K. (2010). Hybrid molecular structure of the giant protease tripeptidyl peptidase II. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(8), 990–996. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1870>
- Chung, J. W., Ng-Thow-Hing, C., Budman, L. I., Gibbs, B. F., Nash, J. H. E., Jacques, M., & Coulton, J. W. (2007). Outer membrane proteome of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: LC-MS/MS analyses validate in silico predictions. *Proteomics*, *7*(11), 1854–1865. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600979>
- Cruz, W. T., Nedialkov, Y. A., Thacker, B. J., & Mulks, M. H. (1996). Molecular characterization of a common 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*, *64*(1), 83–90. <https://doi.org/10.1128/iai.64.1.83-90.1996>
- Deneer, H. G., & Potter, A. A. (1989). Identification of a maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, *6*(6), 425–432. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0882-4010\(89\)90084-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0882-4010(89)90084-3)
- Deslandes, V., Nash, J. H. E., Harel, J., Coulton, J. W., & Jacques, M. (2007). Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* under iron-restricted conditions. *BMC Genomics*, *8*, 72. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-72>
- Di Martino, P. (2018). Bacterial adherence: much more than a bond. *AIMS Microbiology*, *4*(3), 563–566. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.563>

- Díaz, J. M., Dozois, C. M., Avelar-González, F. J., Hernández-Cuellar, E., Pokharel, P., de Santiago, A. S., & Guerrero-Barrera, A. L. (2020). The Vacuolating Autotransporter Toxin (Vat) of *Escherichia coli* Causes Cell Cytoskeleton Changes and Produces Non-lysosomal Vacuole Formation in Bladder Epithelial Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 299. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00299>
- Dubreuil, J. D., Jacques, M., Mittal, K. R., & Gottschalk, M. (2000). Actinobacillus pleuropneumoniae surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Animal Health Research Reviews*, *1*(2), 73–93. <https://doi.org/10.1017/s1466252300000074>
- Enríquez-Verdugo, I., Guerrero, A. L., Serrano, J. J., Godínez, D., Rosales, J. L., Tenorio, V., & de la Garza, M. (2004a). Adherence of Actinobacillus pleuropneumoniae to swine-lung collagen. *Microbiology (Reading, England)*, *150*(Pt 7), 2391–2400. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27053-0>
- Enríquez-Verdugo, I., Guerrero, A. L., Serrano, J. J., Godínez, D., Rosales, J. L., Tenorio, V., & de la Garza, M. (2004b). Adherence of Actinobacillus pleuropneumoniae to swine-lung collagen. *Microbiology (Reading, England)*, *150*(Pt 7), 2391–2400. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27053-0>
- Frey, J., Bosse, J. T., Chang, Y. F., Cullen, J. M., Fenwick, B., Gerlach, G. F., Gygi, D., Haesebrouck, F., Inzana, T. J., & Jansen, R. (1993). Actinobacillus pleuropneumoniae RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *Journal of General Microbiology*, *139*(8), 1723–1728. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-8-1723>
- Frey, J., Kuhnert, P., Villiger, L., & Nicolet, J. (1996). Cloning and characterization of an Actinobacillus pleuropneumoniae outer membrane protein belonging to the family of PAL lipoproteins. *Research in Microbiology*, *147*(5), 351–361. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)84710-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)84710-3)
- Gerlach, G. F., Anderson, C., Klashinsky, S., Rossi-Campos, A., Potter, A. A., & Willson, P. J. (1993). Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1. *Infection and Immunity*, *61*(2), 565–572. <https://doi.org/10.1128/iai.61.2.565-572.1993>

- Giganti, D., Bouillon, A., Tawk, L., Robert, F., Martínez, M., Crublet, E., Weber, P., Girard Blanc, C., Petres, S., Haouz, A., Hernandez, J.-F., Mercereau-Puijalon, O., Alzari, P., & Barale, J.-C. (2014). A novel Plasmodium-specific prodomain fold regulates the malaria drug target SUB1 subtilase. *Nature Communications*, 5, 4833. <https://doi.org/10.1038/ncomms5833>
- Guerrero-Barrera, A. L., García-Cuéllar, C. M., Villalba, J. D., Segura-Nieto, M., Gómez-Lojero, C., Reyes, M. E., Hernández, J. M., Garcia, R. M., & de la Garza, M. (1996). Actin-related proteins in *Anabaena* spp. and *Escherichia coli*. *Microbiology*, 142(5), 1133–1140. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-5-1133>
- Habouria, H., Pokharel, P., Maris, S., Garénaux, A., Bessaiah, H., Houle, S., Veyrier, F. J., Guyomard-Rabenirina, S., Talarmin, A., & Dozois, C. M. (2019). Three new serine-protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) from extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* and combined role of SPATEs for cytotoxicity and colonization of the mouse kidney. *Virulence*, 10(1), 568–587. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1624102>
- 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(2), 239–249. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00162-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00162-4)
- Hamer-Barrera, R., Godínez, D., Enríquez, V. I., 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. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 68(1), 33–41.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(4), 692–744. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.692-744.2004>
- Hoeltig, D., Rohde, J., Frase, R., Nietfeld, F., Waldmann, K.-H., Valentin-Weigand, P., & Meens, J. (2018a). Multi-organ spreading of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar

- 7 in weaned pigs during the first week after experimental infection. *Veterinary Research*, 49(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0592-0>
- Hoeltig, D., Rohde, J., Frase, R., Nietfeld, F., Waldmann, K.-H., Valentin-Weigand, P., & Meens, J. (2018b). Multi-organ spreading of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 in weaned pigs during the first week after experimental infection. *Veterinary Research*, 49(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0592-0>
- Holmgren, N., Lundeheim, N., & Wallgren, P. (1999). Infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Fattening Pigs. Influence of Piglet Production Systems and Influence on Production Parameters. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 46(8), 535–544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1999.tb01246.x>
- Jacques, M., Aragon, V., & Tremblay, Y. D. N. (2010). Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Animal Health Research Reviews*, 11(2), 97–121. <https://doi.org/DOI:10.1017/S1466252310000149>
- Jeoung, J.-H., & Dobbek, H. (2001). Structural Basis of Cyanide Inhibition of Ni,Fe-containing Carbon Monoxide Dehydrogenase. In *J Bacteriol* (Vol. 183). www.pdb.org
- Kagawa, T. F., O'Connell, M. R., Mouat, P., Paoli, M., O'Toole, P. W., & Cooney, J. C. (2009). Model for Substrate Interactions in C5a Peptidase from *Streptococcus pyogenes*: A 1.9 Å Crystal Structure of the Active Form of ScpA. *Journal of Molecular Biology*, 386(3), 754–772. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.074>
- Kamp, E. M., Popma, J. K., Anakotta, J., & Smits, M. A. (1991). Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, 59(9), 3079–3085. <https://doi.org/10.1128/iai.59.9.3079-3085.1991>
- Kamp, E. M., & van Leengoed, L. A. (1989). Serotype-related differences in production and type of heat-labile hemolysin and heat-labile cytotoxin of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(6), 1187–1191. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.6.1187-1191.1989>
- Kaur, M., & Mingeot -Leclercq, M.-P. (2024). Maintenance of bacterial outer membrane lipid asymmetry: insight into MlaA. *BMC Microbiology*, 24(1), 186. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03138-8>

- Kim, J.-S., Kluskens, L. D., de Vos, W. M., Huber, R., & van der Oost, J. (2004). Crystal Structure of Fervidolysin from *Fervidobacterium pennivorans*, a Keratinolytic Enzyme Related to Subtilisin. *Journal of Molecular Biology*, 335(3), 787–797. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.11.006>
- Klinkenberg, D., Tobias, T. J., Bouma, A., van Leengoed, L. A. M. G., & Stegeman, J. A. (2014). Simulation study of the mechanisms underlying outbreaks of clinical disease caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in finishing pigs. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 202(1), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.015>
- Kular, J. K., Basu, S., & Sharma, R. I. (2014). The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*, 5, 2041731414557112. <https://doi.org/10.1177/2041731414557112>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lebreton, A., Lakisic, G., Job, V., Fritsch, L., Tham, T. N., Camejo, A., Mattei, P.-J., Regnault, B., Nahori, M.-A., Cabanes, D., Gautreau, A., Ait-Si-Ali, S., Dessen, A., Cossart, P., & Bierne, H. (2011). A Bacterial Protein Targets the BAHD1 Chromatin Complex to Stimulate Type III Interferon Response. *Science*, 331(6022), 1319–1321. <https://doi.org/10.1126/science.1200120>
- Leitão, J. H. (2020). Microbial Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5320. <https://doi.org/10.3390/ijms21155320>
- Liao, Y., Deng, J., Zhang, A., Zhou, M., Hu, Y., Chen, H., & Jin, M. (2009). Immunoproteomic analysis of outer membrane proteins and extracellular proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* JL03 serotype 3. *BMC Microbiology*, 9(1), 172. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-172>
- Loera-Muro, A., Ramírez-Castillo, F. Y., Moreno-Flores, A. C., Martín, E. M., Avelar-González, F. J., & Guerrero-Barrera, A. L. (2021). *Actinobacillus pleuropneumoniae* Surviving on Environmental Multi-Species Biofilms in Swine Farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 1104. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2021.722683>

- Loera-Muro, V. M., Jacques, M., Tremblay, Y. D. N., Avelar-González, F. J., Loera Muro, A., Ramírez-López, E. M., Medina-Figueroa, A., González-Reynaga, H. M., & Guerrero-Barrera, A. L. (2013). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinking water from pig farms. *Microbiology*, *159*(Pt_3), 536–544. <https://doi.org/10.1099/mic.0.057992-0>
- Loera-Muro, V. M., Loera-Muro, A., Morfin-Mata, M., Jacques, M., Avelar-González, F. J., Ramírez-Castillo, F., Ramírez-López, E. M., & Guerrero-Barrera, A. L. (2014). Porcine Respiratory Pathogens in Swine Farms Environment in Mexico. *Open Journal of Animal Sciences*, *4*(4), 196–205. <https://doi.org/10.4236/ojas.2014.44025>
- MacInnes, J. I., & Rosendal, S. (1987). Analysis of major antigens of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* and related organisms. *Infection and Immunity*, *55*(7), 1626–1634. <https://doi.org/10.1128/iai.55.7.1626-1634.1987>
- Martin, P. R., & Mulks, M. H. (1999). Cloning and characterization of a gene encoding an antigenic membrane protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* with homology to ABC transporters. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *25*(3), 245–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01349.x>
- Mikael, L. G., Srikumar, R., Coulton, J. W., & Jacques, M. (2003). *fhuA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* encodes a ferrichrome receptor but is not regulated by iron. *Infection and Immunity*, *71*(5), 2911–2915. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2911-2915.2003>
- Nahar, N., Turni, C., Tram, G., Blackall, P. J., & Attack, J. M. (2021). Chapter Two - *Actinobacillus pleuropneumoniae*: The molecular determinants of virulence and pathogenesis. In R. K. Poole & D. J. Kelly (Eds.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 78, pp. 179–216). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2020.12.001>
- Niven, D. F., & Lévesque, M. (1988). V-Factor-Dependent Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Biotype 2 (Bertschinger 2008/76). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *38*(3), 319–320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-38-3-319>
- Njenga, R., Boele, J., Öztürk, Y., & Koch, H.-G. (2023). Coping with stress: How bacteria fine-tune protein synthesis and protein transport. *Journal of Biological Chemistry*, *299*(9), 105163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105163>

- Oba, P., Wieland, B., Mwiine, F. N., Erume, J., Gertzell, E., Jacobson, M., & Dione, M. M. (2020). Status and gaps of research on respiratory disease pathogens of swine in Africa. *Porcine Health Management*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-0144-7>
- Oldfield, N. J., Worrall, K. E., Rycroft, A. N., Ali, T., Wooldridge, K. G., & Ala'Aldeen, D. A. A. (2009). AasP autotransporter protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* does not protect pigs against homologous challenge. *Vaccine*, 27(38), 5278–5283. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.047>
- Ondrackova, P., Leva, L., Kucerova, Z., Vicenova, M., Mensikova, M., & Faldyna, M. (2013). Distribution of porcine monocytes in different lymphoid tissues and the lungs during experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection and the role of chemokines. *Veterinary Research*, 44, 98. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-98>
- Ontiveros-Corpus, L., Camacho-Machin, J., & Alvarez de la Cuadra-J, J. (1995). Correlación entre la serotipificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y su aislamiento en cerdos de rastro. *Tee. Peeu. Mex.*, 33(1), 1–7.
- Overbeke, I. Van, Chiers, K., Charlier, G., Vandenberghe, I., Beeumen, J. J. Van, Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2002). Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 88 1, 59–74.
- Paradis, S. E., Dubreuil, D., Rioux, S., Gottschalk, M., & Jacques, M. (1994). High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infection and Immunity*, 62(8), 3311–3319. <https://doi.org/10.1128/iai.62.8.3311-3319.1994>
- Parreira, V. R., & Gyles, C. L. (2003). A Novel Pathogenicity Island Integrated Adjacent to the thrW tRNA Gene of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Encodes a Vacuolating Autotransporter Toxin. *Infection and Immunity*, 71(9), 5087–5096. <https://doi.org/10.1128/iai.71.9.5087-5096.2003>
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J., & Höök, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review of Microbiology*, 48, 585–617. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.003101>

- Pearson, W. R. (2013). An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Current Protocols in Bioinformatics*, 42(1), 3.1.1-3.1.8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>
- Pearson, W. R. (2014). BLAST and FASTA Similarity Searching for Multiple Sequence Alignment. In D. J. Russell (Ed.), *Multiple Sequence Alignment Methods* (pp. 75–101). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_5
- Penmatsa, A., Wang, K. H., & Gouaux, E. (2013). X-ray structure of dopamine transporter elucidates antidepressant mechanism. *Nature*, 503(7474), 85–90. <https://doi.org/10.1038/nature12533>
- Pham, M.-L., & Polakovič, M. (2020). Microbial cell surface display of oxidoreductases: Concepts and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 835–841. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.237>
- Plasencia-Muñoz, B., Avelar-González, F. J., De la Garza, M., Jacques, M., Moreno-Flores, A., & Guerrero-Barrera, A. L. (2020). Actinobacillus pleuropneumoniae Interaction With Swine Endothelial Cells. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 569370. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.569370>
- Pokharel, P., Habouria, H., Bessaiah, H., & Dozois, C. M. (2019). Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae (SPATEs): Out and About and Chopping It Up. *Microorganisms*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120594>
- Rapp, V. J., & Ross, R. F. (1986). Antibody response of swine to outer membrane components of Haemophilus pleuropneumoniae during infection. *Infection and Immunity*, 54(3), 751–760. <https://doi.org/10.1128/iai.54.3.751-760.1986>
- Reddick, L. E., & Alto, N. M. (2014). Bacteria Fighting Back: How Pathogens Target and Subvert the Host Innate Immune System. *Molecular Cell*, 54(2), 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.010>
- Rodríguez, L., Ayora, G., Ciprián, A., Álvarez, M., Segura, J. C., & Rodríguez, J. C. (2004). Perfil serológico del virus de influenza porcina, Mycoplasma hyopneumoniae y Actinobacillus pleuropneumoniae, en granjas de Yucatán, México. *Veterinaria México*, 35(4), 295–305.
- Roier, S., Zingl, F. G., Cakar, F., Durakovic, S., Kohl, P., Eichmann, T. O., Klug, L., Gadermaier, B., Weinzerl, K., Prassl, R., Lass, A., Daum, G., Reidl, J., Feldman, M. F.,

- & Schild, S. (2016). A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nature Communications*, 7(1), 10515. <https://doi.org/10.1038/ncomms10515>
- Ruben, E. A., Rau, M. J., Fitzpatrick, J. A. J., & Di Cera, E. (2021). Cryo-EM structures of human coagulation factors V and Va. *Blood*, 137(22), 3137–3144. <https://doi.org/10.1182/blood.2021010684>
- Sana, T. G., Baumann, C., Merdes, A., Soscia, C., Rattei, T., Hachani, A., Jones, C., Bennett, K. L., Filloux, A., Superti-Furga, G., Voulhoux, R., & Bleves, S. (2015). Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network. *MBio*, 6(3), e00712–e00712. <https://doi.org/10.1128/mBio.00712-15>
- Sangar, V., Blankenberg, D. J., Altman, N., & Lesk, A. M. (2007). Quantitative sequence-function relationships in proteins based on gene ontology. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 294. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-294>
- Sárközi, R., Makrai, L., & Fodor, L. (2015). Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus Pleuropneumoniae*: Serovar 16. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63(4), 444–450. <https://doi.org/10.1556/004.2015.041>
- Sassu, E. L., Bossé, J. T., Tobias, T. J., Gottschalk, M., Langford, P. R., & Hennig-Pauka, I. (2018). Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*-knowledge, gaps and challenges. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65 Suppl 1, 72–90. <https://doi.org/10.1111/tbed.12739>
- Schaller, A., Djordjevic, S. P., Eamens, G. J., Forbes, W. A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Gottschalk, M., Nicolet, J., & Frey, J. (2001). Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA. *Veterinary Microbiology*, 79(1), 47–62. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00345-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00345-x)
- Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T. J., MacInnes, J. I., Segers, R. P. A. M., & Frey, J. (1999). Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 8), 2105–2116. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-8-2105>

- Seyoum, Y., Baye, K., & Humblot, C. (2021). Iron homeostasis in host and gut bacteria – a complex interrelationship. *Gut Microbes*, *13*(1), 1874855. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1874855>
- Sharma, L., Feng, J., Britto, C. J., & dela Cruz, C. S. (2020). Mechanisms of Epithelial Immunity Evasion by Respiratory Bacterial Pathogens. *Frontiers in Immunology*, *11*, 91. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00091>
- Sheehan, B. J., Bossé, J. T., Beddek, A. J., Rycroft, A. N., Kroll, J. S., & Langford, P. R. (2003). Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host. *Infection and Immunity*, *71*(7), 3960–3970. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3960-3970.2003>
- Singh, S. K., Yamashita, A., & Gouaux, E. (2007). Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters. *Nature*, *448*(7156), 952–956. <https://doi.org/10.1038/nature06038>
- Soto Perezchica, M. M., Guerrero Barrera, A. L., Avelar Gonzalez, F. J., Quezada Tristan, T., & Macias Marin, O. (2023). *Actinobacillus pleuropneumoniae*, surface proteins and virulence: a review. *Frontiers in Veterinary Science*, *10*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2023.1276712>
- Stones, D. H., & Krachler, A. M. (2016). Against the tide: the role of bacterial adhesion in host colonization. *Biochemical Society Transactions*, *44*(6), 1571–1580. <https://doi.org/10.1042/BST20160186>
- Stringer, O. W., Bossé, J. T., Lacouture, S., Gottschalk, M., Fodor, L., Angen, Ø., Velazquez, E., Penny, P., Lei, L., Langford, P. R., & Li, Y. (2021). Proposal of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 19, and reformulation of previous multiplex PCRs for capsule-specific typing of all known serovars. *Veterinary Microbiology*, *255*, 109021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109021>
- Stringer, O. W., Li, Y., Bossé, J. T., & Langford, P. R. (2022). JMM Profile: *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a major cause of lung disease in pigs but difficult to control and eradicate. *Journal of Medical Microbiology*, *71*(3), 001483. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001483>
- Suzuki, T., Murai, T., Fukuda, I., Tobe, T., Yoshikawa, M., & Sasakawa, C. (1994). Identification and characterization of a chromosomal virulence gene, *vacJ*, required for

- intercellular spreading of *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology*, *11*(1), 31–41.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00287.x>
- Tegetmeyer, H. E., Fricke, K., & Baltes, N. (2009). An isogenic *Actinobacillus pleuropneumoniae* AasP mutant exhibits altered biofilm formation but retains virulence. *Veterinary Microbiology*, *137*(3), 392–396.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.026>
- Tobias, T. J., Bouma, A., Daemen, A. J. J. M., Wagenaar, J. A., Stegeman, A., & Klinkenberg, D. (2013). Association between transmission rate and disease severity for *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Veterinary Research*, *44*(1), 2.
<https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-2>
- Tobias, T. J., Bouma, A., van den Broek, J., van Nes, A., Daemen, A. J. J. M., Wagenaar, J. A., Stegeman, J. A., & Klinkenberg, D. (2014). Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* among weaned piglets on endemically infected farms. *Preventive Veterinary Medicine*, *117*(1), 207–214.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.07.017>
- Tremblay, Y. D. N., Labrie, J., Chénier, S., & Jacques, M. (2017). *Actinobacillus pleuropneumoniae* grows as aggregates in the lung of pigs: is it time to refine our in vitro biofilm assays? *Microbial Biotechnology*, *10*(4), 756–760.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1751-7915.12432>
- Vigre, H., Angen, Ø., Barfod, K., Lavritsen, D. T., & Sørensen, V. (2002). Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field-like conditions: emphasis on tonsillar colonisation and passively acquired colostral antibodies. *Veterinary Microbiology*, *89*(2–3), 151–159. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00149-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00149-9)
- Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*, *58*, 611–647.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>
- Weatherill, E. E., Fahie, M. A., Marshall, D. P., Andvig, R. A., Cheetham, M. R., Chen, M., & Wallace, M. I. (2022). Fast slow folding of an outer membrane porin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(20), e2121487119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2121487119>

- Williams, J. J., Torres-León, M. A., Echeverría-Coello, P., & Matos-Medina, M. C. (2002). Aislamiento e identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en pulmones de cerdos con pleuroneumonía crónica sacrificados en el rastro municipal de Mérida, Yucatán, México. *Rev Biomed*, *11*(3), 175–181.
- Wittenborn, E. C., Merrouch, M., Ueda, C., Fradale, L., Léger, C., Fourmond, V., Pandelia, M.-E., Dementin, S., & Drennan, C. L. (2018). Redox-dependent rearrangements of the NiFeS cluster of carbon monoxide dehydrogenase. *ELife*, *7*, e39451. <https://doi.org/10.7554/eLife.39451>
- Xie, F., Li, G., Zhang, W., Zhang, Y., Zhou, L., Liu, S., Liu, S., & Wang, C. (2016a). Outer membrane lipoprotein VacJ is required for the membrane integrity, serum resistance and biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, *183*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.021>
- Xie, F., Li, G., Zhang, W., Zhang, Y., Zhou, L., Liu, S., Liu, S., & Wang, C. (2016b). Outer membrane lipoprotein VacJ is required for the membrane integrity, serum resistance and biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, *183*, 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.021>
- Yang, Z., Lu, L., Zhaohui, C., Hong, Y., Huanchun, C., & Rui, Z. (2013). Adhesion Protein ApfA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Is Required for Pathogenesis and Is a Potential Target for Vaccine Development. *Clinical and Vaccine Immunology*, *20*(2), 287–294. <https://doi.org/10.1128/CVI.00616-12>
- Zhai, L., Chou, J. C.-C., Oo, H., & Dassama, L. M. K. (2023). Structures and Mechanisms of a Novel Bacterial Transport System for Fatty Acids. *ChemBioChem*, *24*(15), e202300156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.202300156>
- Žutić, M., Ružica, Ašanin., Milić, N., Ivetić, V., Vidić, B., Žutić, J., & Ašanin, J. (2008). Isolation and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pig's lungs at farms and their sensitivity. *Acta Veterinaria*, *58*(5–6), 499–507. <https://doi.org/10.2298/AVB0806499Z>